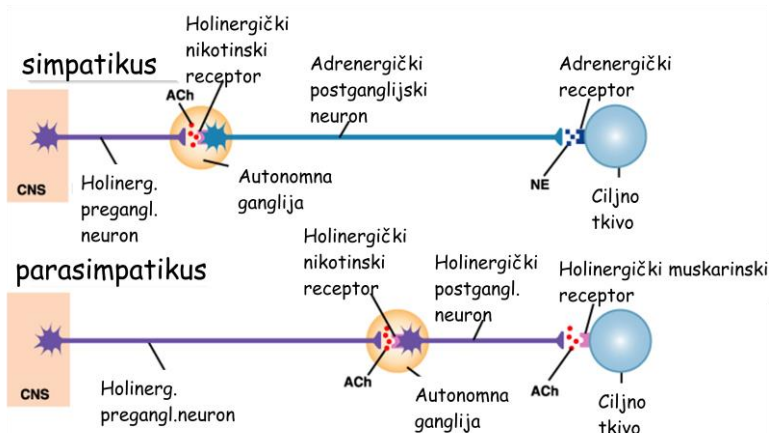


## 5.0. LEKOWI KOJI DELUJU NA HOLINERGIČKU TRANSMISIJU

Dva glavna neurotransmitera u autonomnom nervnom sistemu su acetilholin i noradrenalin. Neurotransmisija koja se odvija putem acetilholina naziva se holinerškička transmisija a nervna vlakna koja na svojim krajevima oslobađaju acetilholin (holinerškički neuroni). Holinerškički su lekovi koji moduliraju aktivnost acetilholina.

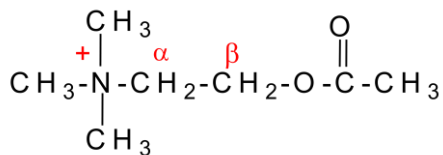
Acetilholin (ACh) se oslobađa na preganglijskim vlaknima parasimpatikusa i simpatikusa i postganglijskim vlaknima parasimpatikusa. Na postganglijskim vlaknima simpatikusa uglavnom se oslobađa noradrenalin. Postoji nekoliko izuzetaka kao što su simpatikusna nervna vlakna koja inervišu znojne žlezde i krvne sudove kože na čijim krajevima se oslobađa acetilholin kao i nadbubrežna žlezda koja je inervisana preganglijskim nervima simpatikusa (oslobađaju ACh).

Acetilholin se oslobađa i na krajevima neurona enteričkog nervnog sistema gde učestvuje u regulaciji peristaltike creva, na nervno-mišićnoj ploči gde prenosi signal za kontrakciju mišića. Acetilholin se izlučuje u nekim delovima CNS gde reguliše brojne procese kao što su spavanje, pamćenje, moždana aktivnost...



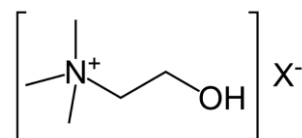
Izvor: <http://www.austincc.edu/apreview/PhysText/PNSEfferent.html>

U pogledu strukture, acetilholin predstavlja estar sirćetne kiseline i holina.



Acetilholin

2-acetoksi-N,N,N-trimetiletanamonijum (hlorid)



Holin

N,N,N-trimetiletanolamonijum katjon

Slika 1. Struktura acetilholina

Acetilholin se sintetiše u citoplazmi nevnih završetaka iz aminoalkohola holina i acetil koenzima A. Nervne ćelije ne mogu sintetisati holin već ga preuzimaju iz okoline putem aktivnog transporta. Najveće količine holina potrebne za sintezu obezbeđuju se hidrolizom acetilholina.

“Rezerve” holina nalaze se u fosfatidilholinu (u plazmi), u fosforilholinu (u lipidima) a određene količine nastaju u organizmu, iz aminokiseline serina. Enzim koji katalizuje sintezu Ach je holinacetiltransferaza i nalazi se samo u završecima holinergičkih nevnih vlakana. Sintetisani Ach se deponuje u vezikulama iz kojih se oslobađa u sinaptičku pukotinu kada akcioni potencijal stigne do kraja nervnog završetka.

Acetilholin svoje efekte ostvaruje vezivanjem za receptore na postsinaptičkoj membrani. Nakon disocijacije kompleksa Ach-receptor, Ach se iz sinaptičke pukotine uklanja dejstvom enzima acetilholin esteraze. Ovaj enzim se nalazi na spoljnoj površini glijna ćelija (samo u holinergičkim neuronima) i katalizuje hidrolizu Ach. Osim navedenog enzima, u krvotoku su prisutne nespecifične esteraze koje takođe hidrolizuju acetilholin (poznate pod nazivom plazma esteraze, butilholinesteraze, serum esteraze, pseudoholinesteraze).

### 5.0.1. Holinergički receptori

Postoje dva tipa holinergičkih receptora koji se razlikuju po distribuciji i farmakološkoj funkciji: nikotinski i muskarinski. Nikotinski receptori su dobili naziv prema alkaloidu nikotinu (izolovan iz duvana); muskarinski prema muskarinu (izolovan iz jedne vrste gljiva- *Amanita Muscaria*). Nikotin se vezuje samo nikotinske, muskarin za muskarinske receptore dok se Ach vezuje za oba tipa holinergičkih receptora.

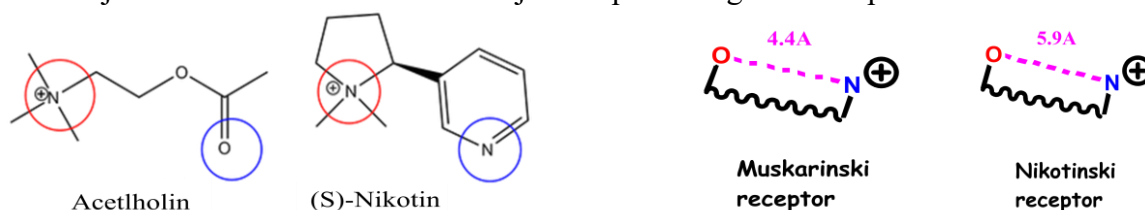
Nikotinski receptori su ligand zavisni jonski kanali za  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ . Sastoje se od pet subjedinica (pentameri) i nalaze se u autonomnim ganglijama, nadbubrežnoj žlezdi i skeletnim mišićima. Postoje dva tipa nikotinskih receptora, N1 i N2. N1 receptori se nalaze na nervno-mišićnoj ploči, dok su N2 prisutni u autonomnim ganglijama. Transmisija koja se ostvaruje putem ovih receptora je brza i traje nekoliko mili sekundi. Nikotinski receptori su nađeni i u CNS ali njihova uloga nije u potpunosti razjašnjena.

Muskarinski receptori se nalaze u srcu, glatkim mišićima i egzokrinim žlezdama. Muskarinski receptori su receptori vezani za G protein. Vezivanjem Ach dolazi do aktivacije fosfolipaze ili do inhibicije adenilat ciklaze. Postoji 5 tipova muskarinskih receptora, koji se označavaju M1, M2, M3, M4, M5. Samo se 4 tipa receptora se funkcionalno i farmakološki razlikuju, dok su samo tri tipa dobro opisani.

- M1 receptori, tzv. „nervni“, nalaze se u CNS, perifernim neuronima, parijetalnim ćelijama želuca. Za aktivaciju ovih receptora vezuje se više funkