Sinteza i modeliranje oksimskih derivata furo-benzobiciklo[3.2.1]oktadiena dobivenog flow-fotokemijom

Pavlović, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:149:331411

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-26**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Kristina Pavlović

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Kristina Pavlović

SINTEZA I MODELIRANJE OKSIMSKIH DERIVATA FURO-BENZOBICIKLO[3.2.1]OKTADIENA DOBIVENOG *FLOW*-FOTOKEMIJOM

DIPLOMSKI RAD

Mentor rada: prof. dr. sc. Irena Škorić
Komentor rada: dr. sc. Danijela Barić, viša znanstvena suradnica, IRB
Neposredni voditelj rada: Ana Ratković, mag. appl. chem.
Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Irena Škorić
doc. dr. sc. Dragana Vuk
dr. sc. Danijela Barić, viša znanstvena suradnica, IRB

Zagreb, rujan 2019.

Zahvale

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za organsku kemiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Ireni Škorić na ukazanom povjerenju, susretljivosti, srdačnosti, pomoći, stručnom vođenju i savjetima prilikom izrade ovog rada i cjelokupnog školovanja na fakultetu.

Zahvaljujem se Ani Ratković, mag. appl. chem. na susretljivosti, vođenju, motivaciji i nesebičnoj pomoći tijekom eksperimentalnog dijela rada te uvijek ugodnoj radnoj atmosferi u laboratoriju.

Zahvaljujem se dr. sc. Danijeli Barić s Instituta Ruđer Bošković na pristupačnosti, nesebičnoj pomoći, izdvojenom vremenu i stručnom vođenju dijela rada vezanog za računalno ispitivanje molekula i što me upoznala s računalnom kemijom.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Dragani Vuk kao članici ispitnog povjerenstva na uloženom vremenu i stručnom osvrtu na ovaj rad.

Zahvaljujem se i svim ostalim djelatnicima Zavoda za organsku kemiju na pristupačnosti, pomoći i ugodnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem se svojim roditeljima i Dini na potpori i motivaciji tijekom cijelog školovanja te kolegama i prijateljima na pomoći i što su učinili studiranje zanimljivijim i lakšim.

SAŽETAK

Spojevi iz skupine oksima su od prije poznati kao dobri reaktivatori fosforiliranih kolinesteraza, kao i njihovi inhibitori. Acetilkolinesteraza održava normalnu razinu acetilkolina hidrolizom, a inhibicija ovog enzima posebno je važna kod smanjenja simptoma Alzheimerove bolesti kod koje je razina acetilkolina snižena. Prethodno sintetizirani benzobiciklo[3.2.1]oktadieni pokazali su obećavajuće rezultate biološke aktivnosti te je u ovom radu nastavljena daljnja funkcionalizacija koristeći spoj **1** kao početni reaktant. U cilju dobivanja do sada literaturno nepoznatih oksima i oksimskih etera sintetizirani su, izolirani i spektroskopski okarakterizirani spojevi **2-6a**. Prilikom sinteze, osim predviđenih produkata, dobiveni su i srodni derivati u kojima se otvorio furanski prsten bicikličkog kostura na dva različita načina. Odabranim sintetiziranim i nesintetiziranim oksimima i oksimskim eterima u ulozi inhibitora acetil- i butirilkolinesteraze računalno je ispitana relativna termodinamička stabilnost kompleksa enzim-inhibitor s ciljem predviđanja jačine inhibicije. Molekule koje stvaraju stabilnije komplekse trebale bi i eksperimentalno pokazati jaču sposobnost inhibicije kolinesteraza što će se ispitati za sintetizirane spojeve.

Ključne riječi: benzobiciklo[3.2.1]oktadien, kolinesteraze, oksimi, oksimski eteri, relativna termodinamička stabilnost kompleksa

SUMMARY

Synthesis and modeling of oxime derivatives of furo-benzobiciklo[3.2.1]octadiene synthesized by flow-photochemistry

Oxime derivatives are known from before as good reactivators of phosphylated cholinesterases, as well as their inhibitors. Acetylcholinesterase maintains normal acetylcholine levels by hydrolysis, and inhibition of this enzyme is particularly important in reducing symptoms of Alzheimer's disease in which acetylcholine level is lowered. The previously synthesized benzobicyclo[3.2.1]octadienes showed promising results of biological activity, and further functionalization was continued in this work using compound **1** as the initial reactant. In order to obtain previously unknown oximes and oxime ethers, compounds **2-6a** were synthesized, isolated and spectroscopically characterized. During the synthesis, in addition to the products provided, similar derivatives were obtained in which the furan ring of the bicyclic skeleton was opened in two different ways. The selected synthesized and non-synthesized oximes and oxime ethers in the role of acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors were computationally tested for the relative thermodynamic stability of the enzyme-inhibitor complex in order to predict the strength of inhibition. Molecules that form more stable complexes should also experimentally show a stronger ability to inhibit cholinesterases, which will be tested for the synthesized compounds.

Key words: benzobicyclo[3.2.1]octadiene, cholinesterases, oximes, oxime ethers, relative thermodynamic stability of the complex

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. OPĆI DIO 2

2.1. KOLINESTERAZE 2

2.1.1. Acetilkolin 3

2.1.2. Acetilkolinesteraza 4

2.1.3. Butirilkolinesteraza 7

2.1.4. Inhibicija kolinesteraza 8

2.2. OKSIMI 12

2.2.1. Općenito 12

2.2.2. Sinteza 13

2.2.3. Reakcije oksima i njihovih derivata 15

2.2.4. Primjena (terapeutski učinak) 17

3. REZULTATI I RASPRAVA 20

3.1. UVOD 20

3.2. SINTEZA OKSIMA I OKSIMSKIH ETERA 21

3.3. RAČUNALNO ISPITIVANJE OKSIMA I OKSIMSKIH ETERA KAO POTENCIJALNIH INHIBITORA ACETIL- I BUTIRILKOLINESTERAZE 25

4. EKSPERIMENTALNI DIO 34

4.1. SINTEZA OKSIMA 34

4.2. SINTEZA OKSIMSKIH ETERA 36

5. ZAKLJUČAK 40

6. LITERATURA 41

7. ŽIVOTOPIS 49

8. PRILOZI 50

1. **UVOD**

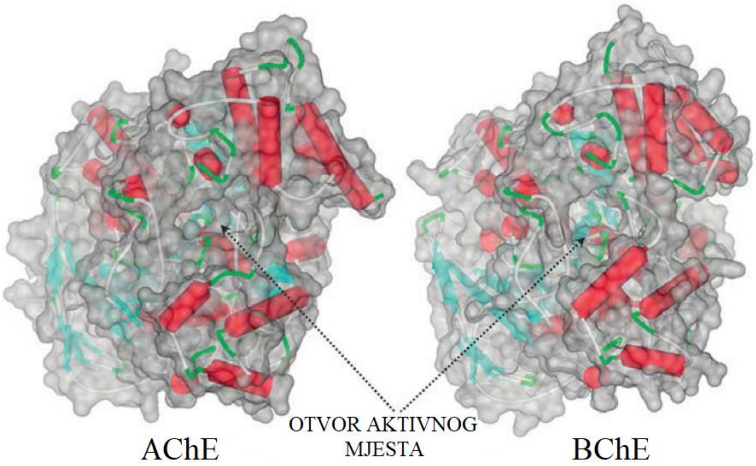
U organskoj sintezi sve se više pažnje posvećuje *flow*-kemiji koja ima brojne prednosti nad *batch*, odnosno šaržnom sintezom. Glavne prednosti su bolja učinkovitost, ekološka prihvatljivost i sigurnost čemu značajno doprinosi korištenje malog volumena kemikalija i otapala budući da se reakcije provode u mikro- ili mezoreaktorima napravljenima od inertnih materijala.[1] Početni spoj furo-benzobiciklo[3.2.1]oktadien dobiven je *flow*-sintezom, a u ovom radu ispitana je sinteza njegovog formilnog derivata Vilsmeierovim formiliranjem kao početnog spoja za daljnju sintezu do sada literaturno nepoznatih oksima i oksimskih etera.

Literaturno poznati oksimski derivati pokazali su se kao dobri reaktivatori fosforiliranih enzima acetil- i butirilkolinesteraze u slučaju trovanja pesticidima ili živčanim bojnim otrovima, ali i kao njihovi inhibitori. Kolinesteraze su vrlo važne kada je riječ o hidrolizi neurotransmitera acetilkolina čime se zaustavlja prijenos živčanih impulsa što je neophodan proces kod zdravih ljudi. Kod ljudi oboljelih od Alzheimerove bolesti javlja se deficit acetilkolina i reverzibilnom inhibicijom kolinesteraza koncentracija acetilkolina u mozgu raste čime se olakšavaju simptomi bolesti. U radu je prikazana općenita sinteza, reakcije i primjena oksima i oksimskih derivata. S obzirom na to da je poznato da oksimski derivati ulaze u aktivno mjesto kolinesteraza, odabrani oksimski eteri računalno su ispitani kao potencijalni inhibitori s ciljem određivanja termodinamičke stabilnosti kompleksa enzim-inhibitor. Na temelju računalnih predviđanja može se ciljano ići u sintezu spojeva koji su se pokazali kao dobri inhibitori. Iako inhibicija može biti i nekompetitivna te će se pravi rezultati inhibicije ili reaktivacije kolinesteraza dobiti eksperimentalnim ispitivanjem, računalna kemija općenito je vrlo korisna kod definiranja smjera sinteze novih spojeva što štedi i vrijeme i novac.

2. OPĆI DIO

2.1. KOLINESTERAZE

Početkom 1930-ih godina snižavanje razine acetilkolina (engl. *acetylcholine*, ACh) u prisutnosti krvi i tkiva pripisano je djelovanju enzima koji hidrolizira ACh. Enzim je nazvan kolinesteraza, a daljnja istraživanja pokazala su da postoje najmanje dvije vrste ovoga enzima. Imena koja se i danas odnose na njih dodijeljena su 1948. godine na sastanku Biokemijskog društva Velike Britanije, a to su acetilkolinesteraza (engl. *acetylcholinesterase*, AChE) i butirilkolinesteraza (engl. *butyrylcholinesterase*, BChE). 1961. godine kolinesterazama su dodijeljene klasifikacijske oznake enzima; EC 3.1.1.7 za AChE i EC 3.1.1.8 za BChE. Prema enzimskoj nomenklaturi kolinesteraze su hidrolaze, podskupina esteraze i daljnja podskupina hidrolaze estera karboksilnih kiselina. Mehanizam hidrolize supstrata jednak je za obje kolinesteraze. Osnovnu strukturu enzima čini 12 β-nabranih ploča i 14 α-uzvojnica. Ljudsku AChE čini oko 550, a BChE oko 570 aminokiselina. Iako su im strukture homologne, razlikuju se po katalitičkoj aktivnosti i specifičnosti vezanja supstrata, liganada i inhibitora. Kristalna struktura AChE određena je 1991. godine iz električne raže *Torpedo californica* (TcAChE), a 2000. godine je određena i kristalna struktura ljudske AChE koja je pokazala visoku sličnost s TcAChE. Kristalna struktura ljudske BChE određena je desetak godine kasnije, a njezino određivanje otežavao je veliki broj glikozilacijskih mjesta koja su otežavala kristalizaciju (slika 1). Budući da su kolinesteraze široko rasprostranjene u biljnom i životinjskom svijetu te imaju važnu ulogu i kod ljudi, istraživanje kolinesteraza aktualno je sve od otkrića do danas.[2]

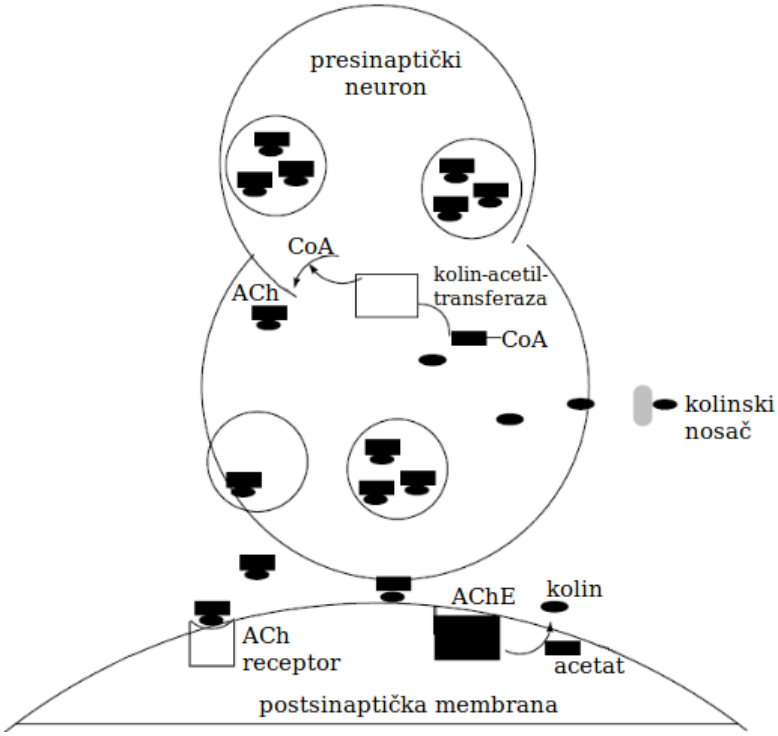


Slika 1. Kristalna struktura ljudske acetil- (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE). α-uzvojnice označene su crvenom, β-nabrane ploče plavom, a petlje zelenom bojom. Siva boja predstavlja površinu enzima koja je dostupna vodi.[2]

2.1.1. Acetilkolin

Acetilkolin (ACh) je prvi otkriveni prijenosnik živčanih impulsa, odnosno neurotransmiter koji djeluje na širokom području.[3] Kao sintetički spoj sintetiziran je 1867. godine, a 1906. je izoliran iz nadbubrežne žlijezde. Jedan je od glavnih prijenosnika električnih impulsa živčanih stanica, a osim kod neurotransmisije ima ulogu i kod adhezijskih proteina, proteina matriksa kostiju, rasta aksona i nastanka amiloidnih fibrila.[4]

Tijekom neurotransmisije dolazak živčanog impulsa uzrokuje ispuštanje ACh iz sinaptičkog mjehurića presinaptičkog neurona u sinaptičku pukotinu i veže se na acetilkolinske receptore na postsinaptičkoj membrani stanice koji mogu biti muskarinski ili nikotinski.[2,3] Vezanje ACh na receptore rezultira depolarizacijom membrane i daljnjim prijenosom živčanog impulsa. Hidrolizom ACh u aktivnom mjestu AChE ponovno se uspostavlja polarizacija membrane i prestaje prijenos signala[2] (slika 2).

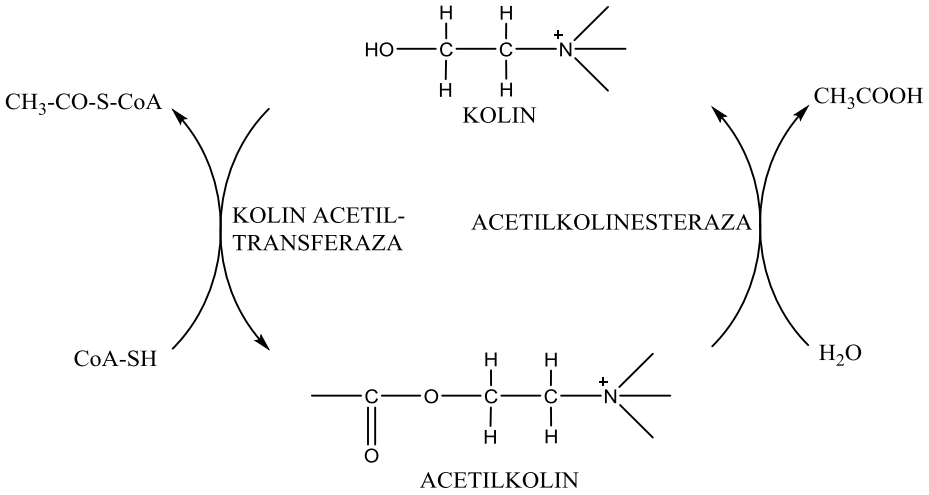


Slika 2. Put acetilkolina (ACh) do acetilkolinesteraze (AChE) tijekom neurotransmisije.[3]

Muskarinski receptori su povezani s perifernim živčanim sustavom i glatkim te srčanim mišićima. Vezanjem ACh stimulira se parasimpatički živčani sustav što rezultira smanjenim brojem otkucaja srca, snižavanjem krvnog tlaka, kontrakcijom bronhija, pojačanom salivacijom i otpuštanjem mokraće iz mjehura. Nikotinski receptori se nalaze u centralnom živčanom sustavu (engl. *Central Nervous System*, CNS) i sinapsama između živaca i skeletnih mišića.

Stimulacija receptora u CNS-u povezana je s kognitivnim procesima i pamćenjem, a u sinapsama s kontrakcijom skeletnih mišića.[4]

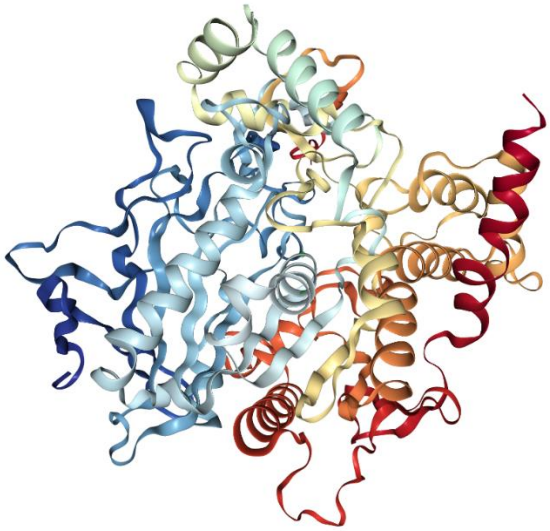
Hidroliza ACh je brza i vrijeme poluživota je kratko budući da jedna molekula AChE u sekundi hidrolizira 25 000 molekula ACh u kolin i octenu kiselinu što je nužno da se kolinergični neuron vrati u opušteno stanje nakon aktivacije. Produkt hidrolize kolin vraća se u presinaptički neuron i s acetil-koenzimom A sintetizira se novi acetilkolin što je katalizirano enzimom acetiltransferazom[3] (shema 1).



Shema 1. Shematski prikaz hidrolize i sinteze acetilkolina (ACh) tijekom neurotransmisije.[5]

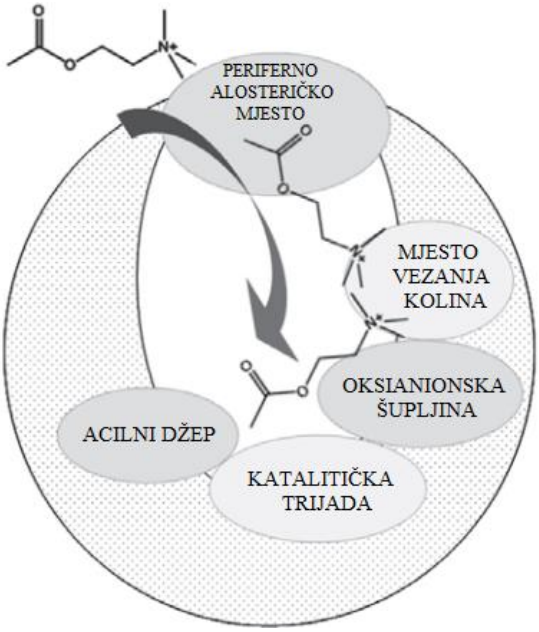
2.1.2. Acetilkolinesteraza

Acetilkolinesteraza (AChE, EC 3.1.1.7) sudjeluje u neurotransmisiji u centralnom i perifernom živčanom sustavu. Najviše se nalazi u neuronskoj sinapsi CNS-a, neuromuskularnim spojevima i eritrocitnoj membrani. Ovaj enzim zaustavlja prijenos živčanih impulsa hidrolizom neurotransmitera ACh što je neophodan proces kod zdravih ljudi budući da nakupljanje ACh dovodi do prekomjerne stimulacije i poremećaja živčanih impulsa te pojave ataksije, respiratorne paralize, napadaja, kome te na kraju i smrti.[6]



Slika 3. Kristalna struktura ljudske acetilkolinesteraze (AChE).[7]

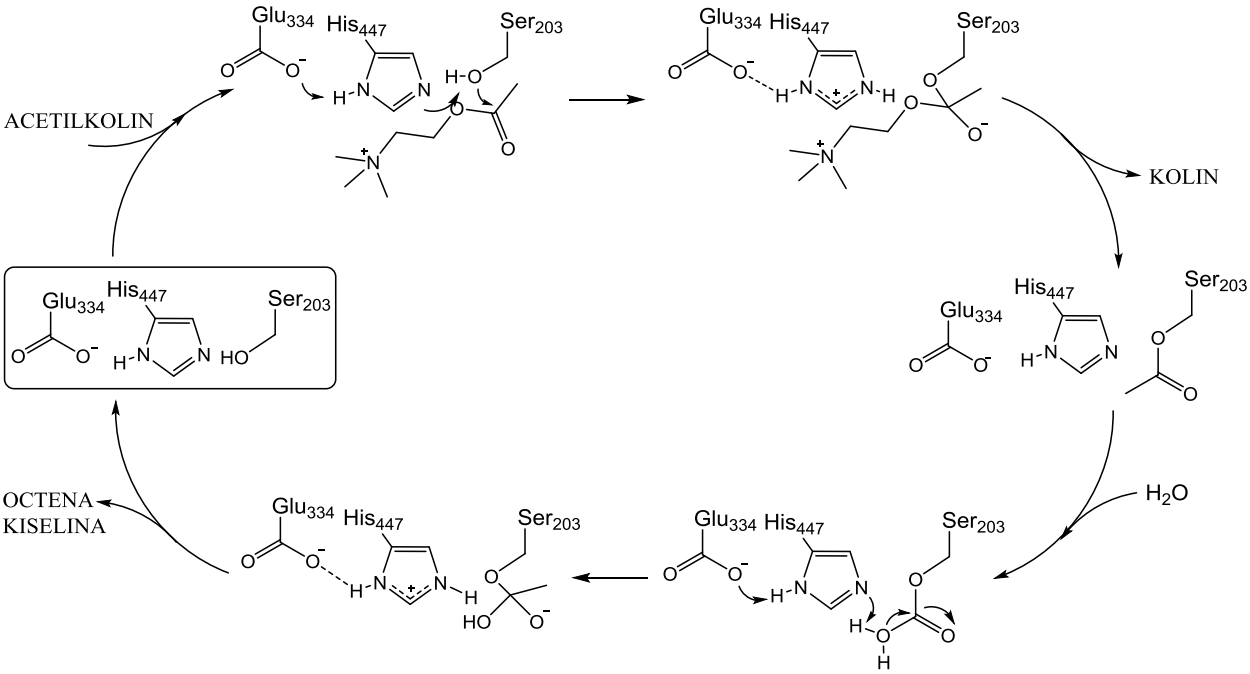
AChE ima eliptični oblik s 20 Å dubokim ždrijelom kao aktivnim mjestom, udaljeno od dna enzima 4 Å.[3] Ždrijelo je asimetrično i kolinesteraze prepoznaju svaki oblik kiralnosti (središnja, planarna, osna) prisutne na supstratu ili inhibitoru pa su ovisno o enantiomeru različiti afiniteti vezanja i brzine reakcije.[2] Aktivno mjesto podijeljeno je u dvije podjedinice: periferno anionsko mjesto (engl. *peripheral anionic site*, PAS) na ulazu u ždrijelo s aminokiselinama Tyr72, Tyr124 i Trp286 i katalitičko mjesto (engl. *catalitic site*, CAS) blizu dna ždrijela. CAS čine vezno mjesto kolina (Trp86, Tyr337, Phe338), oksianionska šupljina (Gly121, Gly122, Ala204), katalitička trijada (Ser203, His447, Glu334) i acilni džep (Phe228, Phe290).[8] Raspored podjedinica prikazan je na slici 4.



Slika 4. Ulazak acetilkolina u aktivno mjesto kolinesteraza s više strukturnih domena.[2]

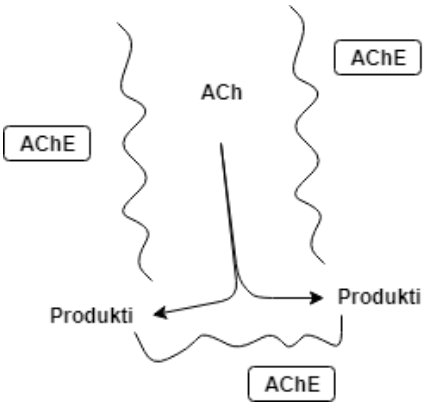
PAS podjedinica je nenabijena i lipofilna te veže pozitivno nabijeni kvaterni *N* atom acetilkolina ili kompetitivne inhibitore s pozitivnim kvaternim *N* atomom, kao i kvaterne oksime koji uspješno reaktiviraju AChE inhibiranu organofosfatima. Supstrati stvaraju interakcije pomoću 14 aromatskih aminokiselina koje vode prema CAS gdje se odvija hidroliza ACh. Najvažnijom aromatskom aminokiselinom smatra se Trp84 jer je njegovom zamjenom alifatskim alaninom enzimska aktivnost značajno smanjena.[3]

Budući da je ljudska AChE visoko homologna s TcAChE, na TcAChE se provode *in vitro* ispitivanja.[4] Kristalna struktura TcAChE određena X-zrakama pokazuje katalitičku trijadu Ser200, His440, Glu327 u aktivnom mjestu enzima. Na početku ždrijela aktivnog mjesta nalaze se ostaci aromatskih aminokiselina kao što su od Trp, Phe i His koji sudjeluju u *π*-*π* interakcijama s pozitivno nabijenim krajem acetilkolina i tako pomažu supstratu da prođe u aktivno mjesto.[5] Za cijepanje acilne skupine ACh i nastajanje kolina odgovoran je aminokiselinski ostatak serina. Acilna skupina supstrata prenosi se na serinski ostatak i nastaje prijelazno stanje serin-supstrat. Acilirani enzim napada molekula vode čime se oslobađa octena kiselina, a enzim se regenerira (shema 2). [2,9]



Shema 2. Reakcijski stupnjevi hidrolize acetilkolina katalizirane acetilkolinesterazom.[2]

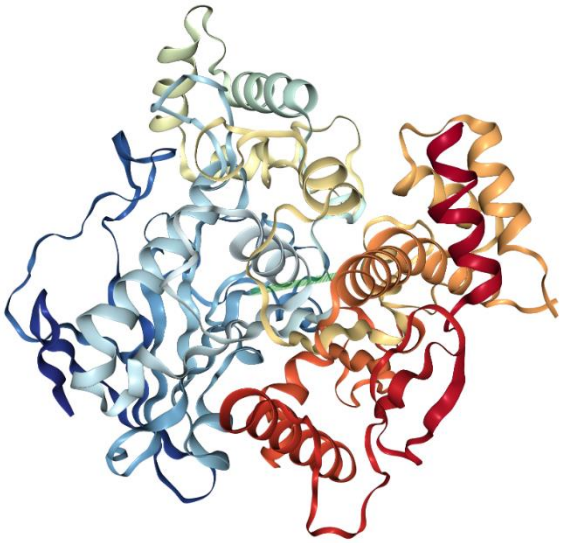
Nakon hidrolize, prema predloženom mehanizmu produkti izlaze iz enzima kroz kanal na dnu ždrijela, a novi supstrat može ulaziti s gornje strane (slika 5).[4]



Slika 5. Otpuštanje produkata hidrolize acetilkolina (ACh) s dna ždrijela acetilkolinesteraze (AChE).[4]

2.1.3. Butirilkolinesteraza

Butirilkolinesteraza (BChE, EC 3.1.1.8) je enzim analogan AChE s oko 65% sličnog slijeda aminokiselina, ali preferirano hidrolizira butirilkolin ili benzilkolin koji su strukturno veći od acetilkolina. Često se naziva i plazmatski enzim, a najviše se nalazi u jetri te krvnom serumu, bubrezima, srcu i plućima. BChE je poznata kao „sakupljač“ raznih štetnih tvari, kao što su toksični organofosfati ili karbamati koji se koriste kao insekticidi, čime sprječava inhibiciju AChE, ali može i hidrolizirati lijekove koji sadrže esterske skupine.[9,10]



Slika 6. Kristalna struktura ljudske butirilkolinesteraze (BChE).[11]

Dok je AChE visoko specifična za hidrolizu ACh i ne može hidrolizirati supstrate veće od propionilkolina, BChE može hidrolizirati puno širi spektar estera i velike neutralne estere (heroin, kokain i dr.) ili negativno nabijene kao što je aspirin.[2] Osim u plazmi nalazi se i u

CNS-u pa je za pretpostaviti da sudjeluje u živčanim funkcijama. Istraživanja su pokazala da BChE igra važnu ulogu kod hidrolize acetilkolina kada je AChE potrošena pa ima ulogu koregulatora kolinergične transmisije.[8,12] AChE je izražena kod hipokampusa, u motoričkom, premotoričkom i neokortikalnom području cerebralnog korteksa, a BChE u manjim koncentracijama u hipokampusu i temporalnom neokorteksu.[12]

Katalitičku trijadu ljudske BChE (HuBChE) čine Ser198, His438 i Glu325, a glavna razlika između HuBChE i TcAChE je u PAS podjedinici i acilnom džepu CAS podjedinice. Kod HuBChE Phe288 i Phe290 od TcAChE zamijenjene su s Leu286 i Val288 koje su alifatske aminokiseline manjih dimenzija od aromatskih Phe pa je acilni džep kod HuBChE veći što omogućava ulazak većih supstrata u aktivno mjesto. Aminokiseline Tyr70, Tyr121 i Trp279 u PAS podjedinici TcAChE kod HuBChE su zamijenjene alifatskim aminokiselinama.[4]

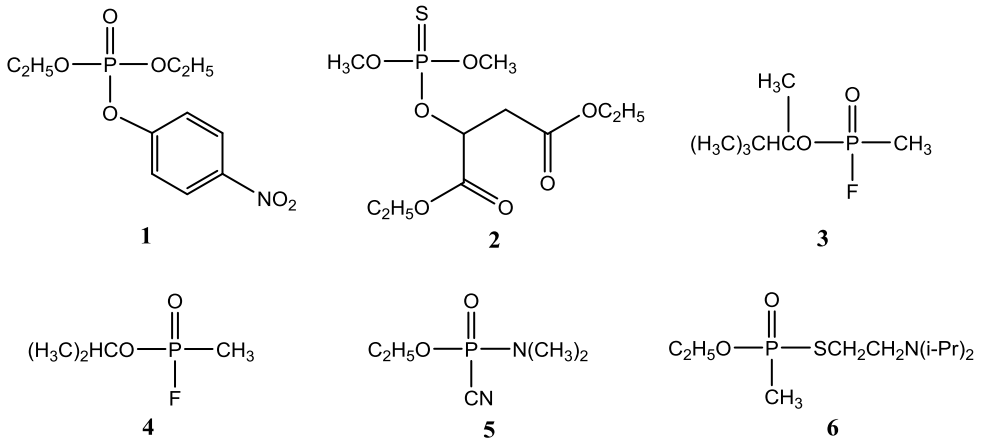
2.1.4. Inhibicija kolinesteraza

Inhibitori mogu stvarati interakcije s PAS ili CAS podjedinicom ili s obje istovremeno.[8] Kolinesteraze mogu inhibirati reverzibilni inhibitori koji inhibiraju enzim određeno vrijeme nakon čega se on spontano reaktivira ili ireverzibilni inhibitori koji se kovalentno vežu. Reverzibilni inhibitori imaju terapeutski, a ireverzibilni toksični učinak.[3] Inhibicija AChE detaljnije je istraživana od inhibicije BChE, no sve više se pažnje posvećuje se i BChE.

Ireverzibilna inhibicija

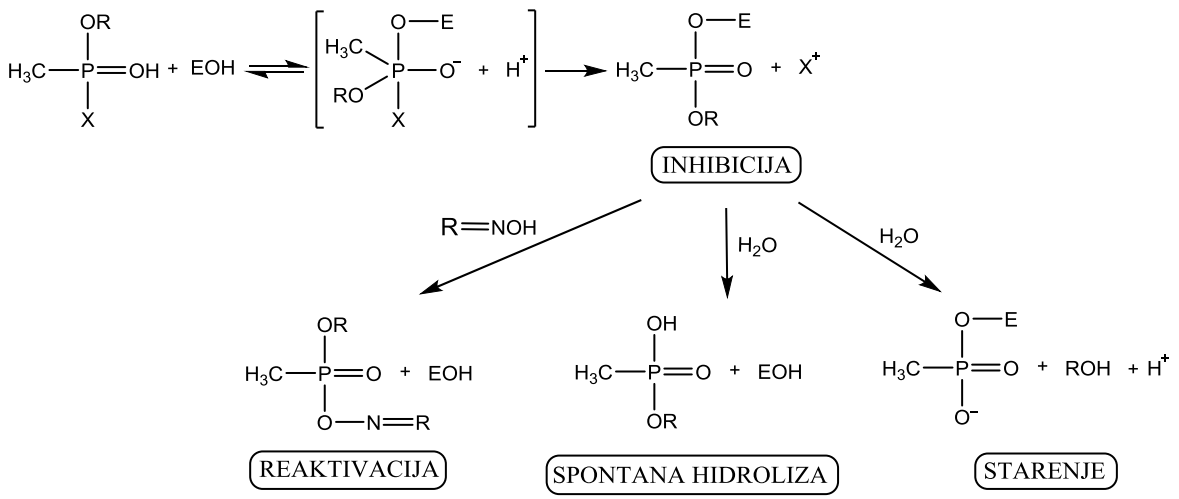
Trovanje neurotoksičnim organofosfatima može biti uzrokovano nekim poljoprivrednim pesticidima kao što su paraokson **1** ili malation **2**.[9] Organofosfati čine oko 40% pesticida na tržištu, a nepravilna upotreba uzrokuje trovanje ljudi i životinja te štetno djelovanje na okoliš. Njihova štetnost ovisi o vremenu izloženosti, koncentraciji i tipu organofosfata, odnosno funkcionalnim grupama vezanih za fosfor.[13] Do trovanja može doći udisanjem, gutanjem ili apsorpcijom kroz kožu. Organofosfati se koriste i kao insekticidi u poljoprivredi i kućanstvu, no djeluju i na druga živa bića i ljude.[3] Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji godišnje se organofosfatnim pesticidima otruje oko 220 000 ljudi, a 20 000 trovanja završi smrtno. Najveću opasnost od organofosfata predstavlja kemijsko oružje poput somana **3**, sarina **4**, tabuna **5** i VX **6**. Korištenje kemijskog oružja zabranjeno je od strane Ujedinjenih Naroda, ali njima se mogu koristiti terorističke organizacije i države koje nisu potpisale Konvenciju o kemijskom oružju

Organizacije za zabranu kemijskog oružja (engl. *Organization for the prohibition of Chemical Weapons*, OPCW). Na slici 7 prikazane su strukture spomenutih organofosfata.[9]



Slika 7. Strukture neurotoksičnih organofosfata.[9]

Organofosfati su supstrati analogni acetilkolinu i vežu se na hidroksilnu skupinu serina u aktivnom mjestu enzima. Spontana defosforilacija je vrlo spora (danima) što dovodi do nakupljanja ACh u sinaptičkoj pukotini čime su muskarinski i nikotinski receptori prestimulirani i onemogućena je normalna neurotransmisija. Simptomi su uznemirenost, slabljenje i trzaji mišića, mioza, hipersalivacija, znojenje, grčenje, zatajenje dišnog sustava, nesvjestica i/ili smrt.[3] Trovanje organofosfatima uzrokuje inhibiciju AChE što je najčešće smrtonosno, dok inhibicija BChE ne djeluje na normalne tjelesne funkcije.[14] Karbamati pokazuju slične simptome trovanja kao i organofosfati, ali se karbamati smatraju reverzibilnim inhibitorima budući da se kompleksi s AChE mogu spontano hidrolizirati tijekom 30-40 minuta. Organofosfatni kompleksi s AChE su stabilniji i ireverzibilno inhibiraju AChE, no enzim se može reaktivirati oksimima ukoliko se dovoljno brzo djeluje, odnosno prije dealkiliranja kompleksa enzim-organofosfat. Na shemi 3 prikazana je inhibicija AChE organofosfatima, reaktivacija oksimima koji nukleofilno napadaju organofosfatnu skupinu, spontana hidroliza i starenje, odnosno dealkiliranje.[3]



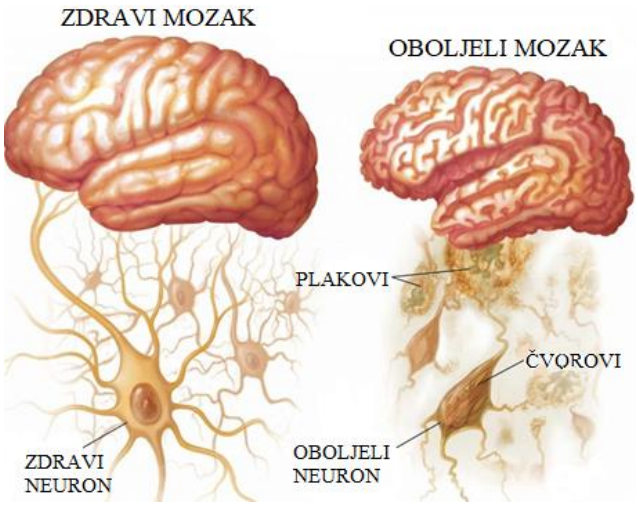
Shema 3. Mehanizam inhibicije enzima acetilkolinesteraze (EOH) organofosfatima i reaktivacija, spontana hidroliza te starenje fosforilanog enzima.[3]

Osim toksičnih djelovanja, organofosfati su korišteni i kao terapeutici kod očne bolesti kroničnog glaukoma kod koje je optički živac oštećen i povećan je očni tlak što može dovesti do gubitka vida ukoliko se pravovremeno ne liječi.[3]

Reverzibilna inhibicija

Reverzibilni inhibitori se koriste kao terapeutici za mijasteniju gravis, Alzheimerovu bolest, postoperativni ileus, rastegnutost mjehura, glaukom i kao protuotrov antikolinergičnog predoziranja.[3]

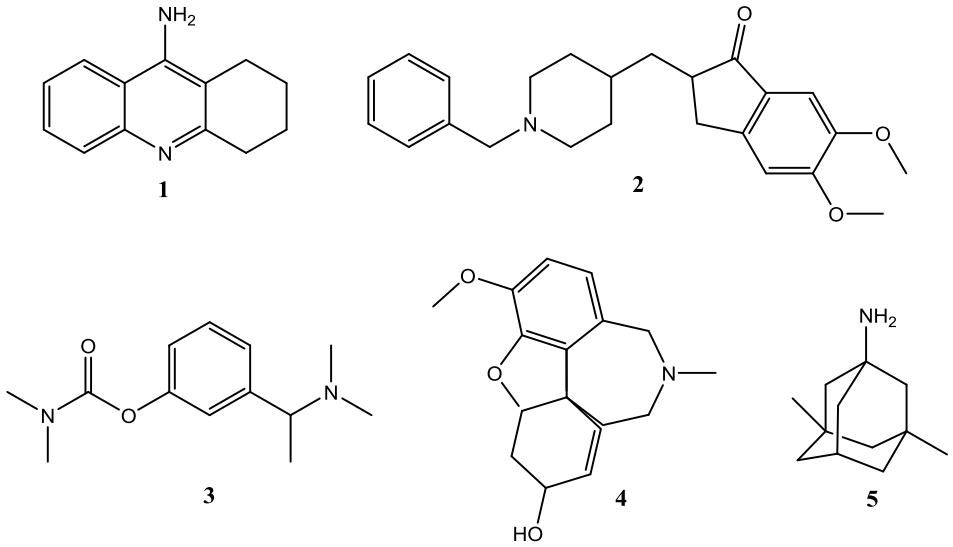
Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer's disease*, AD) je kronični, progresivni i degenerativni poremećaj mozga koji se očituje u poremećajima kognitivnih funkcija, osobito pamćenja. Najčešći je oblik demencije kod starijih osoba, a u svijetu je 2013. godine registrirano 44,4 milijuna oboljelih. Do 2050. godine se procjenjuje da će broj oboljelih narasti preko 115 milijuna. Patogeneza Alzheimerove bolesti je složena i povezana s disfunkcijom više sistema u tijelu pa je prevencija i liječenje bolesti još uvijek neostvarivo te je moguće samo smanjenje simptoma.[15] Prvi simptomi su slabljenje kognitivnih funkcija, promjene u ponašanju i smanjena sposobnost izvođenja svakodnevnih aktivnosti.[16] Kod bolesti je neuravnotežen prijenos živčanih impulsa, odnosno javlja se deficit acetilkolina. Bolest je neizlječiva, a princip smanjenja simptoma je inhibicija AChE čime se smanjuje hidroliza ACh i njegova koncentracija u mozgu raste.[13] Osim kolinergičke disfunkcije bolest je uzrokovana i nakupljanjem amiloidnih-β peptida u izvanstanične senilne plakove i hiperfosforilacijom τ proteina što dovodi do formiranja unutarstaničnih neurofibralnih čvorova (slika 8). [12]



Slika 8. Razlika između zdravog mozga i mozga s Alzheimerovom bolesti.[17]

Sve brojnija su istraživanja koja upućuju na to da je inhibicija hiperfosforiliranja τ proteina obećavajuća strategija za Alzheimerovu bolest.[18] AChE je odgovorna za otpuštanje prekursora amiloidnog-β proteina, a BChE stvara amiloidni-Aβ protein i inducira njegovo nakupljanje u amiloidne-β plakove.[6] Kod AD je utvrđeno da aktivnost AChE opada, dok aktivnost BChE ostaje nepromijenjena ili se povećava što pokazuje da značaj BChE kod hidrolize acetilkolina tijekom bolesti raste i BChE ima značajnu ulogu kod razvoja bolesti. *In vivo* istraživanja na miševima pokazala su da se kod miša s Alzheimerovom bolesti kod kojeg je izolirana BChE značajno smanjila količina amiloidnog plaka u usporedbi s mišem koji ima bolest s normalno prisutnom BChE.[12]

Preko 40% lijekova za AD na tržištu 2011. godine djelovalo je kao reverzibilni inhibitori kolinesteraza prilikom čega se privremeno poboljšavaju kognitivne funkcije zbog porasta razine acetilkolina u mozgu. Tijekom 30 godina istraživanja (1984-2014.) samo je pet lijekova odobreno za AD: takrin **1**, donepezil **2**, rivastigmin **3** i galantamin **4** u razdoblju 1993-2000. koji su inhibitori kolinesteraza te memantin **5** 2002. godine koji je antagonist NMDA receptora.[12] Takrin je prvi odobreni lijek, ali je izbačen iz upotrebe zbog hepatoksičnosti.[3] Donepezil (s najmanjim gastrointestinalnim nuspojavama)[3] i galantamin su selektivni AChE inhibitori, a rivastigmin inhibira i BChE.[12] Nijedan lijek nije selektivni inhibitor BChE budući da u vrijeme kada su lijekovi prihvaćeni kao službeni uloga BChE je bila nedovoljno istražena. Nedavna klinička istraživanja pokazala su da selektivni inhibitori BChE imaju bolji utjecaj od inhibitora AChE kod uznapredovale bolesti.[12] Na slici 9 prikazane su strukture spomenutih lijekova.



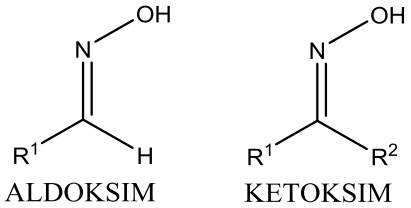
Slika 9. Strukture odobrenih lijekova za ublažavanje Alzheimerove bolesti.[12]

Lijekovi na tržištu za inhibiciju kolinesteraza imaju nuspojave tijekom dugotrajnog uzimanja.[6] Noviji lijekovi koji su došli do kliničkih ispitivanja za metu djelovanja imaju amiloidnu agregaciju ili stvaranje neurofibrilnog zapleta povezanog s poremećajem fosforiliranja τ proteina. Mnogi nisu zadovoljili ispitivanja, a jedan od problema je preselektivno djelovanje na samo jednu metu dok je bolest uzrokovana višestrukim faktorima. Noviji pristup podrazumijeva kombinaciju više lijekova u tzv. „koktelima“, no to predstavlja opasnost od interferencija s drugim lijekovima koje bolesnik uzima. Problematični su i bioraspoloživost te metabolizam lijekova.[15]

2.2. OKSIMI

2.2.1. Općenito

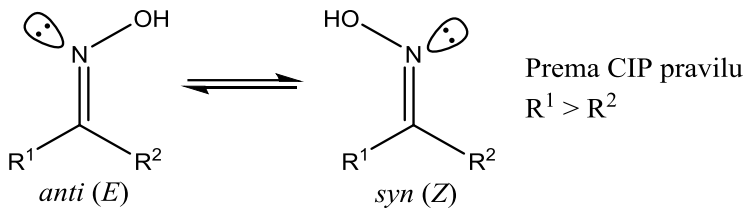
Oksimi su klasa spojeva opće formule $R_1R_2C{=}N{-}OH$, gdje je R_1 organski alifatski ili (hetero)arilni supstituent, a R_2 organski supstituent ili vodikov atom. Ovisno o supstituentima, oksimi se dijele na aldoksime i ketoksime (slika 10).[19]



Slika 10. Opća struktura aldoksima i ketoksima.

Pojam oksim (engl. *oxime*) potječe iz 19. stoljeća od imena kisik (engl. *oxygen*) i imid. Prvi poznati oksim je metilglioksim sintetiziran 1882. godine.[20] Tijekom 1960-ih godina oksimi su identificirani u biljkama kao intermedijeri u biosintezi specijaliziranih klasa metabolita cijanogeni glukozidi[21] i glukozinolati.[22,23] Ove klase prirodnih spojeva poznate su kao dio obrambenog sustava protiv biljojeda i štetočina.[24]

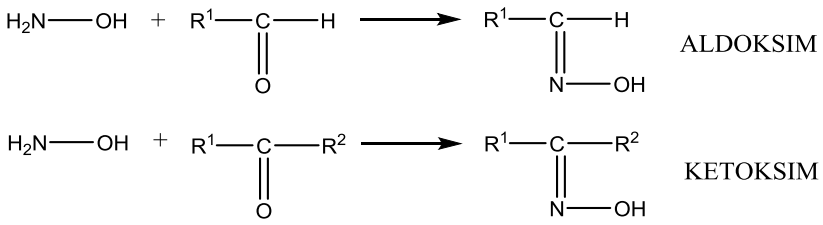
Kada se R^1 i R^2 razlikuju moguća su dva izomera – *syn* (*Z*) i *anti* (*E*) (shema 4). Aldoksimi, izuzev aromatskih, su najčešće *syn*,[25] a ketoksimi podjednako i *syn* i *anti*. Većina oksima je blago amfoternog karaktera[26,27] zbog blago kisele hidroksilne skupine i blago bazičnog *N* atoma.[19] U čvrstom stanju su oba izomera stabilna, a u otopini se uspostavlja ravnoteža prema termodinamički stabilnijem izomeru.[28,29] Derivati oksimski eteri i esteri su uglavnom stabilni u otopini,[30] ali *E*/*Z* izomerizacija može biti potaknuta kiselinama[31] ili zračenjem.[32]



Shema 4. Ravnoteža između izomera ketoksima.[19]

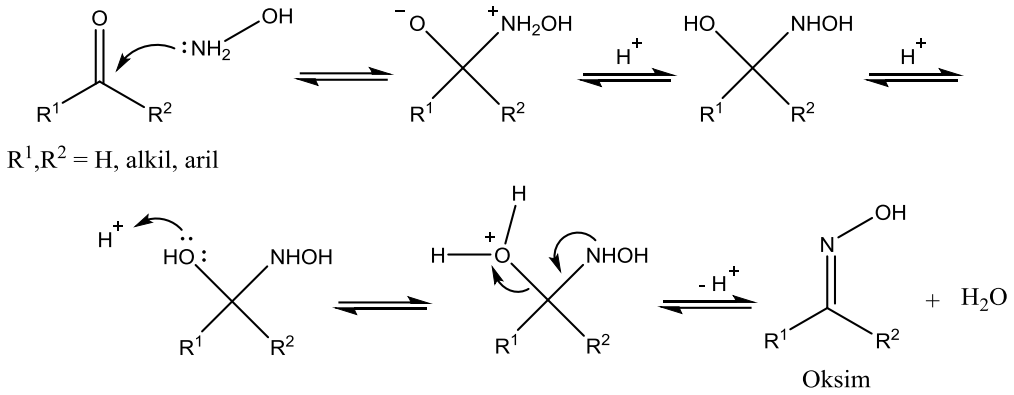
2.2.2. Sinteza

Sinteza oksima ide iz hidroksilamina i aldehida ili ketona (shema 5).[33] Kondenzacija primarnog amina s $R_1R_2C{=}O$ prvi put se spominje 1864. godine od kada se provode brojna istraživanja ovih reakcija. Hidroksilamin najčešće je dostupan kao sol, hidroklorid ili sulfat, a vodena otopina soli prije sinteze oksima tretira se natrijevim acetatom ili hidroksidom kako bi se oslobodila baza.[19]



Shema 5. Općenita sinteza oksima.[33]

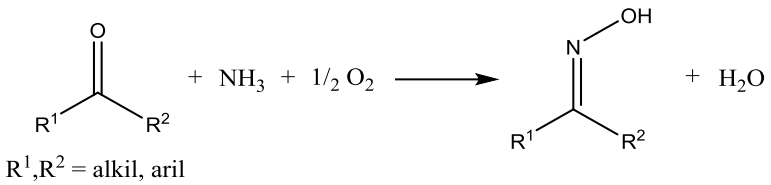
Kada se koristi hidroksilamin uz oksim nastaje i voda (shema 6). Nastajanju oksima prethodi intermedijer što pokazuje IR spektar budući da se C=N signal na 1400 cm^{-1} slabo vidi dok se potpuno ne izgubi signal na 1710 cm^{-1} koji odgovara C=O.[19]



Shema 6. Mehanizam sinteze oksima.[19]

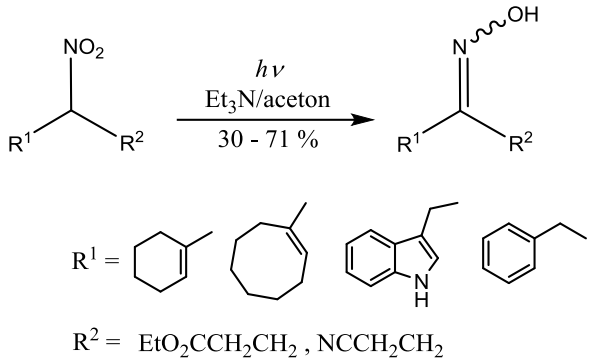
Oksimi su visoko kristalinični spojevi i korisni su kod karakterizacije i pročišćavanja karbonilnih spojeva.[34] Nečisti aldehidi i ketoni prevode se u oksime i nakon rekristalizacije hidroliziraju sulfatnom kiselinom kako bi opet nastao aldehid ili keton.[19]

U industrijskim procesima ketoksimi su umjesto iz ketona i hidroksilamina sintetizirani iz ketona i amonijaka uz kisik (shema 7). Amonijak se oksidira u NO ili NO_2 nakon čega ide redukcija s H_2 ili SO_2 i nastaju ketoksim i voda. Reakcija se provodi pri sniženom tlaku i visokim temperaturama (>800 °C) uz Pt kao katalizator.[19]



Shema 7. Sinteza ketoksima uz amonijak.[19]

Oksimi se mogu dobiti i redukcijom nitro spojeva, a može se primijeniti i fotokemijski pristup tako da se nitro spoj otopljen u smjesi Et_3N/aceton ozrači čime se ovisno o supstituentima dobiju oksimi u različitim iskorištenjima (shema 8).[19]

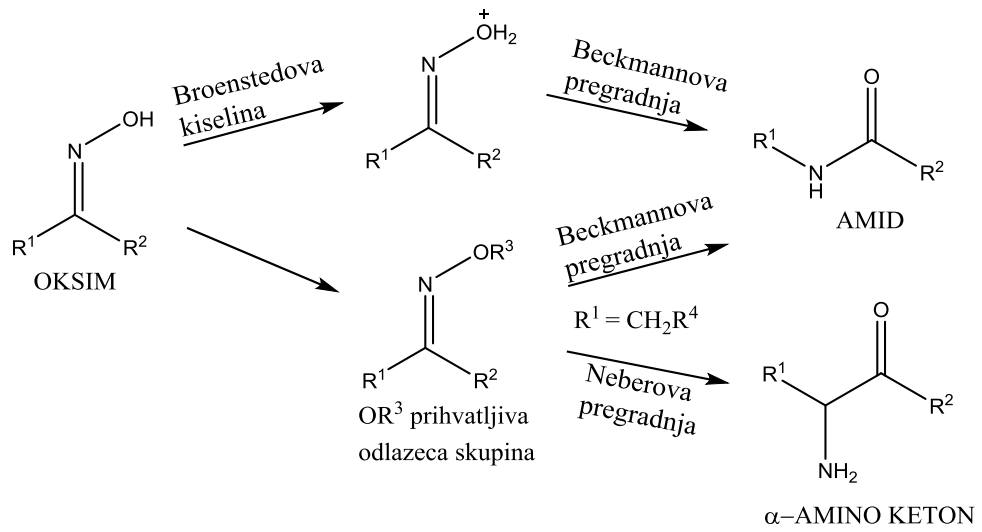


Shema 8. Sinteza oksima redukcijom nitro-spoja.[19]

2.2.3. Reakcije oksima i njihovih derivata

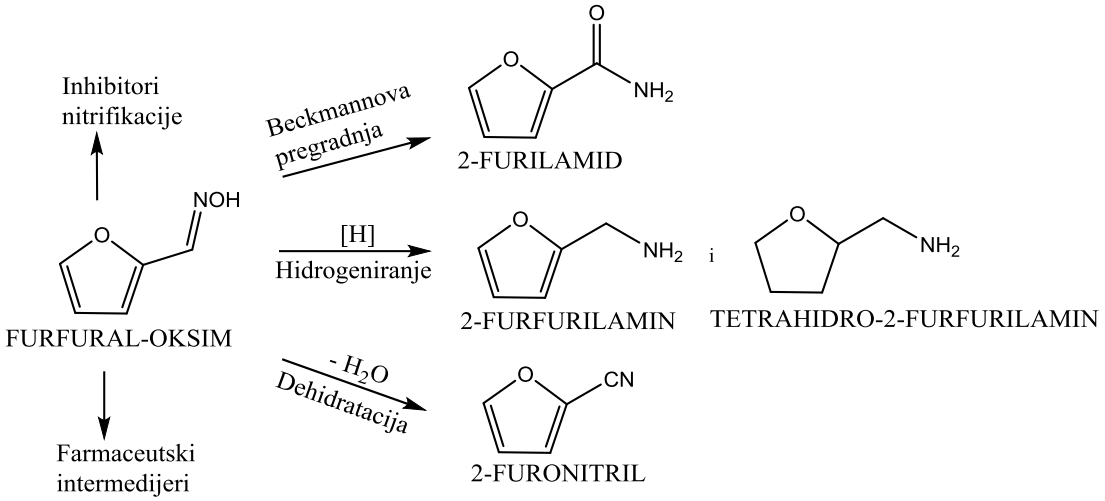
Oksimi i njihovi derivati su široko upotrebljavani u organskoj sintezi te su predmet brojnih istraživanja i imaju zanimljivu biološku aktivnost.[16-26] Neke od sintetskih primjena[34] su konverzija u nitrile,[46] nitro spojeve,[47,48] nitrone,[49] amine[50] i azaheterocikličke spojeve. [51]

Koriste se i kao intermedijeri u sintezi amida Beckmannovom pregradnjom[34,52,53] Iako je *N-O* veza relativno slaba što je nužno za pregradnju, *N-OH* nije dobra odlazeća skupina pa su oksimi dosta stabilni i ne pregrađuju se spontano, već je nužna pretvorba u bolje odlazeću skupinu. Beckmannova i Neberova pregradnja su klasične reakcije pregradnje oksima i njihovih derivata (shema 9). Beckmannova pregradnja oksima i oksimskih estera ide u kiselim, neutralnim pa i bazičnim uvjetima, dok Neberova isključivo s *O*-oksimskim esterima u bazičnim uvjetima. Beckmannova pregradnja je stereospecifična, dok kod Neberove stereokemija početnog spoja ne utječe na produkt. Kod cikličkih oksima Beckmannovom pregradnjom nastaju dušikovi heterocikli.[30]



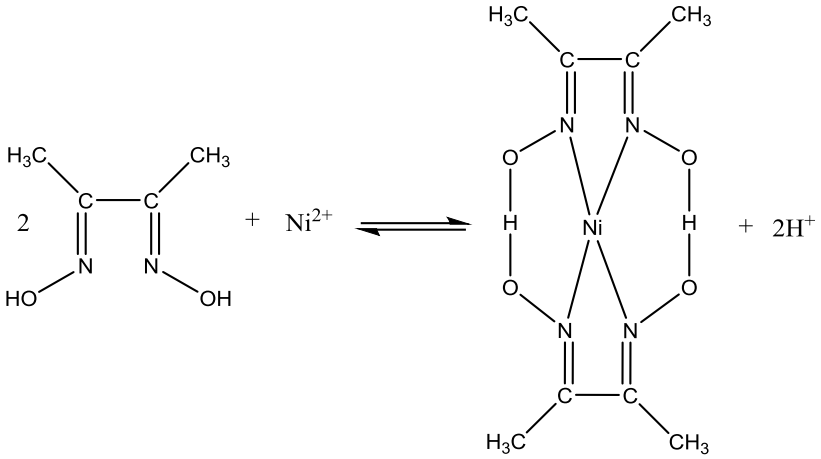
Shema 9. Beckmannova i Neberova pregradnja oksima.[30]

Furfural-oksim je važan intermedijer kod proizvodnje biološki aktivnih spojeva. Na shemi 10 prikazano je za sintezu kojih spojeva se koristi kao polazni spoj. Furfural oksim i njegovi derivati koriste se u poljoprivredi kao inhibitori nitrifikacije djelujući na nitrobakterije.[54–56]



Shema 10. Potencijalna primjena furfural-oksima.[54]

U anorganskoj kemiji oksimi se uglavnom koriste za određivanje metala, a neke metode omogućavaju i određivanje polumetala i nemetala. U Rječniku analitičkih reagenasa[57] oksimi su reagensi u klasičnim analizama i koriste se za prekoncentriranje, separaciju, derivatizaciju i određivanje analita instrumentalnim tehnikama.[58] Općenito, mogu koordinirati metale putem slobodnih elektronskih parova *N-OH* skupine ili intramolekulski kompleksiraju uključujući elektron donorska mjesta drugih skupina pa nastaju kelati. Bezbojni dimetilglioksim (DMG, *Chugaev's reagent*) sa zelenom vodenom otopinom Ni^{II} stvara jarko crveni kompleks uz deprotonaciju oksima (shema 11). U upotrebi su još brojni mono-, di- i trioksimi.[58]



Shema 11. Nastajanje kompleksa oksima s niklom.[58]

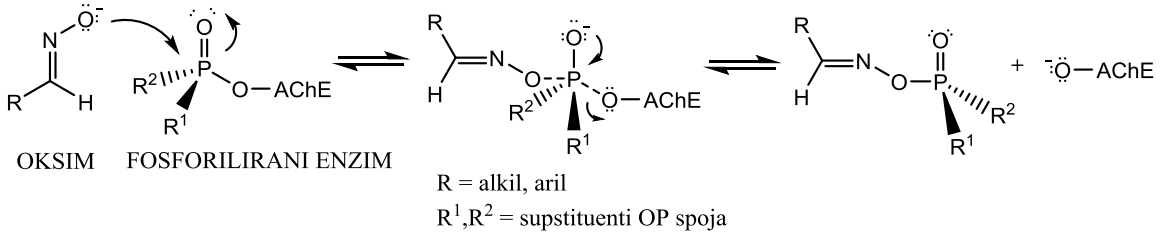
2.2.4. Primjena (terapeutski učinak)

Količina informacija o svojstvima oksima i njihovih derivata, kao i o biološkoj aktivnosti te potencijalnoj primjeni neprestano raste. Proučavanje oksimskih etera interesantno je zbog antiprotozoarne, antibakterijske, antienterovirusne, antifungalne, antineoplastične, antikonvulzivne i antimikrobiološke aktivnosti.[59–64] Posljednjih godina oksimski eteri imaju široku primjenu[65] kao nesteroidni protuupalni lijekovi, [60] beta adrenergički lijekovi,[61] inhibitori plijesni[62] i regulatori staničnog rasta.[64] Razni oksimski derivati pokazali su i antikolinergičnu, insekticidalnu i akaricidnu aktivnost.[66–69]

Oksimi su pokazali dobra svojstva i kod neurodegenerativnih bolesti i ateroskleroze. Jedan od ključnih molekularnih puteva kod neurodegenerativnih bolesti je nepravilna agregacija i akumulacija proteina u neuronima. Kloroksimski derivati, npr. bimoklomol i arimoklomol, potiču ekspresiju proteina toplinskog šoka i poboljšavaju normalno smatanje proteina te degradaciju krivo smotanih.[70] Inhibicija enzima lipoprotein-vezana fosfolipaza A2 (Lp-PLA2) povezana je s prevencijom i liječenjem ateroskleroze.[71,72] Ciljana sinteza inhibitora je otežana zbog nerazjašnjene 3D strukture enzima, no poznato je da aktivno mjesto čini katalitička trijada (His, Asp, Glu)[73] i neki oksimski derivati pokazuju zadovoljavajuću inhibiciju kod ljudske plazme kao izvora Lp-PLA2.[74]

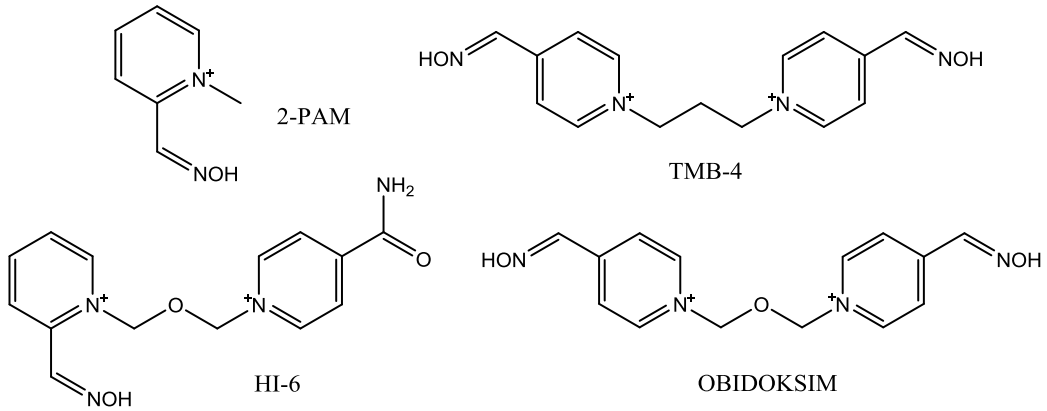
Značajna primjena oksima je pri terapiji trovanja organofosfatima. Oksimi reaktiviraju organofosfatima inhibiranu AChE što može biti uzrokovano izlaganjem pesticidima ili bojnim živčanim otrovima. Jedan od glavnih preduvjeta reaktivacije je prikladna orijentacija u aktivnom mjestu enzima,[14,75,76] a važni su i odgovarajuća struktura, pK_a oksimata ~7-8,

odgovarajući pH, temperatura, tlak (hidrostatski, osmotski) i viskoznost medija.[77] U nekim slučajevima reaktivirana AChE može biti reinhibirana fosforiliranim oksimom koji može biti moćniji inhibitor od početnog organofosfata[78] pa oksimi kao reaktivatori moraju imati visoki afinitet prema fosforiliranim kolinesterazama, a slabi za reinhibicijom.[14] Za sada nije pronađen bolji nukleofil od oksimske skupine koji bi pri fiziološkom pH mogao pocijepati vezu između enzima i živčanog otrova.[79,80] Kod reaktivacije oksimi djeluju kao nukleofili i napadaju elektrofilni fosforov atom čime se cijepa veza između fosforovog atoma i serina te nastaje slobodan enzim i fosfilirani oksim[81,82] (shema 12).[83]



Shema 12. Mehanizam reaktivacije fosforilirane AChE oksimom.[83]

Vrlo važno je razmotriti i krvno-moždanu barijeru koju oksimi moraju proći kako bi učinkovito djelovali na AChE i reaktivirali ju.[9] Za medicinsku upotrebu odobreni oksimi su pralidoksim (2-PAM), HI-6, obidoksim i trimedoksim (TMB-4) (slika 11).[83–85] Iako se većina istraživanja i razvoja temelji na spojevima s pozitivnim *N* atomom piridinskog prstena, nabijeni oksimi imaju slabu mogućnost prolaska krvno-moždane barijere pa se istražuju nenabijeni alifatski oksimi koji bi mogli poboljšati reaktivaciju inhibirane AChE organofosfatima.[86–91] Nabijeni oksimi djeluju uglavnom na periferni živčani sustav i njihova koncentracija u mozgu ne prelazi 10% njihove koncentracije u plazmi pa reaktiviraju tek mali dio inhibirane AChE u mozgu.[92] Kao terapija pri trovanju organofosfatima primjenjuje se kombinacija antikolinergika (atropin), oksima i antikonvulziva (diazepam)[93,94] i mora se primijeniti u što kraćem roku.[83]



Slika 11. Strukture kliničkih oksima kao reaktivatora kolinesteraza.[83]

S obzirom na to da još uvijek ne postoji oksim koji je univerzalni reaktivator i dovoljno jaki nukleofil da reaktivira i ostarjeli kompleks enzim-organofosfat, sinteza novih boljih oksima je od stalnog interesa. Oksimi mogu biti toksični i interferirati s drugim makromolekulama u organizmu što dodatno ograničava njihovu primjenu kod trovanja organofosfatnim spojevima.[95,96] Većina dizajniranih oksima su reaktivatori AChE, dok je vrlo malo onih za BChE koja je prirodni čistač organizma i pronalazak učinkovitog reaktivatora bio bi vrlo koristan za preventivne svrhe.[83]

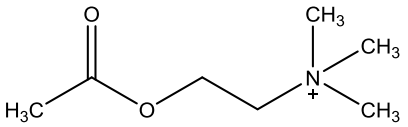
Budući da mogu ući u aktivno mjesto enzima, oksimi mogu biti i reverzibilni inhibitori AChE i BChE. Reverzibilna inhibicija omogućuje preventivnu primjenu u okolnostima izlaganja organofosfatima, posebno kada su u pitanju oni kod kojih je reaktivacija onemogućena (npr. tabun, soman), ali omogućuje i smanjenje simptoma Alzheimerove bolesti budući da se inhibicijom enzima razina acetilkolina povećava.[14]

Osim u ljudskoj upotrebi oksimi imaju važnu ulogu kod metabolizma biljaka kao intermedijeri ili krajnji produkti, a (*E*)-oksimi pokazali su se kao biološki aktivniji od (*Z*)-oksima. Oksimi i derivati imaju važnu ulogu kod regulacije rasta, obrane, privlačenja za oprašivanje i komunikacije biljaka s okolišem u obliku hlapljivih organskih spojeva.[97,98] Većina oksima u biljkama isparava, a kada su produkti biosinteze najčešće su konvertirani u odgovarajuće alkohole, aldehide ili karboksilne kiseline. Mogu biti i gasitelji reaktivnih kisikovih vrsta i kao spremnik reduciranog dušika koji se može po potrebi otpustiti. U mnogim biljnim vrstama uloge i metabolizam oksima su nerazjašnjeni. Tijekom posljednjih 40-ak godina iz biljaka su izolirani razni oksimi i oksimski eteri. Većinom su derivati aminokiselina jednostavnih struktura, a kompleksniji koji nisu izravni derivati aminokiselina su rijetko prisutni u biljkama.[24]

3. REZULTATI I RASPRAVA

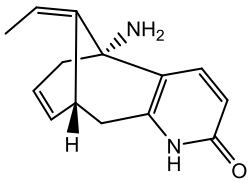
3.1. UVOD

Kao što je već opisano, acetilkolin (slika 1) vrlo je važan kod normalnog prijenosa živčanih impulsa te samim time za normalno funkcioniranje organizma i zdravlje čovjeka. Iako je prisutnost ACh važna, prekomjerno nakupljanje ima negativne posljedice što je spriječeno zahvaljujući AChE koja ga hidrolizira. Kod oboljelih od Alzheimerove bolesti razina ACh je niža od normalne pa je terapeutski pristup za smanjenje simptoma bolesti reverzibilna inhibicija AChE čime koncentracija acetilkolina raste.



Slika 1. Struktura acetilkolina.

Prvi otkriveni inhibitori AChE bili su alkaloidi koji su analogno ACh imali pozitivno nabijeni *N* atom koji se vezao za anionsko mjesto aktivnog mjesta što je smatrano važnim za inhibiciju. Kasnije je otkriveno kako i neutralni nealkaloidni spojevi mogu biti inhibitori vezujući se za druge položaje aktivnog mjesta.[4] Na slici 2 prikazana je struktura huperzina A (Hup A), alkaloida koji je izoliran iz kineske biljke *Huperzia serrata*, a koji se pokazao kao moćan i visoko specifični reverzibilni inhibitor AChE. Biljka *Huperzia serrata* stoljećima se koristi u Kini u terapiji nagnječenja, naprezanja, oticanja i shizofrenije, a osnovni skelet huperzina A čini aril-biciklo[3.3.1]-dienski sustav.[99]

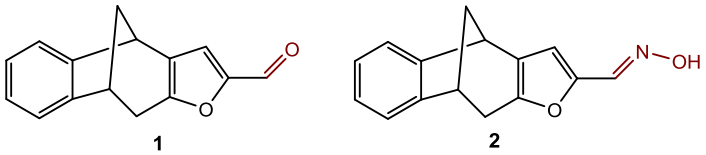


Slika 2. Struktura huperzina A.

U Kini je odobren kao terapeutik za Alzheimerovu bolest i u usporedbi s prije spomenutim takrinom, donepezilom, rivastigminom i galantaminom pokazao se kao jednako ili bolje učinkovit s dužim trajanjem.[99]

Benzobiciklo[3.2.1]oktadieni prethodno sintetizirani u našem laboratoriju imaju također biciklički dio vrlo sličan Hup A koji ima metano-premošteni biciklo[3.3.1]nonadien i pokazali su se kao potencijalni lijekovi CNS. Sintetizirani derivati benzobiciklo[3.2.1]oktadiena preliminarno su testirani kao inhibitori kolinesteraza.[100] Budući da su rezultati inhibicije

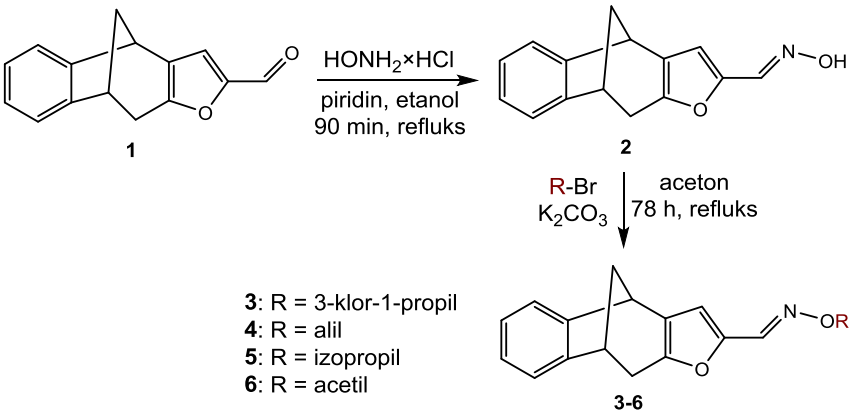
obećavajući, istraživana je daljnja funkcionalizacija osnovnog skeleta. Cilj je sintetizirati knjižnicu spojeva, posebno novih oksima i oksimskih etera. Kao početni supstrat izabran je formil-benzobiciklo[3.2.1]oktadien **1** (slika 3) koji se prevodi u oksim **2** kao intermedijer do oksimskih etera. Prema predviđanju ADME svojstava u Pass (*in silico*) programskom paketu [http://www.way2drug.com/PASSOnline/], oksimski derivati pokazali su dobru permeabilnost kroz krvno-moždanu barijeru i optimalnu lipofilnost prema kojima bi ovi spojevi trebali imati dobre predispozicije da postanu lijekovi za CNS.



Slika 3. Struktura formil-benzobiciklo[3.2.1]oktadiena **1** i odgovarajućeg oksima **2**.

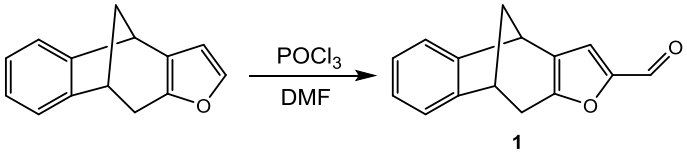
3.2. SINTEZA OKSIMA I OKSIMSKIH ETERA

Formilni derivat furo-benzobiciklo[3.2.1]oktadiena **1** prethodno je priređen u laboratoriju,[101,102] u *flow*-uvjetima, a u ovom radu služi kao početni spoj za sintezu bicikličkog oksima **2** koji se dalje prevodi u oksimske etere **3-6** (shema 1), potencijalne inhibitore kolinesteraza.



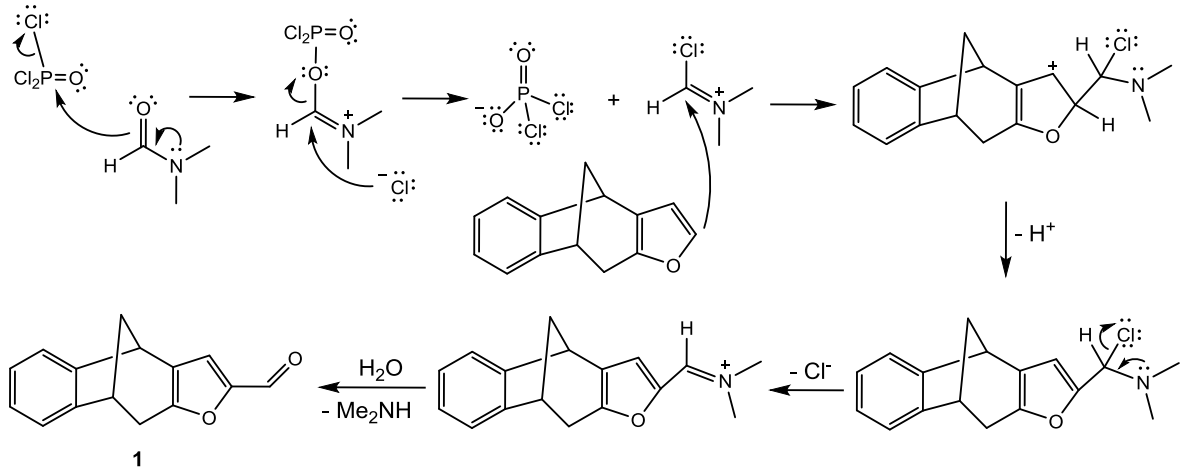
Shema 1. Sinteza oksima **2** i oksimskih etera **3-6**.

Na shemi 2 prikazana je sinteza formil-benzobiciklo[3.2.1]oktadiena **1** Vilsmeierovom reakcijom formiliranja iz odgovarajućeg nesupstituiranog benzobicikličkog fotoprodukta.



Shema 2. Vilsmeierova sinteza formil-benzobiciklo[3.2.1]oktadiena **1**.

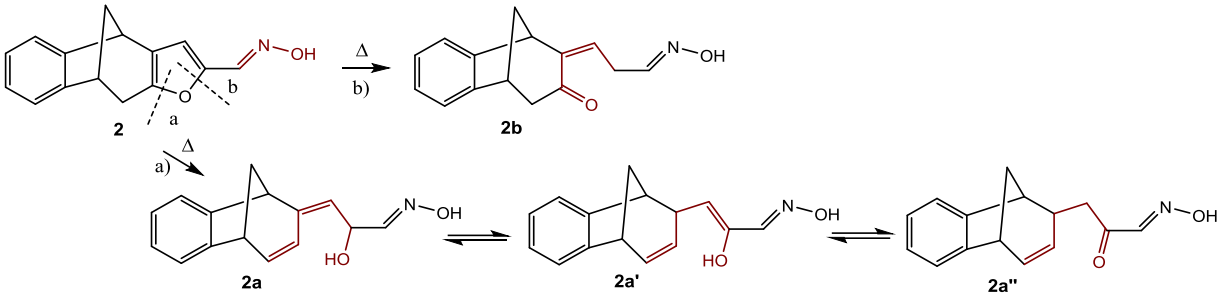
Reakcijom $POCl_3$ i *N,N*-dimetilformamida (DMF) *in situ* nastaje Vilsmeierov kompleks za formiliranje koji s furo-benzobiciklo[3.2.1]oktadienom kao supstratom reagira u formilni derivat **1**. Na shemi 3 prikazan je mehanizam reakcije.



Shema 3. Mehanizam Vilsmeierove reakcije formiliranja.

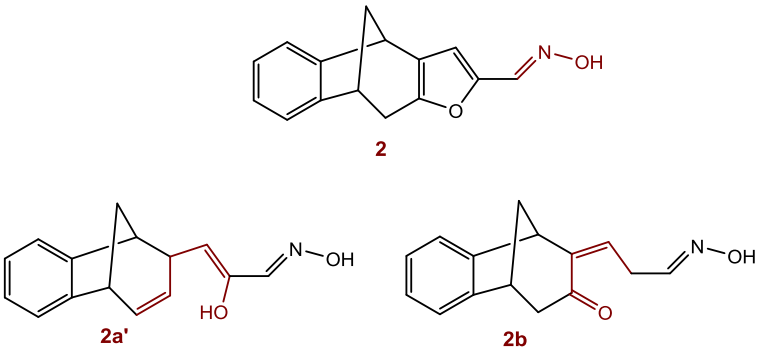
$POCl_3$ je prozirna dimeća tekućina oštrog mirisa koja nagriza metale i tkivo. Otrovan je ako se udiše ili proguta. Jako iritira kožu i tkiva uzrokujući opekline sluznice usta i probavnog trakta što može biti smrtonosno. Burno i egzotermno reagira s vodom uz moguće prskanje pri čemu nastaju dimeća fosforna i klorovodična kiselina, a reagira i s vlagom iz zraka. Zagrijavanjem se oslobađaju otrovni, korozivni i iritantni plinovi fosfornih oksida i klorida pa se dobivanje Vilsmeierovog kompleksa provodi pri sniženim temperaturama. $POCl_3$ se dodaje tek kada je temperatura DMF manja od 10 °C.[103]

Prema shemi 1 formilni derivat **1** s hidroksilamin-hidrokloridom reagira u odgovarajući biciklički oksim **2**, no tijekom reakcije uslijed zagrijavanja dolazi i do otvaranja furanskog prstena i nastanka različitih oksimskih derivata bez furanske jezgre u strukturi (shema 4). Furanski prsten može se otvoriti u dva smjera. Kod orijentacije **a** furanski prsten cijepa se između kisika i bicikličkog alifatskog dijela molekule. U ovom slučaju kisik postaje supstituent alkilnog dijela molekule u obliku hidroksilne ili karbonilne skupine. Spojevi **2a** i **2a'** imaju hidroksilnu skupinu, a razlikuju se po položaju dvostruke veze. Jedna dvostruka veza iz furanskog prstena ostaje kao dio bicikličkog ostatka u oba spoja, a druga može zauzeti dva položaja. Spoj **2a''** ima karbonilnu skupinu i dvostruku vezu od furanskog prstena samo kao dio bicikličkog ostatka molekule.



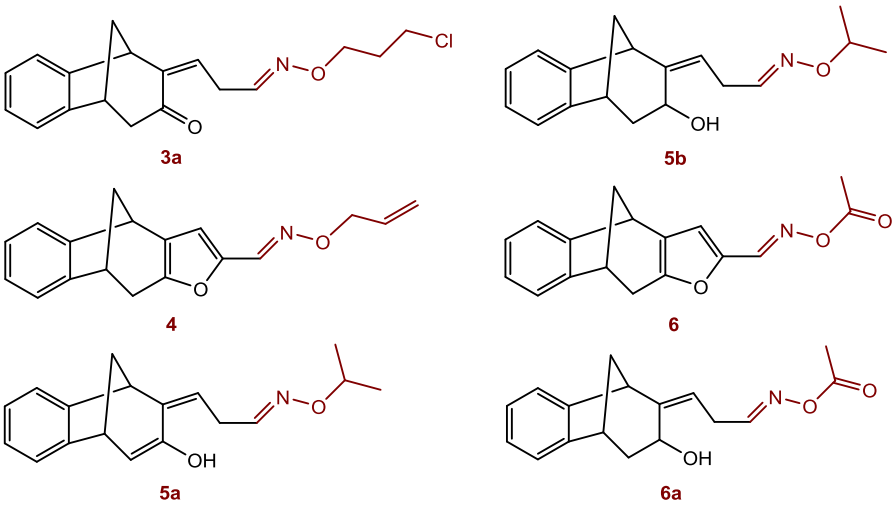
Shema 4. Dva načina otvaranja furanskog prstena na primjeru oksima **2**.

Na slici 4 prikazane su strukture izoliranih oksima koji su okarakterizirani NMR spektroskopijom. Za zatvoreni oksim **2** u ^{1}H NMR spektru karakterističan signal je singlet s pomakom na ~6 ppm koji se odnosi na vodikov atom furanskog prstena što je potvrda da je oksim sa zatvorenim furanskim prstenom, za razliku od otvorenih oksima **2a'** i **2b** koji nemaju takav signal. Svi prikazani oksimi imaju signale karakteristične za četiri aromatska protona na ~7 ppm koji se u spektru pojavljuju kao multipliciteti ili dubleti i dubleti-dubleta s aromatskom spregom ~7 Hz. U aromatskom području vidi se i vodik na *C* atomu oksimske skupine, dok se hidroksilna skupina na *N* atomu ne vidi u spektru niti jednog prikazanog oksima. U ^{1}H NMR spektru oksima **2** najmanji kemijski pomak imaju protoni metilenskog mosta i vide se kao multiplet na 2,40-2,37 ppm. Najodsjenjeniji proton bicikličkog dijela je vodik koji se nalazi između dva aromatska prstena i pojavljuje se kao dublet na 4,62 ppm. Proton koji se nalazi između benzenskog prstena i CH_2 skupine je na 3,81 ppm kao dublet, dok se protoni CH_2 skupine vide kao multiplet na 3,59-3,54 ppm. Kod oksima **2a'**, izuzevši aromatske protone i proton oksimske skupine, najodsjenjeniji je vodik vinilne skupine u alifatskom dijelu oksima i vidi se kao multiplet na 6,76-6,72 ppm, nakon kojeg slijede vinilni protoni cikličkog dijela kao zasebni signali na 6,37 ppm (dublet-tripleta) i 5,33 ppm (dublet-tripleta). Ostali protoni biciklo-dijela slijede sličan trend kao oni kod oksima **2**: najodsjenjeniji je proton između dvije aromatske jezgre kao multiplet na 4,00-3,97 ppm, zatim protoni uz benzenski prsten i alifatski dio te protoni metilenskog mosta s najmanjim kemijskim pomakom. U ^{1}H NMR spektru oksima **2b** nakon aromatskih i oksimskog protona najveći kemijski pomak ima vinilni proton koji se javlja kao multiplet na 5,38-5,33 ppm. Slijede protoni bicikličkog dijela molekule s pomacima sličnog trenda kao kod prethodnih oksima, s time da se prije protona metilenskog mosta vide protoni CH_2 skupine alifatskog dijela kao multiplet na 2,37-2,34 ppm.



Slika 4. Izolirani i okarakterizirani oksimi **2**, **2a'** i **2b**.

Tijekom sljedećeg stupnja sinteze (shema 1), odnosno dobivanja oksimskih etera **3-6** dobiveni su spojevi prikazani na slici 5 koji su izolirani i okarakterizirani NMR spektroskopijom. Navedeni oksimski eteri imaju zatvoreni ili otvoreni furanski prsten. U ovom trenutku se ne može potvrditi kada je prilikom sinteze došlo do otvaranja prstena. Zanimljivo je za uočiti kako je kod svih izoliranih etera s otvorenim furanskim prstenom kisikov atom, kao dio karbonilne ili hidroksilne skupine, ostao vezan za ciklički dio što dovodi do zaključka da oksimi koji imaju kisik vezan za ciklički dio lakše reagiraju u etere od oksima s kisikovim atomom vezanim za alifatski dio.



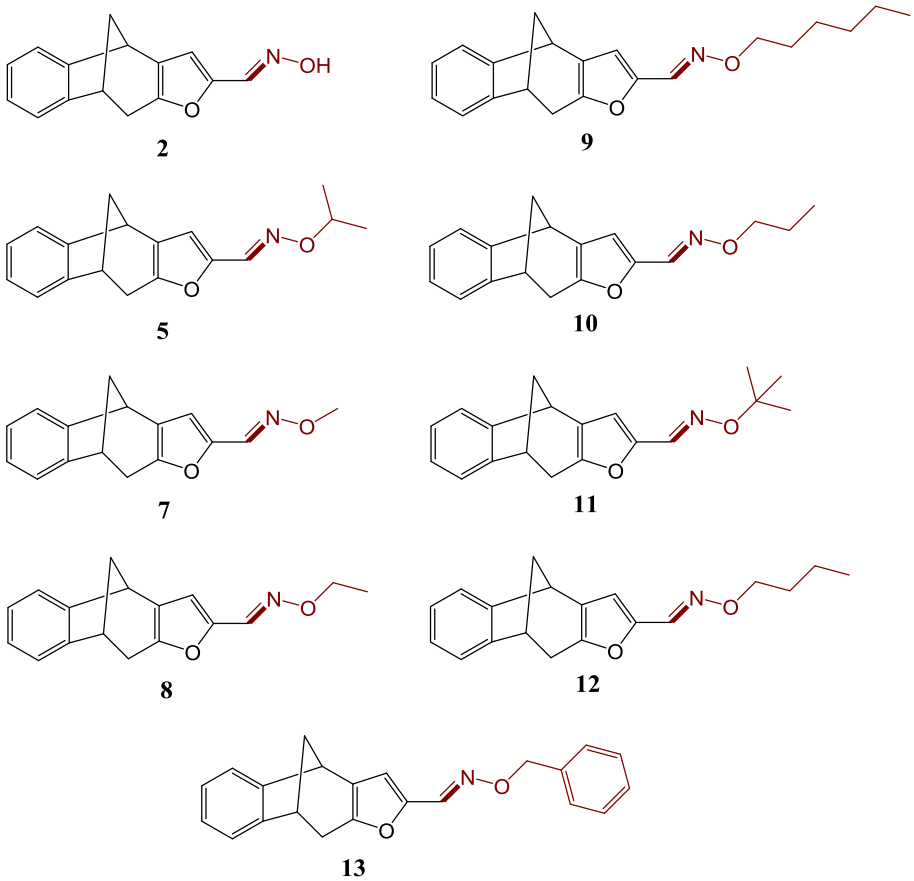
Slika 5. Izolirani i okarakterizirani oksimski eteri kao potencijalni inhibitori kolinesteraza.

Obzirom na prisutnost signala na ~6 ppm u vidu singleta u ^{1}H NMR spektrima, zaključeno je radi li se o oksimskim eterima sa zatvorenim ili otvorenim furanskim prstenom. Zatvoreni oksimski eter **4** s alilnom skupinom vezanom na kisik i produkt **6** s acetilnom skupinom imaju analogne pomake kao kod zatvorenog oksima **2** s dodatnim signalima za alilnu skupinu na 7,37-7,01 ppm (multiplet) i 6,67 ppm (dublet) za vinilne protone te 2,40-2,28 ppm za protone CH_2 skupine spoja **4** te za acetilnu skupinu signal na 1,32 ppm (singlet) za metilne protone. Otvoreni oksimski eter **3a** jedini od izoliranih etera ima karbonilnu skupinu na cikličkom dijelu

molekule i analogne je strukture oksimu **2b** s propilkloridnom skupinom vezanom za kisik. Karakteristični pomaci u ^{1}H NMR spektru su za *O-C<u>H</u>$_2$* protone na 4,34 ppm kao triplet, za *Cl-C<u>H</u>$_2$* protone na 4,32-4,36 ppm kao multiplet i *CH$_2$* protone između na 3,66 ppm koji pokazuju triplet. Kod spoja **5a** nakon aromatskih i oksimskog protona najodsjenjeniji su vinilni protoni. U spektru se na 6,71-6,69 ppm (multiplet) nalazi vinilni proton cikličkog dijela, a na 6,25 ppm (dublet) vinilni proton alifatskog dijela molekule. Slijedi metinski proton kao multiplet na 4,34-4,29 ppm pa signal *O<u>H</u>* skupine na 4,27 ppm (dublet). Na 4,18 ppm kao multiplet vide se metilenski protoni, a zatim slijede protoni cikličkog dijela sa sličnim trendom pomaka kao kod prethodnih spojeva. Najzasjenjeniji su metilni protoni na 1,43 ppm (dublet). Oksimski eter **5b** se od **5a** razlikuje po nedostatku dvostruke veze u cikličkom dijelu pa više protona pokazuje signale u spektru. Najodsjenjeniji su aromatski, oksimski i vinilni protoni nakon kojih se u spektru na 5,01 ppm kao dublet vidi proton *C* atoma na koji je vezana *OH* skupina koja pokazuje signal na 3,65 ppm (singlet). Na 4,55-4,51 ppm kao multiplet vidi se signal za *O-C<u>H</u>* proton nakon kojeg slijedi multiplet na 4,35-4,27 ppm za metilenske protone alifatskog dijela i proton cikličkog dijela između benzenskog prstena i dvostruke veze. Slijede signali za ostale protone cikličkog dijela analognih pomaka kao i u prijašnjim slučajevima, a nazasjenjeniji su metilni protoni na 1,37 ppm (dublet). Spoj **6a** ima jednaki kostur kao **5b**, a razlika je u acetilnom supstituentu i karakterističan je signal metilnih protona uz karbonilni ugljik na 3,70 ppm (singlet).

3.3. RAČUNALNO ISPITIVANJE OKSIMA I OKSIMSKIH ETERA KAO POTENCIJALNIH INHIBITORA ACETIL- I BUTIRILKOLINESTERAZE

Cilj ovog dijela istraživanja bio je računalnim metodama odrediti relativnu termodinamičku stabilnost kompleksa koji nastaje smještanjem potencijalnog inhibitora u aktivno mjesta enzima acetil- i butirilkolinesteraze. Kao potencijalni inhibitori ispitivani su odabrani oksimi i oksimski eteri **2, 5, 7-13** (slika 6) od kojih je oksim **2** sintetiziran, izoliran i spektroskopski okarakteriziran kao dio ovoga rada, a ostali očekivani oksimski eteri, sa strukturom koja je zadržala i početni furanski prsten, pokazali su obećavajuća ADME svojstva. Molekule koje stvaraju stabilnije komplekse trebale bi pokazati jaču sposobnost inhibicije spomenutih enzima.



Slika 6. Oksimi i oksimski eteri ispitivani kao potencijalni inhibitori acetil- i butirilkolinesteraze.

Smještanje svake ispitivane molekule u aktivno mjesto pojedinog enzima modelirano je korištenjem programa Autodock.[104] Aktivno mjesto acetilkolinesteraze preuzeto je iz PDB strukture 2ACE,[105] dok je aktivno mjesto butirilkolinesteraze izdvojeno iz PDB strukture 1P0I.[106] Smještanjem ispitivanih molekula u aktivno mjesto acetilkolinesteraze (koje sadrži 16 aminokiselina), odnosno butirilkolinesteraze (15 aminokiselina), dobivene su strukture kompleksa [aktivno mjesto-inhibitor ***n***], gdje je ***n*** = **2, 5, 7-13** (slika 6). Za svaki kompleks odabrana je struktura koja je dala najnižu Gibbsovu energiju vezanja procijenjenu *dockingom*, koja je zatim poslužila za dobivanje modelnog sustava za kvantno-kemijske račune. Modelni sustav dobiven je modificiranjem kompleksa dobivenih *dockingom* tako što su ručno uklonjene $-COO^-$ i $-NH_3^+$ skupine sa svih aminokiselina, a na α ugljikove atome dodani su atomi vodika da se dobiju metilne skupine. Svaki od tako pripremljenih kompleksa optimiran je na CPCM/B3LYP/6-31G(d) razini teorije, uz pomoć programskog paketa Gaussian09.[107] Polarizabilni model kontinuuma (engl. *conductor-like polarizable continuum model*, CPCM) služi opisu elektrostatskih efekata koji su posljedica proteinskog okoliša. Pri tome je odabrana

vrijednost dielektrične konstante ε = 4, koja, iako donekle proizvoljna, obično dobro reprezentira utjecaj proteinskog okruženja na ispitivani sustav. Da bi se pri optimizaciji geometrije zadržala struktura aktivnog mjesta koja odgovara eksperimentalno dobivenoj strukturi u proteinu (odnosno da ne bi došlo do umjetnih konformacijskih promjena koje bi dovele do značajnih odstupanja od realne strukture aktivnog mjesta), položaji svih α ugljikovih atoma su fiksirani.[108]

Stabilnost kompleksa između svake ispitivane molekule potencijalnog inhibitora i aktivnog mjesta enzima računata je kao Gibbsova energija reakcije združivanja:

aktivno mjesto + inhibitor ***n*** → [kompleks aktivno mjesto-inhibitor ***n***]

Gibbsova energija reakcije računa se kao razlika između Gibbsove energije kompleksa (G_{kompleks}) i zbroja Gibbsovih energija praznog aktivnog mjesta ($G_{\text{akt-mjesto}}$) i molekule inhibitora (G_{inh}):

$$\Delta_r G^{298} = G_{\text{kompleks}} - (G_{\text{akt-mjesto}} + G_{\text{inh}})$$

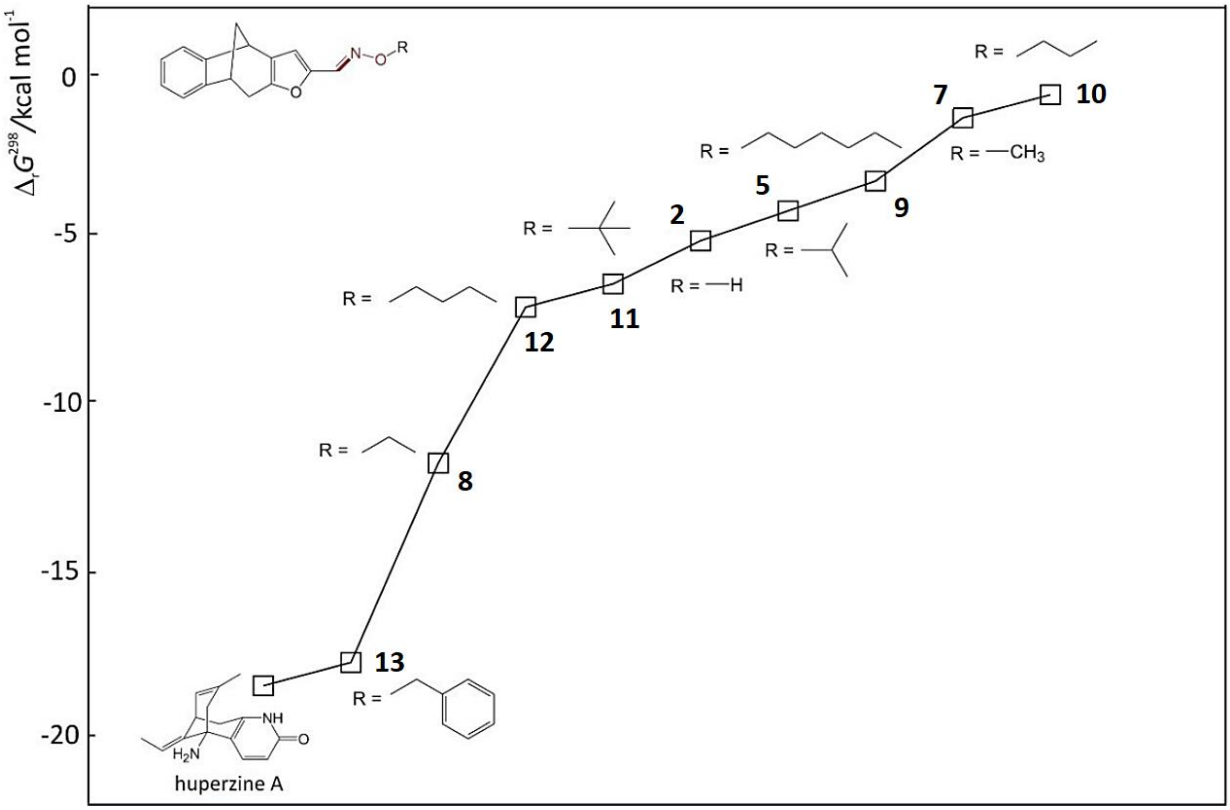
Računalno dobivena Gibbsova energija reaktanata (praznog aktivnog mjesta i inhibitora) te produkta (kompleksa) predstavlja zbroj između izračunate ukupne energije pojedinog sustava i termalne korekcije na Gibbsovu energiju, dobivene preko vibracijske analize ($G = E$ + *Thermal correction to Gibbs energy*).

S obzirom na to da je način djelovanja inhibitora koji strukturno odgovaraju ispitivanim molekulama takav da podrazumijeva blokadu aktivnog mjesta ulaskom inhibitora, pretpostavljeno je da, što je pojedini kompleks termodinamički stabilniji u odnosu na reaktante (drugim riječima, što je reakcija egzergonija), to je očekivana veća sposobnost inhibicije pojedine molekule koja sudjeluje u stvaranju kompleksa.

Radi usporedbe ispitana je i relativna stabilnost kompleksa koji nastaje između poznatog inhibitora kolinesteraza, huperzina A[105] i aktivnog mjesta enzima, koristeći isti računalni pristup kao i za molekule **2, 5, 7-13**. U tablici 1 prikazane su vrijednosti promjene Gibbsove energije za stvaranje kompleksa između aktivnog mjesta AChE i huperzina A te svakog od potencijalnih inhibitora, a na slici 7 grafički je prikazan odnos izračunatih vrijednosti za svaku molekulu.

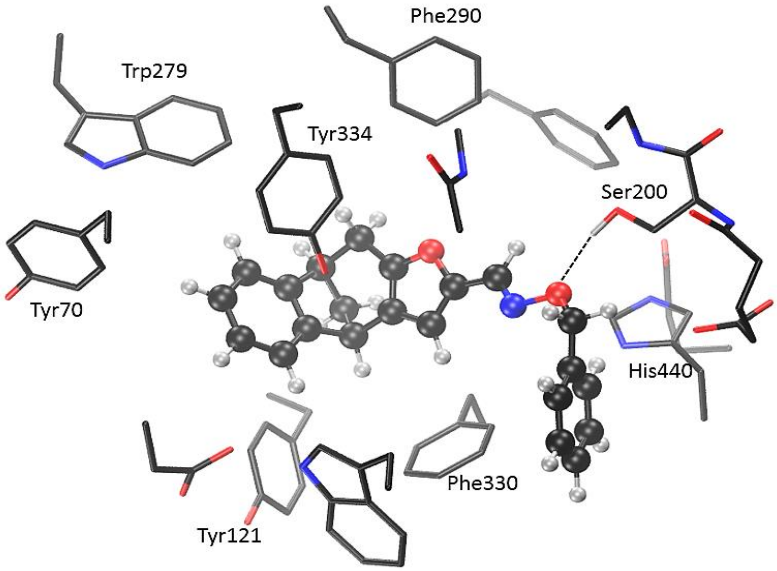
Tablica 1. Izračunate vrijednosti promjene Gibbsove energije za reakciju stvaranja kompleksa između huperzina A i molekule ***n*** s aktivnim mjestom acetilkolinesteraze, u kcal mol^{-1}.

n	$\Delta_r G^{298}$
huperzin A	**–18,5**
2	–5,1
5	–4,2
7	–1,4
8	–11,8
9	–3,3
10	–0,7
11	–6,4
12	–7,1
13	**–17,8**



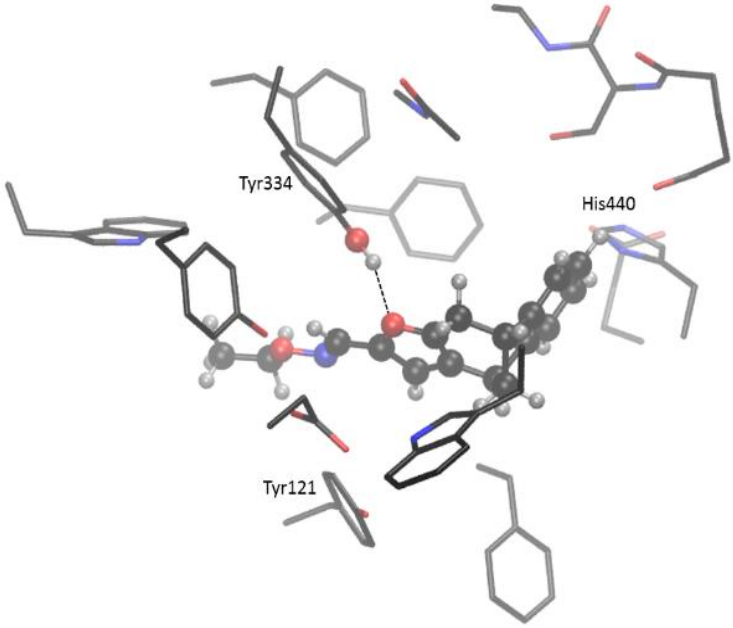
Slika 7. Vrijednosti $\Delta_r G^{298}$ (u kcal mol^{-1}) za stvaranje kompleksa [aktivno-mjesto-inhibitor] za ispitivane molekule **2**, **5**, **7-13** i huperzin A, za modelni sustav enzima acetilkolinesteraze.

Očekivano, najstabilniji kompleks je onaj koji nastaje s poznatim inhibitorom huperzin A. Vrlo blisku vrijednost promjene Gibbsove energije od –17,8 kcal mol^{-1} ima reakcija stvaranja kompleksa između aktivnog mjesta acetilkolinesteraze i molekule **13**, oksimskog etera koji sadrži aril kao dio eterske funkcionalne skupine. Iz slike 8, koja prikazuje optimiranu strukturu modelnog sustava kompleksa aktivnog mjesta s molekulom **13**, vidljivo je da su od stabilizirajućih efekata najprisutnije *π-π-stacking* interakcije. U dijelu molekule koji je zajednički svim ispitivanim sustavima (biciklički kostur) prisutna je jedna benzenska jezgra koja se u aktivnom mjestu acetilkolinestaraze, na primjeru molekule **13**, smjestila tako da *π*-sustavom ulazi u interakcije s aromatskim aminokiselinama: Tyr334, Tyr70, Tyr121 i Trp279. Kod molekule **13**, u eterskoj skupini prisutna je još jedna benzenska jezgra čije prisustvo dodatno doprinosi stabilnosti kompleksa, zahvaljujući blizini Phe330 i His440 s kojima dolazi do *π-π-stackinga* T-oblika obzirom na orijentaciju aromatskih prstenova. Također, stabilnosti kompleksa pridonosi i vodikova veza između kisika eterske skupine molekule **13** i hidroksilne skupine Ser200.



Slika 8. Optimirana struktura kompleksa [aktivno mjesto AChE-molekula **13**].

Sljedeći spoj koji stvara stabilan kompleks s aktivnim mjestom modelnog sustava je molekula **8** koja sadrži etil kao dio eterske grupe, s vrijednošću $\Delta_r G^{298}$ od –11,8 kcal mol^{-1} (tablica 1, slika 9). Molekula **8** sadrži aromatski sustav jedino kao dio osnovnog kostura i zanimljivo je da je najpovoljnija orijentacija pri smještanju u aktivno mjesta takva da je aromat na suprotnoj strani u odnosu na molekulu **13**: benzenska jezgra smjestila se u blizini His440 što sprječava stvaranje vodikove veze sa Ser200. Stabilizaciji kompleksa pridonosi vodikova veza između kisikovog atoma furanskog prstena molekule **8** i hidroksilne skupine Tyr334 te blizina aromatske aminokiseline Phe290.



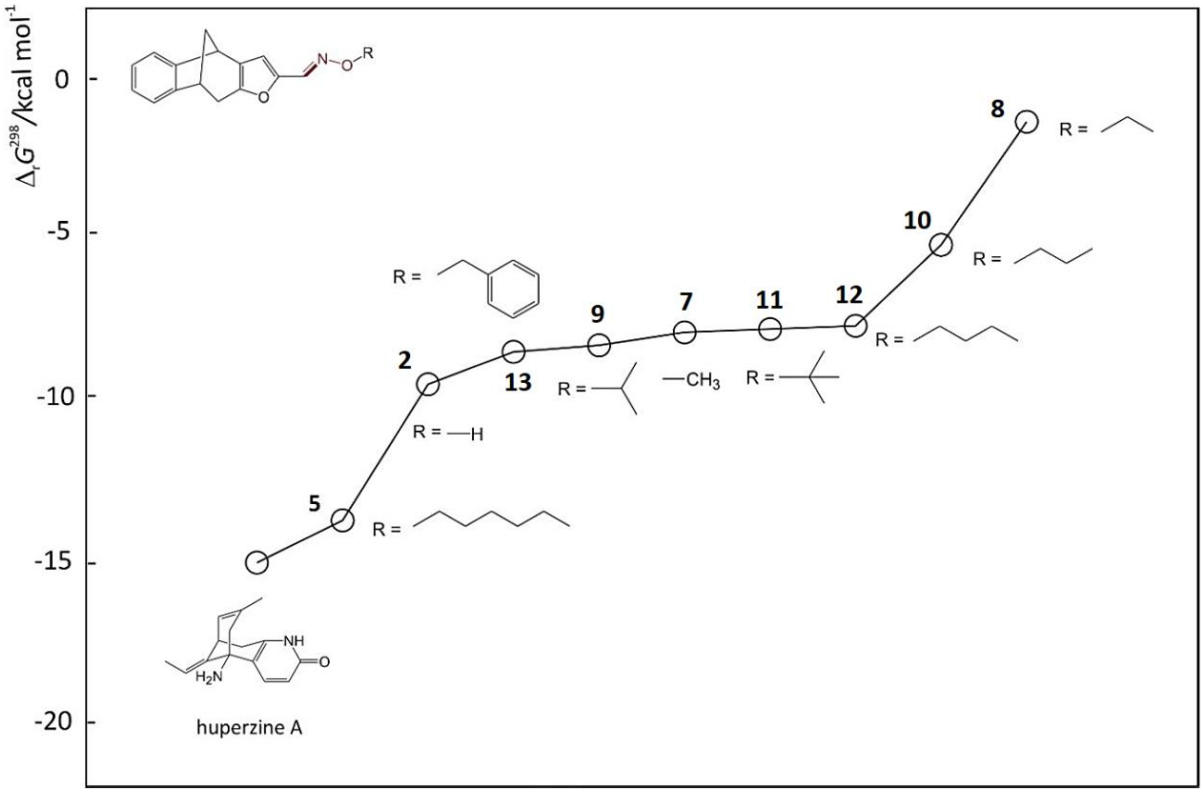
Slika 9. Optimirana struktura kompleksa [aktivno mjesto AChE-molekula **8**].

Dalje se nižu molekule **12**, **11** i **2** koje stvaraju nešto manje stabilne komplekse s vrijednostima $\Delta_r G^{298}$ od –7,1 do –5,2 kcal mol^{-1}. Najslabije vezanje u aktivnom mjestu acetilkolinesteraze, s vrijednostima $\Delta_r G^{298}$ od –4,2 do –0,7 kcal mol^{-1}, pokazuju preostale molekule **5**, **7**, **9** i **10**. Kod svih ispitivanih spojeva metano-premoštenje bicikličkog kostura je orijentirano prema Phe330 i Trp84, što omogućava povoljno steričko uklapanje unutar aktivnog mjesta te tako pridonosi stabilizaciji sustava.

U tablici 2 prikazane su vrijednosti promjene Gibbsove energije za stvaranje kompleksa između aktivnog mjesta BChE i huperzina A te svakog od potencijalnih inhibitora, a na slici 10 grafički je prikazan odnos izračunatih vrijednosti za svaku molekulu.

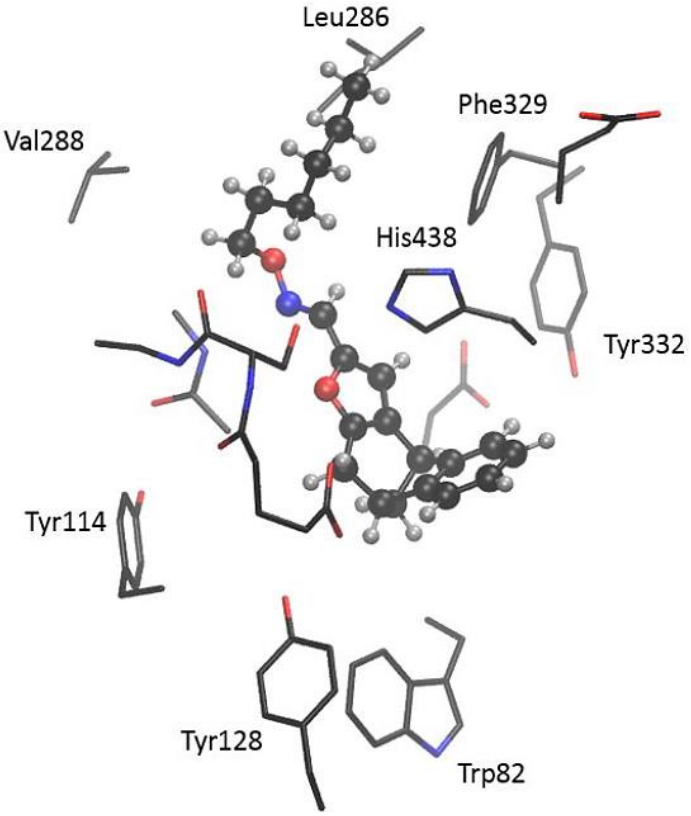
Tablica 2. Izračunate vrijednosti promjene Gibbsove energije za reakciju stvaranja kompleksa između molekule ***n*** i huperzina A s aktivnim mjestom butirilkolinesteraze, u kcal mol^{-1}.

n	$\Delta_r G^{298}$
huperzin A	**–15,1**
2	–9,6
5	–8,4
7	–8,0
8	–1,5
9	**–14,1**
10	–5,3
11	–7,9
12	–7,8
13	–8,6



Slika 10. Vrijednosti $\Delta_r G^{298}$ (u kcal mol^{-1}) za stvaranje kompleksa [aktivno-mjesto-inhibitor] za ispitivane molekule **2**, **5, 7-13** i huperzin A, za modelni sustav enzima butirilkolinesteraze.

Prema tablici 2 i slici 10 vidljivo je da huperzin A ponovno stvara najstabilniji kompleks s enzimom, u ovome slučaju butirilkolinesterazom, s $\Delta_r G^{298}$ od –15,1 kcal mol^{-1}. Najstabilniji kompleks između potencijalnih inhibitora i BChE je s molekulom **9** (slika 11) s promjenom Gibbsove energije od –14,1 kcal mol^{-1}. Molekula **9** ima dugački heksilni lanac kao dio eterske skupine što nije sterički favorizirano u slučaju inhibicije AChE, no kod ulaska u aktivno mjesto BChE heksilni lanac dobro pristaje u acilni džep gdje se nalaze Val228 i Leu286. Kod kompleksa [AChE-molekula **9**] zbog orijentacije molekule u aktivnom mjestu enzima ne dolazi do interakcija između benzenskog prstena i histidina, no na slici 11 vidi se da je u slučaju BChE molekula **9** drugačije orijentirana što omogućava povoljnu interakciju između benzenske jezgre i His438.



Slika 11. Optimirana struktura kompleksa [aktivno mjesto AChE-molekula **9**].

Iz geometrija svih kompleksa da se zaključiti da je sterički utjecaj važniji kod stabilnosti kompleksa BChE nego što je slučaj kod AChE, dok je uloga *π-π-stacking* interakcija manje izražena kod BChE. Sve molekule ulaze u aktivno mjesto BChE sa metano-premoštenjem orijentiranom prema Trp82, analogno vezanju kod AChE, no kod BChE sve molekule ulaze u aktivno mjesto s benzenskim prstenom bicikličke jezgre orijentiranom prema His438. Molekule **2**, **5**, **7**, **11**, **12** i **13** imaju vrlo bliske vrijednosti $\Delta_r G^{298}$ koje se kreću od –9,6 do –7,8 kcal mol^{-1} pa se može očekivati da su stabilizirajuće interakcije u kompleksima koje one formiraju s

aktivnim mjestom BChE slične. Iako je pozicija benzena važna za omogućavanje *π-π-stackinga* s histidinom, još je važnija kao indikator koliko dobro cijela molekula dobro ulazi u aktivno mjesto. Slike svih kompleksa acetil- i butirilkolinesteraze sa spomenutim potencijalnim inhibitorima (molekule **2**, **5**, **7-13**) dane su u Prilozima. Vodikovi atomi na aminokiselinama nisu prikazani radi preglednosti.

Važno je naglasiti da je cilj ovog pristupa za dobivanje vrijednosti slobodnih energija stvaranja kompleksa bio predvidjeti trend i ponašanje unutar skupa sličnih molekula, što dalje omogućava ciljanu sintezu pogodnih potencijalnih inhibitora kolinesteraza.

4. EKSPERIMENTALNI DIO

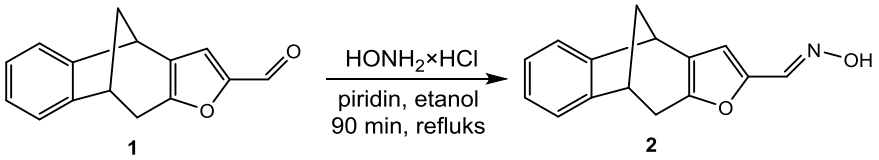
Opće napomene

Kromatografska odjeljivanja su provedena na kolonama punjenim silikagelom (Fluka 0,063-0,2 nm) i na pločama presvučenim tankim slojem silikagela (0,2 mm, 60 F_{254}, Merck). Za identifikaciju sintetiziranih spojeva i određivanje njihove čistoće korištena je nuklearna magnetska rezonancija (^{1}H i ^{13}C NMR). Spektri ^{1}H i ^{13}C NMR snimljeni su na instrumentima Varian Gemini 300 na 300 MHz (^{1}H NMR), odnosno 75 MHz (^{13}C NMR) te Bruker AV-600 na 600 MHz (^{1}H NMR), odnosno 150 MHz (^{13}C NMR). Spektri su snimani u $CDCl_3$ kao otapalu uz tetrametilsilan kao unutarnji standard. Za asignaciju signala korištene su dodatne tehnike: 2D-CH korelacija (HSQC), 2D-HH-COSY i NOESY. Korištene su kratice s - singlet, d - dublet, t - triplet, dd - dublet dubleta, ddd - dublet dubleta dubleta i m - multiplet.

Otapala su pročišćena destilacijom, a nakon provedbe reakcije uklonjena su s rotacionim uparivačem pod sniženim tlakom. Skraćenica DMF odnosi se na *N*,*N*-dimetilformamid, PE/DCM na smjesu petroleter/diklormetan, a DCM/E na diklormetan/dietileter.

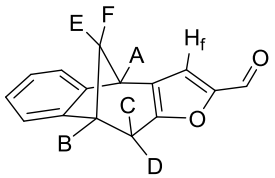
Početni spoj **1** priređen je u laboratoriju,[101,102] a reagensi korišteni kod sinteza su kupovne kemikalije.

4.1. SINTEZA OKSIMA



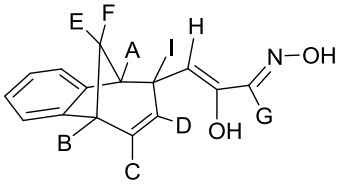
U tikvicu s okruglim dnom u kojoj se nalazi 50 mg aldehida **1** (0,223 mmol, 1 ekv) otopljenog u 1 mL apsolutno suhog etanola p.a. (3Å sita) dodano je 8 mg hidroksilamin hidroklorida (0,112 mmol, 0,5 ekv) i 0,05 mL piridina. Reakcija se miješa i zagrijava na magnetskoj mješalici u uljnoj kupelji do 78 °C i refluksira 1 h nakon čega se upari etanol do suha. Uzorak se nanese na silikagel i pročisti kolonskom kromatografijom s PE/DCM promjenjive polarnosti kao eluensom. Produkt je dodatno pročišćen tankoslojnom kromatografijom u DCM/E = 30:1. Izolirani produkt okarakteriziran je NMR spektroskopijom koja je pokazala da nije dobiven produkt sa sheme 1, već se otvorio furanski prsten i dobiveno je 16 mg otvorenog oksima **2a'** (30%).

(4*R*,9*R*)-9,10-dihidro-4*H*-4,9-metanobenzo[4,5]ciklohepta[1,2-b]furan-2-karbaldehid (1)



1: lit.[101,102] 50,0%; R_f (petroleter/dietileter = 20:1) = 0,23; žuta krutina; t_t = 135 °C; UV (EtOH) λ_{max} (ε/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}): 308 (16794) nm; IR (KBr) ν_{max}/cm^{-1}: 1666 (C=O), 1504 (C=C); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz) δ/ppm: 9,41 (s, 1H, CHO), 7,32 (dd, 1H, J = 7,2; 1,4 Hz, H_{Ar}), 7,16-7,08 (m, 4H, 3H_{Ar}, H_f), 3,91 (d, 1H, J = 4,4 Hz, H_A), 3,66 (dt, 1H, J = 4,9; 0,5 Hz, H_B), 3,20 (dd, 1H, J = 17,8; 4,9 Hz, H_C), 2,72 (dd, 1H, J = 17,8; 0,5 Hz, H_D), 2,48 (ddd, 1H, J = 10,7; 4,9; 4,4 Hz, H_E), 2,4 (d, 1H, J = 10,7 Hz, H_F); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75 MHz) δ/ppm: 176,6 (d), 156,0 (s), 151,3 (s), 150,6 (s), 144,1 (s), 128,5 (s), 126,9 (d), 126,9 (d), 124,1 (d), 121,0 (2*d), 42,5 (t), 39,6 (d), 39,1 (d), 31,4 (t); MS *m/z* (EI) 224 (M^+, 100 %), 167 (23), 115 (10).

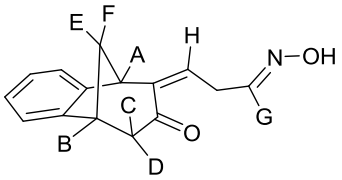
(1*E*,2*Z*)-3-((5*S*,6*S*,9*R*)-6,9-dihidro-5*H*-5,9-metanobenzo[7]anulen-6-il)-2-hidroksiakril aldehid oksim (2a')



2a': žuto ulje, R_f (diklormetan) = 0,73; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ/ppm: 7,19 (m, 1H, H_G), 7,13 (d, 1H, J = 7,3 Hz, H_{Ar}), 7,04 (dd, 1H, J = 7,5; 1,0 Hz, H_{Ar}), 6,81 (dd, 1H, J = 7,6; 1,0 Hz, H_{Ar}), 6,76-6,72 (m, 1H, H_H), 6,37 (dt, 1H, J = 9,6; 2,5 Hz, $H_{C/D}$), 6,18 (d, 1H, J = 7,2 Hz, H_{Ar}), 5,33 (dt, 1H, J = 9,6 Hz, $H_{C/D}$), 4,00-3,97 (m, 1H, H_A), 3,39 (t, 1H, J = 5,2 Hz, $H_{B/I}$), 3,30 (dd, 1H, J = 5,2; 4,6 Hz, $H_{B/I}$), 2,54-2,51 (m, 1H, H_E), 2,39 (d, 1H, J = 9,8 Hz, H_F).

Eksperiment je ponovljen sa 100 mg aldehida **1** (0,446 mmol, 1 ekv) u 2 mL apsolutno suhog etanola p.a. i sa 16 mg hidroksilamin-hidroklorida (0,223 mmol, 0,5 ekv) i 0,1 mL piridina. Uzorak se pročisti kolonskom kromatografijom s PE/DCM = 6:4 kao eluensom te dodatno tankoslojnom kromatografijom u DCM. NMR spektar izoliranog produkta pokazuje da se furanski prsten opet otvorio, no na drugačiji način te je dobiveno 8 mg (7,5%) oksima **2b**.

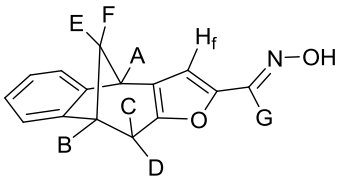
(1*E*,3*Z*)-3-((5*R*,9*R*)-7-okso-5,7,8,9-tetrahidro-6*H*-5,9-metanobenzo[7]anulen-6-iliden) propanal oksim (2b)



2b: blijedo žuto ulje, R_f (diklormetan) = 0,6; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ/ppm: 7,74 (m, 5H, H_{Ar}, H_G), 5,38-5,33 (m, 1H, H_H), 4,32-4,27 (m, 1H, H_A), 3,82 (d, 1H, J = 2,7 Hz, H_B), 3,65 (t, 1H, J = 6,7 Hz, $H_{C/D}$), 3,59-3,54 (t, 1H, J = 6,7 Hz, $H_{C/D}$), 2,37-2,34 (m, 2H, $C\underline{H}_2$), 2,34-2,29 (m, 2H, H_E,H_F).

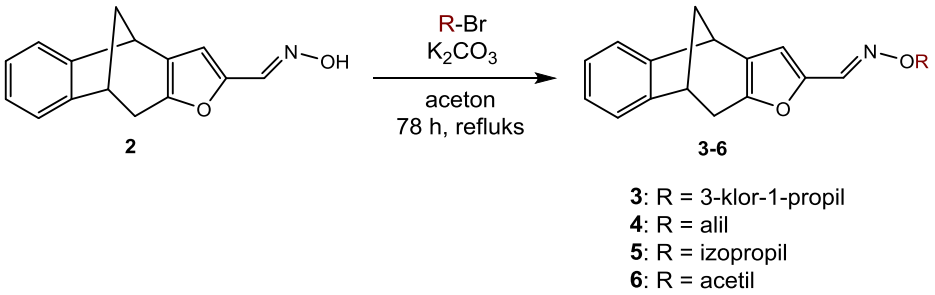
Željeni produkt **2** izoliran je kao neizreagirani reaktant (10 mg) kod sinteze oksimskog etera **4** (poglavlje 4.2. Sinteza oksimskih etera).

(*E*)-9,10-dihidro-4*H*-4,9-metanobenzo[4,5]ciklohepta[1,2-*b*]furan-2-karbaldehid oksim (2)



2: blijedo žuto ulje, R_f (petroleter/diklormetan = 1:1) = 0,33; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ/ppm: 7,36 (d, 1H, J = 6,6 Hz, H_G), 7,18-7,05 (m, 4H, H_{Ar}), 6,06 (s, 1H, H_f), 4,62 (d, 1H, J = 2,5 Hz, H_A), 3,81 (d, 1H, J = 4,0 Hz, H_B), 3,59-3,54 (m, 2H, $H_{C,D}$), 2,40-2,37 (m, 2H, $H_{E,F}$).

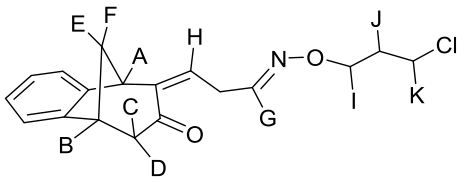
4.2. SINTEZA OKSIMSKIH ETERA



U tikvicu s okruglim dnom u kojoj se nalazi 60 mg oksima (0,251 mmol, 1 ekv) otopljenog u 2 mL acetona dodano je 28 µL 1-brom-3-klorpropana (0,276 mmol, 1,1 ekv) i 51,96 mg K_2CO_3

(0,376 mmol, 1,5 ekv). Reakcija se miješa i zagrijava na magnetskoj mješalici u uljnoj kupelji do 78 °C i refluksira 78 h nakon čega se upari aceton do suha. Uzorak se pročisti kolonskom kromatografijom s PE/DCM = 3:1 kao eluensom i dodatno tankoslojnom kromatografijom u DCM. Izolirani produkt okarakteriziran je NMR spektroskopijom koja je pokazala da je dobiveno 2 mg (2,5%) oksimskog etera s otvorenim furanskim prstenom **3a**.

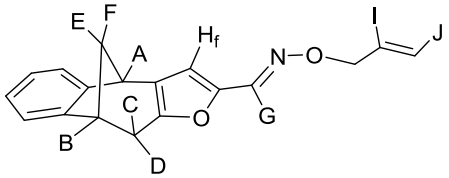
(1*E*,3*Z*)-3-((5*R*,9*R*)-7-okso-5,7,8,9-tetrahidro-6*H*-5,9-metanobenzo[7]anulen-6-iliden) propanal *O*-(3-kloropropil) oksim (3a)



3a: žuto ulje, R_f (diklormetan) = 0,26; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ/ppm: 7,31 (d, 1H, J = 7,1 Hz, H_{Ar}), 7,25 (d, 1H, J = 1,0 Hz, H_G), 7,16 (d, 1H, J = 7,4 Hz, H_{Ar}), 7,04 (d, 1H, J = 1,0 Hz, H_H), 7,04-7,02 (m, 2H, $H_{Ar/G}$), 4,34 (t, 2H, J = 5,9 Hz, C$\underline{H}_2$-O), 4,32-4,26 (m, 2H, C$\underline{H}_2$-Cl), 3,87 (d, 1H, J = 4,3 Hz, H_A), 3,66 (t, 2H, J = 6,6 Hz, C$\underline{H}_2$), 3,66-3,63 (m, 1H, H_B), 3,14 (dd, 1H, J = 17,1; 5,0 Hz, $H_{C/D}$), 2,64 (dd, 1H, J = 17,1; 1,2 Hz, $H_{C/D}$), 2,49-2,45 (m, 1H, H_E), 2,22-2,17 (m, 2H, H_J), 2,05 (d, 1H, H_F).

Eksperiment je ponovljen s 30 µL alil bromida (0,276 mmol, 1,1 ekv) kao alkilirajućim reagensom. Nakon kolonske kromatografije s PE/DCM = 1:1 kao eluensom i tankoslojne kromatografije u istoj smjesi otapala dobiveno je 10 mg spoja **4** (14%).

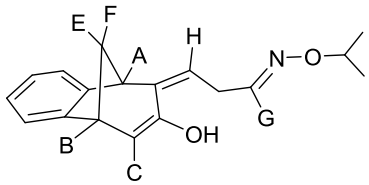
(*E*)-9,10-dihidro-4*H*-4,9-metanobenzo[4,5]ciklohepta[1,2-*b*]furan-2-karbaldehid *O*-alil oksim (4)



4: žuto ulje, R_f (petroleter/diklormetan = 1:1) = 0,80; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ/ppm: 7,37-7,01 (m, 6H, $H_{Ar,G,I}$), 6,67 (d, 2H, J = 15,5 Hz, H_J), 6,52 (s, 1H, H_f), 3,87-3,85 (m, 1H, H_A), 3,18 (dd, 1H, J = 17,4; 5,3 Hz, H_B), 2,97 (d, 1H, J = 16,8 Hz, $H_{C/D}$), 2,68 (d, 1H, J = 16,8 Hz, $H_{C/D}$), 2,48-2,43 (m, 1H, H_E), 2,40-2,28 (m, 2H, C$\underline{H}_2$), 2,05 (d, 1H, J = 10,5 Hz, H_F).

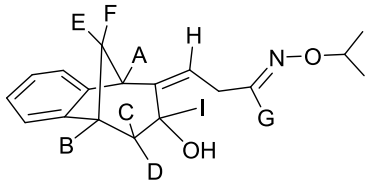
S izopropil-bromidom (0,191 mmol, 1,1 ekv) kao alkilirajućim reagensom nakon kolonske kromatografije s PE/DCM = 1:10 kao eluensom i tankoslojne kromatografije u PE/DCM = 40:1 izolirana su dva oksimska etera s otvorenim furanskim prstenom, **5a (**5 mg**,** 10%) i **5b** (13 mg, 26%).

(1*E*,3*Z*)-3-((5*R*,9*R*)-7-hidroksi-5,9-dihidro-6*H*-5,9-metanobenzo[7]anulen-6-iliden) propanal *O*-izopropil oksim (5a)



5a: žuto ulje, R_f (diklormetan) = 0,60; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ/ppm: 7,33 (d, 1H, J = 7,0 Hz, H_{Ar}), 7,15 (dd, 1H, J = 8,7; 7,5 Hz, H_{Ar}), 7,07-7,02 (m, 3H, $H_{Ar,G}$), 6,71-6,69 (m, 1H, H_C), 6,25 (d, 1H, J = 1,8 Hz, H_H), 4,34-4,29 (m, 1H, C<u>H</u>), 4,27 (d, 1H, J = 2,4 Hz, O<u>H</u>), 4,24-4,18 (m, 2H, C<u>H</u>$_2$), 3,64 (dd, 1H, J = 6,0; 2,2 Hz, H_A), 3,55-3,52 (m, 1H, H_B), 2,44 (d, 1H, J = 10,5 Hz, H_F), 2,37-2,31 (m, 1H, H_E), 1,43 (d, 6H, J = 0,5 Hz, C<u>H</u>$_3$).

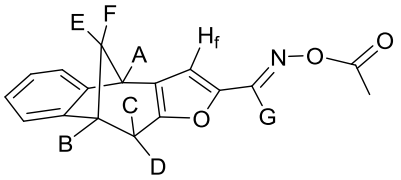
(1*E*,3*Z*)-3-((5*R*,9*R*)-7-hidroksi-5,7,8,9-tetrahidro-6*H*-5,9-metanobenzo[7]anulen-6-iliden)propanal *O*-izopropil oksim (5b)



5b: blijedo žuto ulje, R_f (diklormetan/petroleter = 9:1) = 0,43; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ/ppm: 7,38-7,05 (m, 5H, $H_{Ar,G}$), 6,39 (d, 1H, J = 1,8 Hz, H_H), 5,01 (d, 1H, J = 4,6 Hz, 1H, H_I), 4,55-4,51 (m, 1H, C<u>H</u>), 4,35-4,27 (m, 3H, H_A,C<u>H</u>$_2$), 4,25-4,20 (m, 1H, H_B), 4,05 (d, 1H, J = 4,4 Hz, $H_{C/D}$), 3,88-3,84 (m, 1H, $H_{C/D}$), 3,65 (s, 1H, O<u>H</u>), 2,56-2,52 (m, 1H, H_E), 2,37 (d, 1H, J = 10,3 Hz, H_F), 1,37 (d, 6H, J = 6,2 Hz, C<u>H</u>$_3$).

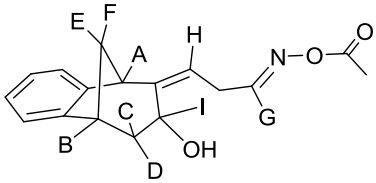
S acetil-bromidom (0,191 mmol, 1,1 ekv) kao alkilirajućim reagensom nakon uzastopnog kromatografskog pročišćavanja dobiveno je 5 mg (10,2 %) spoja **6** kao zatvorenog oksimskog etera te 5 mg (10%) spoja **6a** kao otvorenog.

(*E*)-9,10-dihidro-4*H*-4,9-metanobenzo[4,5]ciklohepta[1,2-*b*]furan-2-karbaldehid *O*-acetil oksim (6)



6: blijedo žuto ulje, R_f (diklormetan) = 0,58; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ/ppm: 7,34 (d, J = 7,1 Hz, 1H, H_{Ar}), 7,26 (s, 1H, H_G), 7,14 (d, 1H, J = 7,3 Hz, H_{Ar}), 7,10-7,04 (m, 2H, H_{Ar}), 6,04 (s, 1H, H_f), 4,21 (d, 1H, J = 2,4 Hz, H_A), 3,86-3,81 (m, 1H, H_B), 3,78 (d, 1H, J = 4,4 Hz, $H_{C/D}$), 3,63 (dd, 1H, J = 4,4; 2,4 Hz, $H_{C/D}$), 2,45 (d, 1H, J = 10,6 Hz, H_F), 2,34-2,30 (m, 1H, H_E), 1,32 (s, 1H, $C\underline{H}_3$).

(1*E*,3*Z*)-3-((5*R*,9*R*)-7-hidroksi-5,7,8,9-tetrahidro-6*H*-5,9-metanobenzo[7]anulen-6-iliden)propanal *O*-acetil oksim (6a)



6a: žuto ulje, R_f (diklormetan) = 0,64; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ/ppm: 7,29 (d, 1H, J = 7,5 Hz, H_{Ar}), 7,14 (t, 1H, J = 6,9 Hz, H_{Ar}), 7,12-7,04 (m, 3H, $H_{Ar,G}$), 6,04 (d, 1H, J = 1,7 Hz, H_H), 4,77 (d, 1H, J = 5,5 Hz, H_I), 4,20 (d, 1H, J = 2,5 Hz, H_A), 4,00 (d, 1H, J = 12,4 Hz, H_B), 3,93-3,77 (m, 4H, $H_{C,D}$, $C\underline{H}_2$), 3,70 (s, 3H, $C\underline{H}_3$), 3,63 (dd, 1H, J = 5,5; 2,5 Hz, OH), 2,56-2,52 (m, 1H, H_E), 2,45 (d, 1H, J = 10,7 Hz, H_F).

5. ZAKLJUČAK

Formilni derivat furo-benzobiciklo[3.2.1]oktadiena **1** korišten je kao početni spoj za sintezu potencijalno biološki vrlo korisnih oksima i oksimskih etera. Sintetizirani oksimski derivati **2-6a** izolirani su i spektroskopski okarakterizirani. Tijekom sinteze je osim predviđenih produkata došlo i do zanimljivog otvaranja furanskog prstena na bicikličkoj molekuli na dva načina. Do sada još nije točno utvrđeno u kojem stupnju je došlo do otvaranja prstena, je li kod sinteze oksima ili oksimskih etera, no cilj je u budućnosti istraživanjem utvrditi i točan mehanizam. Kod izoliranih oksimskih etera kisikov atom nalazi se kao karbonilna ili hidroksilna skupina na alifatskom cikličkom dijelu molekule na temelju čega se može pretpostaviti da oksimi s kisikovim atomom vezanim za ciklički dio lakše reagiraju u etere.

Izoliranom oksimu **2** i odabranim oksimskim eterima **5**, **7-13** koji su pokazali obećavajuća ADME svojstva ispitana je relativna termodinamička stabilnost kompleksa koji nastaje njihovim smještanjem u aktivno mjesto acetil- i butirilkolinesteraze. Radi usporedbe istim računalnim pristupom ispitana je i relativna stabilnost kompleksa koji nastaje između poznatog inhibitora kolinesteraza huperzina A i aktivnog mjesta enzima. Promjena Gibbsove energije kod kompleksa [aktivno mjesto AChE-huperzin A] bila je –18,5 kcal mol^{-1}, a kod kompleksa [aktivno mjesto BChE-huperzin A] –15,1 kcal mol^{-1}. Kompleks je stabilniji što je promjena Gibbsove energije negativnija. Kod stvaranja kompleksa s acetilkolinesterazom najbolja se pokazala molekula **13** s $\Delta_r G^{298}$ = –17,8 kcal mol^{-1} što se može pripisati *π-π-stacking* interakcijama budući da je aril dio eterske funkcionalne skupine. U slučaju butirilkolinesteraze najstabilniji kompleks s enzimom stvarala je molekula **9** s $\Delta_r G^{298}$ = –14,1 kcal mol^{-1} koja ima dugački heksilni lanac kao dio eterske skupine koji dobro pristaje u acilni džep enzima.

Molekule koje stvaraju stabilnije komplekse s enzimom trebale bi imati i jaču sposobnost inhibicije. Ovi rezultati mogu koristiti kao smjernica koje do sada nesintetizirane spojeve sintetizirati i eksperimentalno im ispitati biološku aktivnost. Spojevima koji se eksperimentalno pokažu kao dobri inhibitori ili reaktivatori enzima u cilju je optimirati reakcijske uvjete kako bi se dobila što veća iskorištenja i količine.

6. LITERATURA

1. Watts, P., Wiles, C., Micro reactors, flow reactors and continuous flow synthesis, J. Chem. Res., **36**(4) (2012) 181–193.
2. Bosak, A., Katalinić, M., Kovarik, Z., Kolinesteraze: struktura, uloga, inhibicija, Arh. Hig. Rada Toksikol., **62**(2) (2011) 175–190.
3. Čolović, M.B., Krstić, D.Z., Lazarević-Pašti, T.D., Bondžić, A.M., Vasić, V.M., Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology, Curr. Neuropharmacol., **11**(3) (2013) 315–335.
4. Houghton, P.J., Ren, Y., Howes, M.J., Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi, Nat. Prod. Rep., **23**(2) (2006) 181-199.
5. Mary, G.P.K.S., A theoretical study of biologically important molecules, Doctoral dissertation, National University of Singapore, 2003, 110-140.
6. Budryn, G., Grzelczyk, J., Jaśkiewicz, A., Żyżelewicz, D., Pérez-Sánchez, H., Cerón-Carrasco, J.P., Evaluation of butyrylcholinesterase inhibitory activity by chlorogenic acids and coffee extracts assed in ITC and docking simulation models, Food Res. Int., **109** (2018) 268–277.
7. https://www.rcsb.org/structure/2X8B (pristup 25. ožujka 2019.)
8. Maraković, N., Knežević, A., Vinković, V., Kovarik, Z., Šinko, G., Design and synthesis of *N*-substituted-2-hydroxyiminoacetamides and interactions with cholinesterases, Chemico-Biological Interactions, **259** (2016) 122-132.
9. Ribeiro, T.S., Prates, A., Alves, S.R., Oliviera-Silva, J.J., Riehlcand, C.A.S., Figueroa-Villar, J.D., The effect of neutral oximes on the reactivation of human acetylcholinesterase inhibited with paraoxon, J. Braz. Chem. Soc., **23**(7) (2012) 1216-1225.
10. Holas, O., Musilek, K., Pohanka, M., Kuca, K., The progress in the cholinesterase quantification methods, Expert Opin. Drug Discov., **7**(12) (2012) 1207–1223.
11. https://www.rcsb.org/structure/2j4c (pristup 25. ožujka 2019.)
12. Andrisano, V., Naldi, M., De Simone, A., Bartolini, M., A patent review of butyrylcholinesterase inhibitors and reactivators 2010–2017, Expert Opin. Ther. Pat., **28**(6) (2018) 455–465.
13. Da Cunha Xavier Soares, S.F., Vieira, A.A., Delfino, R.T., Figueroa-Villar, J.D., NMR determination of Electrophorus electricus acetylcholinesterase inhibition and reactivation by neutral oximes, Bioorganic Med. Chem., **21**(18) (2013) 5923–5930.

14. Kovarik, Z., Katalinić, M., Bosak, A., Šinko, G., Cholinesterase interactions with oximes, Current Bioactive Compounds, **6** (2010) 9-15.
15. Rochais, C., Lecoutey, C., Gaven, F., Giannoni, P., Hamidouche, K., Hedou, D. et al., Novel Multitarget-Directed Ligands (MTDLs) with Acetylcholinesterase (AChE) Inhibitory and Serotonergic Subtype 4 Receptor (5-HT_4R) Agonist Activities As Potential Agents against Alzheimer's Disease: The Design of Donecopride, J. Med. Chem., **58**(7) (2015) 3172–3187.
16. Gouri, K.S., Evaluation of Drug Treatment Options for Alzheimer'S Disease - a Review of Earlier Studies, World J. Pharm. Pharm. Sci., **6**(4) (2017) 177–182.
17. http://alzheimers.alliedacademies.com/events-list/http-alzheimers-alliedacademies-com (pristup 25. ožujka 2019.)
18. Mazanetz, M.P., Laughton, C.A., Fischer, P.M., Investigation of the flexibility of protein kinases implicated in the pathology of Alzheimer's disease, Molecules, **19**(7) (2014) 9134–9159.
19. Porcheddu, A., Giacomelli, G., Synthesis of Oximes and Hydroxamic Acids, u: Rappoport, Z., Liebman, J.F., The chemistry of Hydroxylamines, Oximes and Hydroxamic Acids, New York, John Wiley & Sons, (2009) 163-231.
20. Meyer, V., Janny, A., Ueber stickstoffhaltige aceronderivate, Ber. Dtsch. Chem. Ges., **15** (1882) 1164–1167.
21. Tapper, B.A., Conn, E.E., Butler, G.W., Conversion of alpha-keto-isovaleric acid oxime and isobutyraldoxime to linamarin in flax seedlings, Biochem. Biophys., **119** (1967) 593-595.
22. Benn, M., The synthesis of glucosinalbin and glucoaubrietin, Can. J. Chem., **43** (1965) 1–5.
23. Underhill, E.W., Biosynthesis of mustard oil glucosides: conversion of phenylacetaldehyde oxime and 3-phenylpropionaldehyde oxime to glucotropaeolin and gluconasturtiin, Eur. J. Biochem., **2** (1967) 61–63.
24. Sørensen, M., Neilson, E.H.J., Møller, B.L., Oximes: Unrecognized Chameleons in General and Specialized Plant Metabolism, Mol. Plant, **11**(1) (2018) 95–117.
25. Kolandaivel, P.G., Kuze, N., Sakaizumi, T., Ohashi, O., Iijima, K., Molecular Structures and Rotational Potential Energy Surfaces of E and Z Geometrical Isomers of Propionaldehyde Oxime: ab Initio and DFT Studies, J. Phys. Chem., **101**(A) (1997) 2873-2878.
26. U.S. Pat. 6316612 (2001) Matulic-Adamic, J., Beilgelman, L.

27. Mann, F.G., Saunders, B.C., Practical Organic Chemistry. 4th ed., Longmans, Green and Co, New York, 1974, str. 93.
28. Tennant, G., The Synthesis and Reactions of Organic Compounds, u: Comprehensive Organic Chemistry, 2nd ed., Oxford, Pergamon Press, (1979) 383–590.
29. Nsikabaka, S., Harb, W., Ruiz-Lopez, M.F., The role of water on the acid-promoted E/Z isomerization of oximes in aqueous solution, J. Mol. Struct., **764** (2006) 161-166.
30. A. Pereira, M.M., Santos, P.P., Rearrangements of Hydroxylamines, Oximes and Hydroxamic Acids, u: Rappoport, Z., Liebman, J.F., The chemistry of Hydroxylamines, Oximes and Hydroxamic Acids, New York, John Wiley & Sons, (2009) 343–498.
31. Lee, B.S., Chu, S., Lee, I.Y., Lee, B.S., Song, C.E., Chi, D.Y., Beckmann rearrangements of 1-indanone oxime derivatives using aluminum chloride and mechanistic considerations, Bull. Korean Chem. Soc., **21** (2000) 860-866.
32. Padwa, A., Photochemistry of the carbon-nitrogen double bond, Chem. Rev., **77** (1977) 37-68.
33. Politzer, P., Murray, J.S., Some intrinsic features of hydroxylamines, oximes and hydroxamic acids : Integration of theory and experiment, u: Rappoport, Z., Liebman, J.F., The chemistry of Hydroxylamines, Oximes and Hydroxamic Acids, New York, John Wiley & Sons, (2009) 1-27.
34. Aslam, S., Khakwani, S., Nazeer, A., Shahi, M.N., Yaqoob, A., Shafiq, H. et al., Synthesis of Arylfurfural Oximes and Their Biological Evaluation, Asian J. Chem., **28**(6) (2016) 1210–1214.
35. Abele, E., Lukevics, E., Synthesis of Heterocycles from Oximes, u: Rappoport, Z., Liebman, J.F., The chemistry of Hydroxylamines, Oximes and Hydroxamic Acids, New York, John Wiley & Sons, (2009) 233–302.
36. Robertson, G.M., Imines and their N-Substituted Derivatives: Oximes and their O-R Substituted Analogues, u: Katritzky, A.R., Meth-Cohn, O., Rees, C.W., Comprehensive Organic Functional Group Transformation, 3rd ed., Oxford, (1995) 425-441.
37. Kobayashi, S., Ishitani, H., Catalytic Enantioselective Addition to Imines, Chem. Rev., **99** (1999) 1069-1094.
38. Adams, J.P., Robertson, G., Imines, enamines and related functional groups, Contemp. Org. Synth., **4** (1997) 183-195.
39. Adams, J.P., Imines, enamines and oximes, Contemp. Org. Synth, **4** (1997) 517-543.
40. Adams, J.P., Imines, enamines and oximes, J. Chem. Soc., Perkin Trans, **1** (2000) 125-139.

41. Kotali, A., Papageorgiou, V.P., The Chemistry of 1,3-Dioximes. A Brief Review, Org. Prep. Proced. Int., **23** (1991) 593-610.
42. Tsay, S.-C., Patel, H. V., Hwu, J.R., Recent developments of compounds containing the nitrogen-oxygen moiety in organic synthesis, Synlett, (1998) 939-949.
43. Zhu, Q.X., Hutchins, R.O., Hutchins, M.K., Asymmetric reductions of carbon-nitrogen double bonds. A review, Org. Prep. Proced. Int, **26** (1994) 193-235.
44. Enders, D., Reinhold, U., Asymmetric synthesis of amines by nucleophilic 1,2-addition of organometallic reagents to the CN-double bond, Tetrahedron: Assymmetry, **8** (1997) 1895-1946.
45. Yurovskaya, M., Karchava, A. V., Stereoselective reduction of endocyclic carbon-nitrogen double bond: application to the synthesis of biomolecules, **9** (1998) 3331-3352.
46. Dewan, S.K., Singh, R., Kumar, A., One pot synthesis of nitriles from aldehydes and hydroxylamine hydrochloride using sodium sulphate (anhyd) and sodium bicarbonate in dry media under microwave irradiation, Arkivoc, (2006) 41-44.
47. Dave, P.R., Forohar, F., Axenrod, T., Das, K.K., Qi, L., Watnick, C. et al., Facile Preparation of 3,7-Diazabicyclo[3.3.0]octane and 3,7,10-Triheterocyclic[3.3.3] Propellane Ring Systems from 1,5-Diazacyclooctane 3,7-Derivatives[1], J. Org. Chem., **61** (1996) 8897-8903.
48. Ballistreni, F.P., Barbuzzi, E., Tomaselli, G.A., Toscano, R.M., Useful Oxidation Procedure of Oximes to Nitro Compounds with Benz-Mo in Acetonitrile, Synlett, **11** (1996) 1093-1094.
49. Smith, P.A.S., Gloyer, S.E., Oxidation of dibenzylhydroxylamines to nitrones. Effects of structure and oxidizing agent on composition of the products, J. Org. Chem., **40** (1975) 2508-2512.
50. Negi, S., Matsukura, M., Mizuno, M., Miyake, K., Minami, N., Synthesis of (2R)-1-(4-Chloro-2-pyridyl)-2-(2-pyridyl) ethylamine: a selective oxime reduction and crystallization-induced asymmetric transformation, Synthesis, (1996) 991-996.
51. Narasaka, K., Synthesis of azaheterocycles from oxime derivatives, Pure. Appl. Chem., **75**(1) (2003) 19-28.
52. Ramalingan, C., Park, Y.-T., Mercury-Catalyzed Rearrangement of Ketoximes into Amides and Lactams in Acetonitrile, J. Org. Chem., **72** (2007) 4536-4538.
53. Furuya, Y., Ishihara, K., Yamamoto, H., J. Am. Chem. Soc., **127** (2005) 11240-11241.
54. Lu, X., Guan, Y., Xu, H., Wu, H., Wu, P., Clean synthesis of furfural oxime through

liquid-phase ammoximation of furfural over titanosilicate catalysts, Green Chem., **19**(20) (2017) 4871–4878.

55. Datta, A., Walia, S., Parmar, B.S., Some furfural derivatives as nitrification inhibitors, J. Agric. Food Chem., **49**(10) (2001) 4726–4731.
56. Kumar, R., Parmar, B.S., Walia, S., Saha, S., Nutrient Use Efficiency: from Basics to Advances, New Delhi, Springer, 2015.
57. Townshed, A., Burns, D.T., Lobinski, R., Newman, E.J., Guilbault, G.G., Marczenko, Z. et al., Dictionary of Analytical Reagents, 1st ed., London, Chapman & Hall, 1993.
58. Ponikvar, M., Liebman, J.F., Use of oximes, hydroxamic acids and related species as reagents in inorganic analytical chemistry, u: Rappoport, Z., Liebman, J.F., The Chemistry of Hydroxylamines, Oximes and Hydroxamic Acids The Chemistry of Functional Groups, New York, John Wiley & Sons, (2009) 515–552.
59. Bergman, J., Egestad, B., Rajapaksa, D., X-Ray Crystal and Molecular-Structure Determination of a Benzo[1,2-B-4,5-B']BisBenyofuran Derivative Formed by Base-Induced Condensation of 3(2h)-Benzofurane, Acta Chem. Scand. Ser. B-Org. Chem. Biochem., **33** (1979) 405–409.
60. Dijk, J. V, Zwagmakers, J.M.A., Oxime Ether Derivatives, A New Class of Nonsteroidal Antiinflammatory Compounds, J. Med. Chem., **20** (1977) 1199–1206.
61. Fravolini, A., Schiaffella, F., Orzalesi, G., Selleri, R., Volpato, I., Oxime Ether Derivatives of Thochroman-4-ones as Beta-Adrenergic Blocking-Agents, Eur. J. Med. Chem., **13** (1978) 347–350.
62. Burditt, S.J., Hamilton, P.B., Mold Inhibitory Activity of a N-Oxime Ether, Poult. Sci, **62** (1983) 2183–2186.
63. Delmas, F., Gasquet, M., Timondavid, P., Madadi, N., Vanelle, P., Vaille, A. et al., Synthesis and In vitro Anti-Protazoan Activity of New 5-Nitrothiphene Oxime Ether Derivatives, Eur. J. Med. Chem., **28** (1993) 23–27.
64. Chowdhury, H., Saxean, V.S., Synthesis and Insect Growth Regulatory Activity of Alkoxy-Substituted Benyaldoxime Ethers, J. Agric. Food. Chem., **46** (1998) 731-736.
65. Kirilmis, C., Koca, M., Çukurovali, A., Ahmedzade, M., Kazaz, C., Synthesis, Reactivity and Biological Activity of Novel Bisbenzofuran-2-yl-Methanone Derivatives, **10** (2005) 1399–1408.
66. Abid, M., Husain, K., Azam, A., Synthesis and antiamoebic activity of new oxime ether derivatives containing 2-acetylpyridine/2-acetylfuran, Bioorganic Med. Chem. Lett., **15**(19) (2005) 4375–4379.

67. Prabhu, V.A., Brown, R.G., Delgado, J.N., Synthesis and Structure-Activity Relationships of Selected Tricyclic Oxime O-Ethers as Potential Anticholinergic Agents, J. Pharm. Sci., **70** (1981) 558-562.

68. Toshio, N., Akira, M., Masato, M., Nobushige, I., Isamu, N., Masanori, H., Chem. Abstr., **92** (1980) 198103b.

69. George, H., Wynona, M.P.J., Kurt, R., Christopher, T. V, Chem. Abstr., **101** (1984) 210639v.

70. Zhang, A., Fu, P., Zhang, Z., Chen, H., Yu, P., Design, Synthesis and Evaluation of Novel Chloro-oxime derivatives for Neurodegenerative Diseases, J. Pharm. Biomed. Sci., **6**(1) (2016) 31-38.

71. Hakkinen, T., Luoma, J.S., Hiltunen, M.O., Macphee, C.H., Milliner, K.J., Patel, L. et al., Lipoprotein-Associated Phospholipase A2, Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase, Is Expressed by Macrophages in Human and Rabbit Atherosclerotic Lesions, Arter. Thromb. Vasc. Biol., **19** (1999) 2909-2917.

72. Benson, G.M., Grimsditch, D., Milliner, K., Moores, K., Bodz, H., Tew, D. et al., XIIth International Symposium on Athelosclerosis, Sweden, 2000.

73. Tjoelker, L.W., Eberhardt, C., Unger, J., Trong, H.L., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M. et al., Plasma platelet-activating factor acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad, J. Biol. Chem., **270** (1995) 25481-25487.

74. Jeong, H.J., Park, Y.-D., Park, H.-Y., Jeong, I.Y., Jeong, T.-S., Lee, W.S., Potent inhibitors of lipoprotein-associated phospholipase A2: Benzaldehyde O-heterocycle-4-carbonyloxime, Bioorganic Med. Chem. Lett., **16**(21) (2006) 5576–5579.

75. Wong, L., Radi, Z., Bruggemann, R.J., Hosea, N., Berman, H.A., Taylor, P., Mechanism of Oxime Reactivation of Acetylcholinesterase Analyzed nz Chirality and Mutagenesis, Biochemistry, **39** (2000) 5750–5757.

76. Kovarik, Z., Radić, Z., Berman, H.A., Simeon-Rudolf, V., Reiner, E., Taylor, P., Mutant cholinesterases possessing enhanced capacity for reactivation of their phosphonylated conjugates, Biochemistry, **43** (2004) 3222–3229.

77. Zueva, I. V., Lushchekina, S. V., Masson, P., Water structure changes in oxime-mediated reactivation process of phosphorylated human acetylcholinesterase, Biosci. Rep., **38**(3) (2018) BSR20180609 1-10.

78. Luo, C., Saxena, A., Smith, M., Garcia, G., Radić, Z., Taylor, P. et al., Phosphoryl Oxime Inhibition of Acetylcholinesterase during Oxime Reactivation is Prevented by Edrophonium, Biochemistry, **38** (1999) 9937–9947.

79. Kuća, K., Musilek, K., Jun, D., Nepovimova, E., Soukup, O., Korabecny, J. et al., Oxime K074–in vitro and in silico reactivation of acetylcholinesterase inhibited by nerve agents and pesticides, Toxin Rev., (2018) 1–10.
80. Kuća, K., Juna, D., Musilek, K., Structural Requirments of Acetylcholinesterase Reactivators, Mini Rev. Med. Chem., **6**(3) (2006) 269–277.
81. Hobbiger, F., Reactivation of Phosphorylated Acetylcholinesterase, u: Cholinesterases and Anticholinesterase Agents, Berlin, Springer-Verlag, (1963) 921–988.
82. Gray, A.P., Design and structure-activity relationship of antidote to organophosphorus anticholinesterase agents, Drug Metab. Rev., **15** (1984) 557–589.
83. Maček Hrvat, N., Kolinesteraze i oksimi kao pseudokatalitička čistila živčanih bojnih otrova, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2015.
84. Dawson, R.M., Review of oximes available for the treatment of nerve agent poisoning, J. Appl. Toxicol., **14** (1994) 317–331.
85. Jokanović, M., Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides, Toxicol. Lett., **190** (2009) 107–115.
86. Ashani, Y., Silman, I., Hydroxylamines and Oximes: Biological Properties and Potential Uses as Therapeutic Agents, u: Rappoport, Z., Liebman, J.F., The chemistry of Hydroxylamines, Oximes and Hydroxamic Acids, New York, John Wiley & Sons, (2009) 609–651.
87. Rajapurkar, M. V, Koelle, G.B., Smart, P., J Pharmacol Exp Ther, **123** (1958) 247.
88. Cohen, E.M., Wiersinga, H., Oximes in the treatment of nerve gas poisoning, Acta Physiol. Pharmacol. Neerl., **8** (1959) 40-51.
89. Fleischer, J.H., Harris, L.W., Berkowitz, P.T., Dephosphorylation in vivo of brain acetylcholinesterase inhibited by isopropyl methylphosphonofluoridate (sarin), Biochem. Pharmacol., **19** (1970) 421-426.
90. Ecobichon, D.J., Species differences in the reactivation of organophosphate-inhibited plasma esterases by diacetymonoxime, Can. J. Physiol. Pharmacol., **54** (1976) 86-92.
91. Srivastava, A.K., Malik, J.K., Indian Vet. Med. J., **25** (2001) 49.
92. Lorke, D.E., Kalasy, H., Petroianu, G.A., Tekes, K., Entry of oximes into the brain: a review, Curr. Med. Chem., **15** (2008) 743–753.
93. Bajgar, J., Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis and treatment, Adv. Clin. Chem., **38** (2004) 151–216.
94. Bosak, A., Organofosforni spojevi, klasifikacija i reakcije s enzimima, Arh. Hig. Rada

Toksikol., **57** (2006) 445–457.

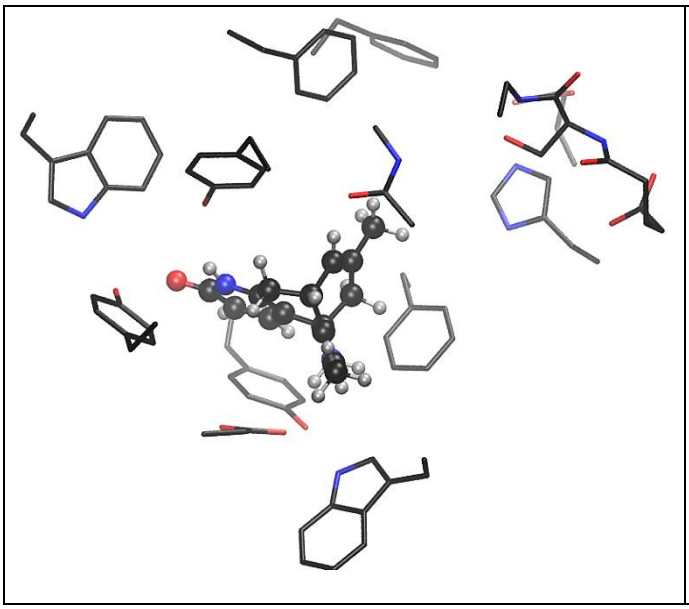
95. Delfino, R.T., Ribeiro, T.S., Figueroa/Villar, J.D., Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review, Braz. Chem. Soc., **20** (2009) 407–428.
96. Jokanović, M., Stojiljković, M.P., Current understanding and application of pyridinium oximes as cholinesterase reactivators in treatment of organophosphate poisoning, Eur. J. Pharmacol., **533** (2006) 10–17.
97. Knudsen, J.T., Tollsten, L., Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in moth-pollinated taxa, Bot J Lin Soc, **113** (1993) 263–284.
98. Knudsen, J.T., Eriksson, R., Gershenzon, J., Stahl, B., Diversity and distribution of floral scent, Bot. Rev., **72**(1) (2006) 1-120.
99. Wang, R., Yan, H., Tang, X.C., Progress in studies of huperzine A, a natural cholinesterase inhibitor from Chinese herbal medicine, Acta Pharmacol. Sin., **27**(1) (2006) 1–26.
100. Šagud, I., Škorić, I., Vuk, D., Ratković, A., Burčul, F., Acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activity of selected photochemicallysynthesized polycycles, Turkish J. Chem., **43**(4) (2019) 1170–1182.
101. Ratković, A., Marinić, Ž., Škorić, I., Flow-photochemical synthesis of the functionalized benzobicyclo[3.2.1]octadiene skeleton, J. Mol. Struct., **1168** (2018) 165–174.
102. Kikaš, I., Škorić, I., Marinić, Ž., Šindler-Kulyk, M., Synthesis and phototransformations of novel styryl-substituted furo-benzobicyclo[3.2.1]octadiene derivatives, Tetrahedron, **66**(48) (2010) 9405–9414.
103. https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/4241 (pristup 26. ožujka 2019.)
104. Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S. et al., AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility, J. Comput. Chem., **16** (2009) 2785–2791.
105. Raves, M.L., Harel, M., Pang, Y.-P., Silman, I., Kozikowski, A.P., Sussman, J.L., Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)-huperzine A., **4** (1997) 57–63.
106. Nicolet, Y., Lockridge, O., Masson, P., Fontecilla-Camps, J.C., Nachon, F., Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Products, J. Biol. Chem., **278**(42) (2003) 41141–41147.
107. Frisch, M. et al., Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
108. Siegbahn, P.E.M., Himo, F., The quantum chemical cluster approach for modeling enzyme reactions, Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci., **1**(3) (2011) 323–336.

7. ŽIVOTOPIS

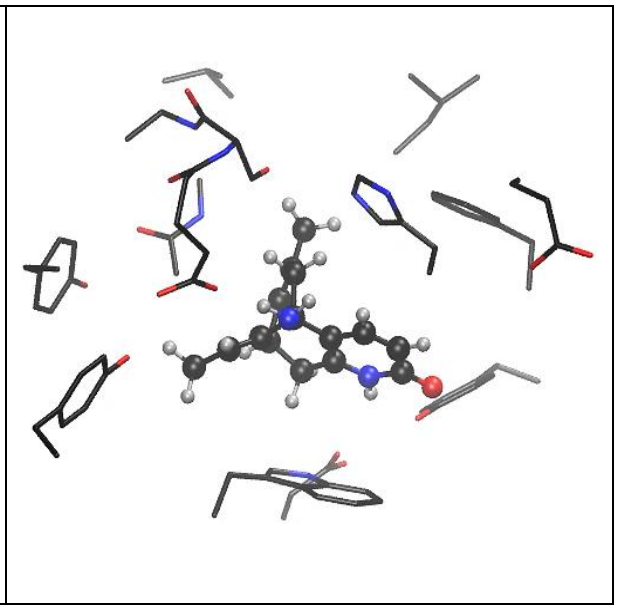
Kristina Pavlović,[redacted] maturirala je 2014. u Gimnaziji Karlovac, opći smjer. Iste godine upisala je preddiplomski studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom preddiplomskog studija stručnu praksu odradila je u Zavodu za javno zdravstvo Karlovačke županije, Odjel za zdravstvenu ekologiju, gdje se upoznala s kemijskom i fizikalnom analizom pitkih, podzemnih i otpadnih voda te analizom kvalitete zraka. Završni rad, naslova *Fotokemijske transformacije 4-piridinskih derivata stilbena*, odradila je u Zavodu za organsku kemiju pod mentorstvom prof. dr. sc. Irene Škorić. Nakon završetka preddiplomskog studija 2017. godine, upisala je diplomski studij na istom fakultetu, modul Primijenjena organska kemija, tijekom kojega je radila kao demonstrator na vježbama iz kolegija Organska kemija I i Organska kemija II. Tijekom zadnjeg semestra diplomskog studija odradila je stručnu praksu u Austriji u području kemoinformatike u trajanju od 3 mjeseca putem ERASMUS+ programa te dodatnih 3 mjeseca putem IAESTE programa.

8. PRILOZI

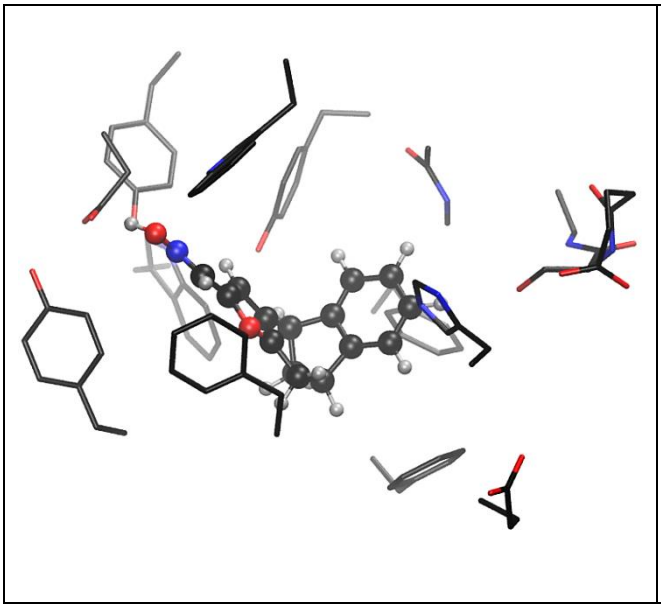
[aktivno mjesto **AChE-huperzin A**]



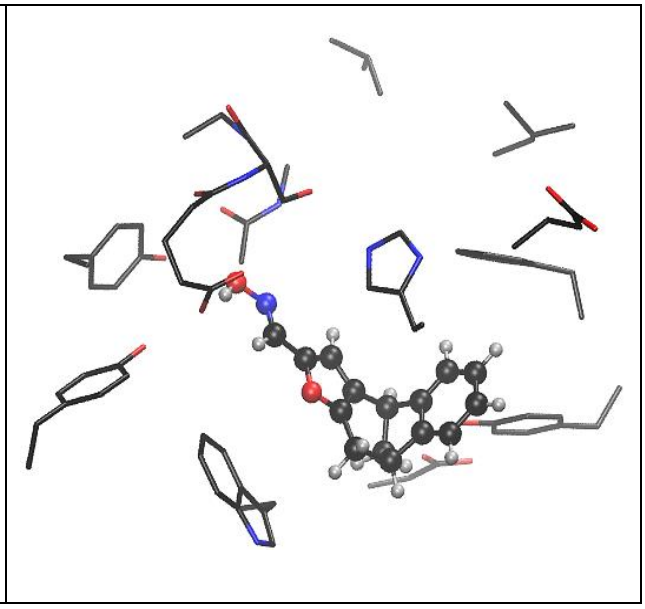
[aktivno mjesto **BChE-huperzin A**]



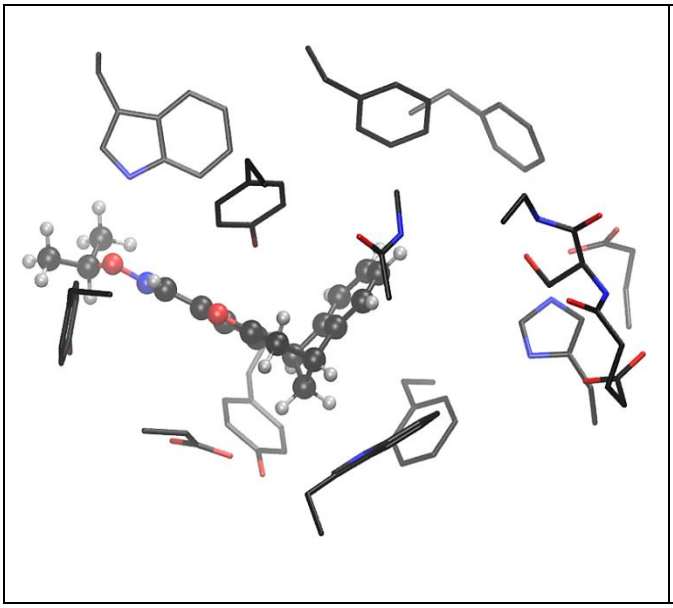
[aktivno mjesto **AChE**-molekula **2**]



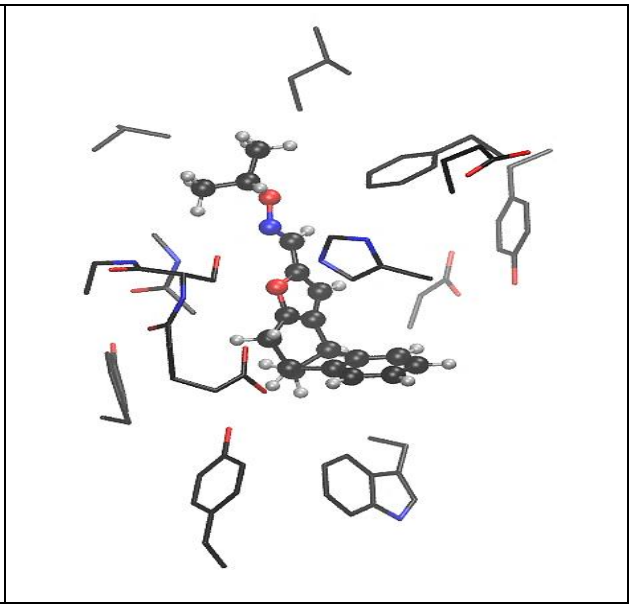
[aktivno mjesto **BChE**-molekula **2**]



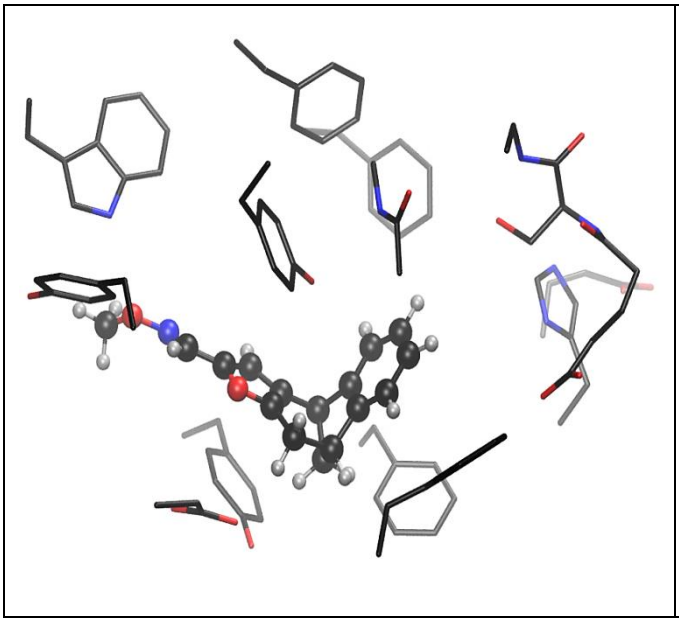
[aktivno mjesto **AChE**-molekula **5**]



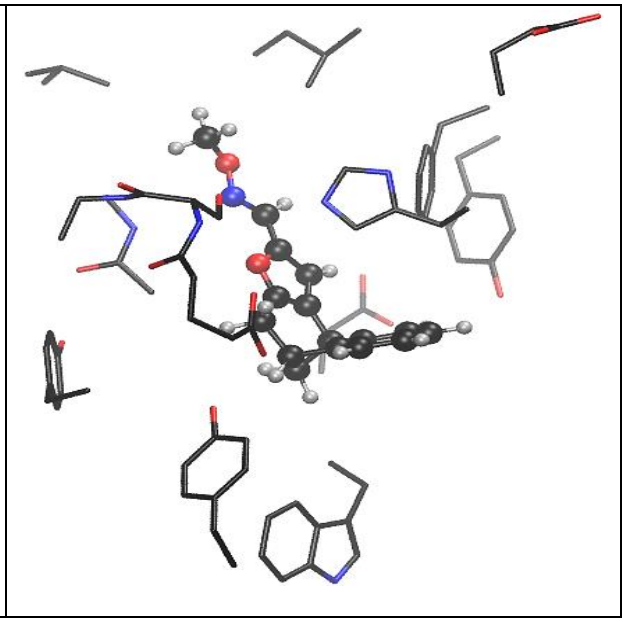
[aktivno mjesto **BChE**-molekula **5**]



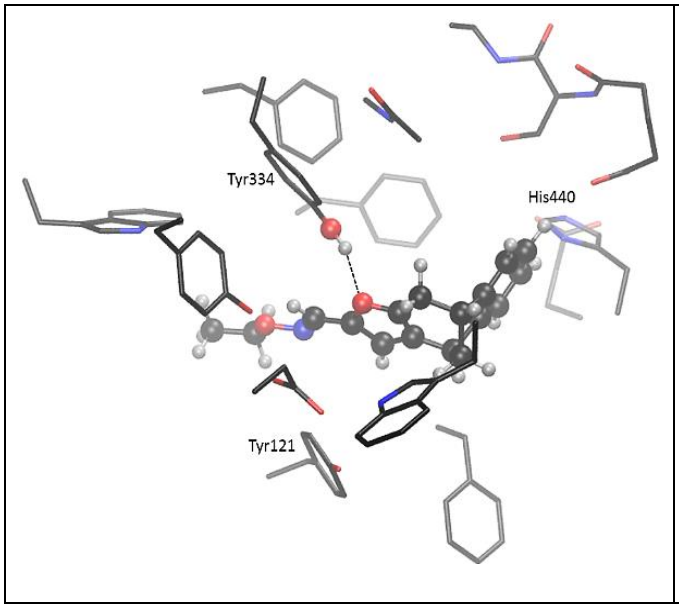
[aktivno mjesto **AChE**-molekula **7**]



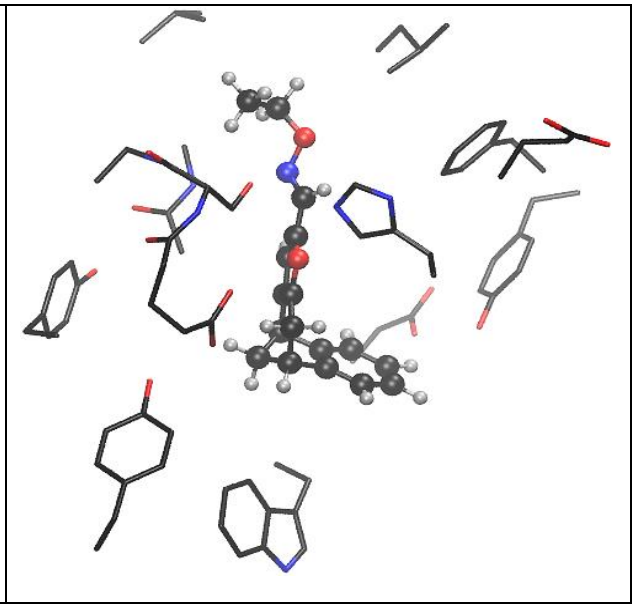
[aktivno mjesto **BChE**-molekula **7**]



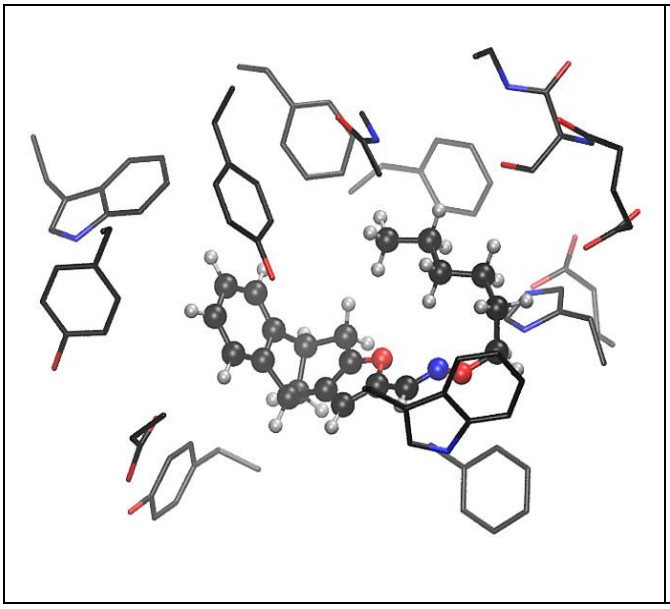
[aktivno mjesto **AChE**-molekula **8**]



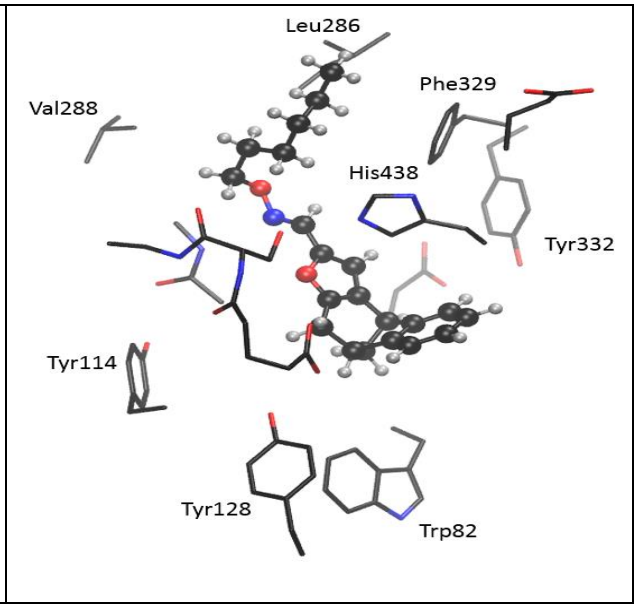
[aktivno mjesto **BChE**-molekula **8**]



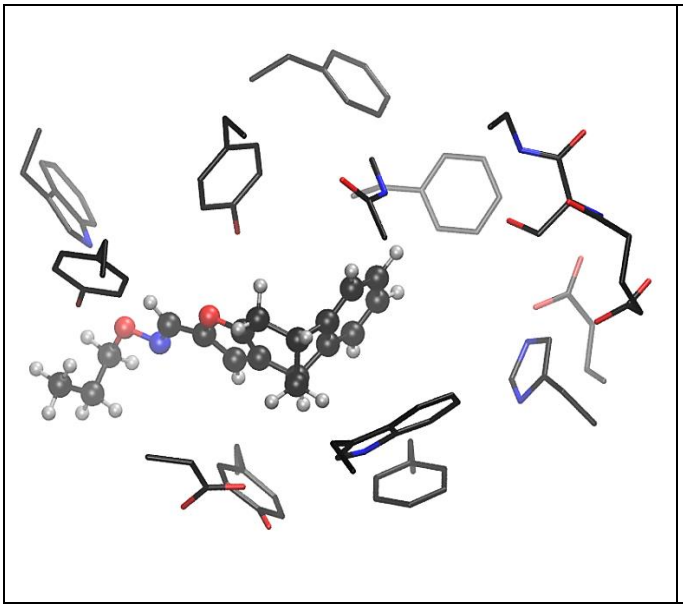
[aktivno mjesto **AChE**-molekula **9**]



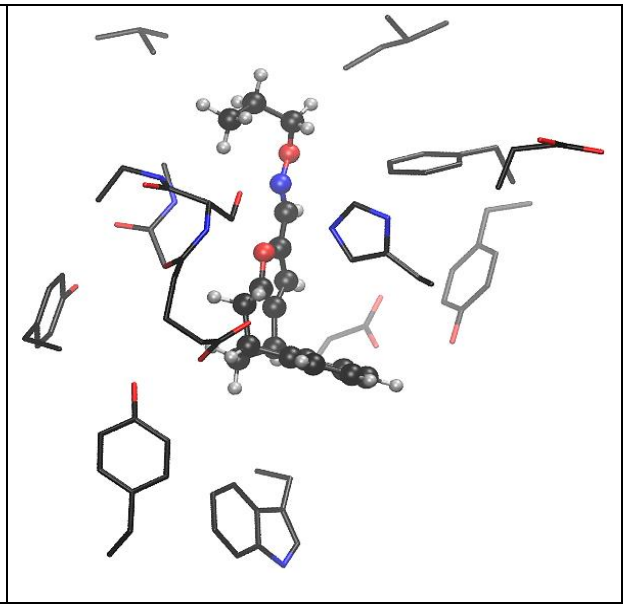
[aktivno mjesto **BChE**-molekula **9**]



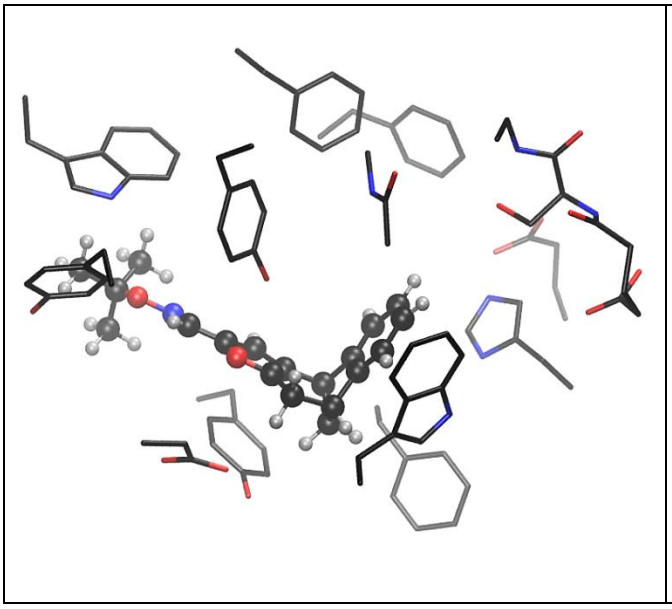
[aktivno mjesto **AChE**-molekula **10**]



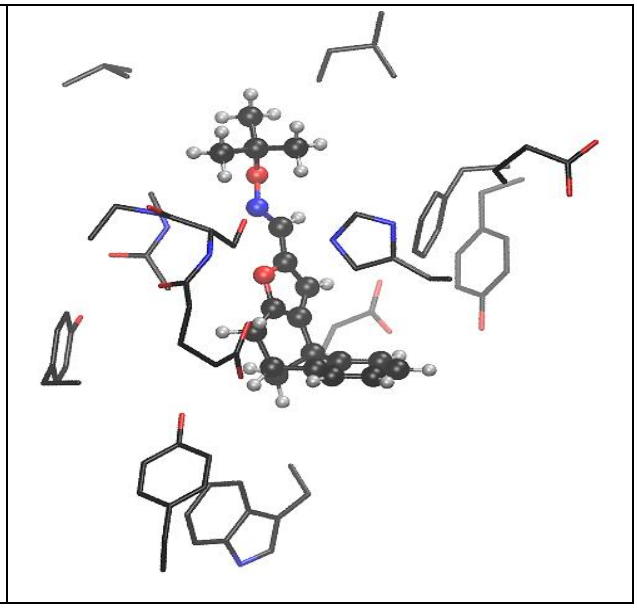
[aktivno mjesto **BChE**-molekula **10**]



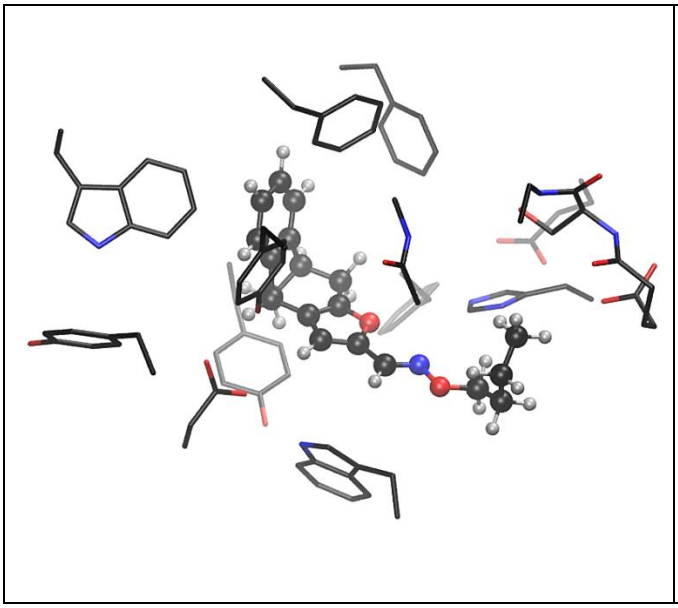
[aktivno mjesto **AChE**-molekula **11**]



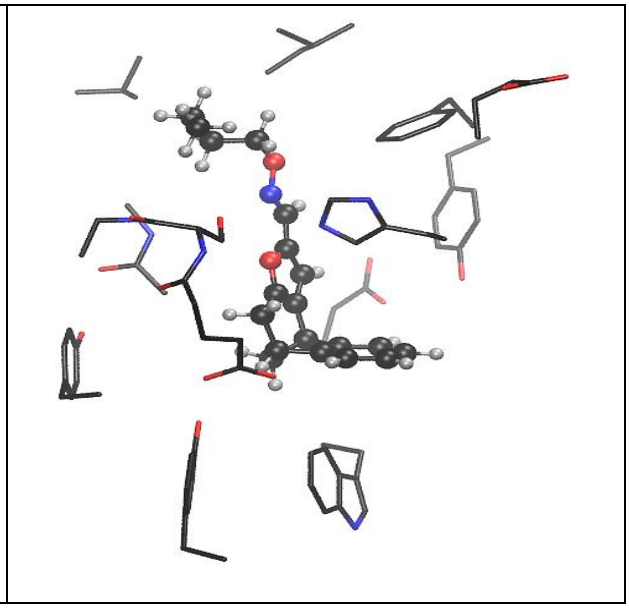
[aktivno mjesto **BChE**-molekula **11**]



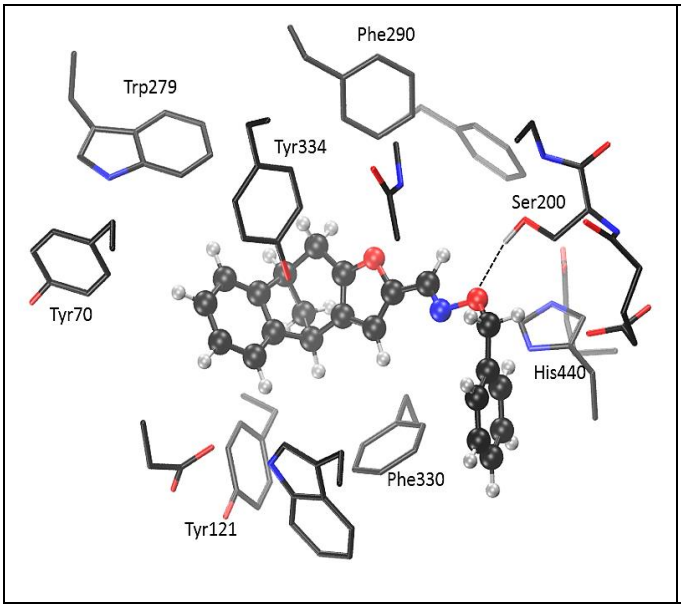
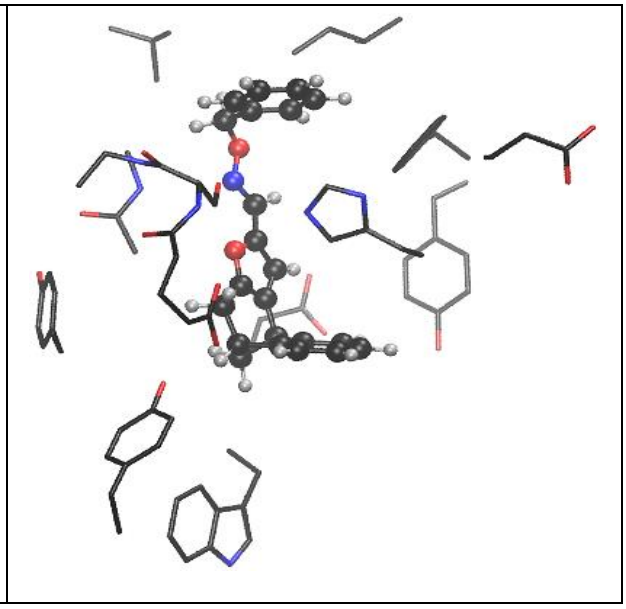
[aktivno mjesto **AChE**-molekula **12**]



[aktivno mjesto **BChE**-molekula **12**]



[aktivno mjesto **AChE**-molekula **13**]



[aktivno mjesto **BChE**-molekula **13**]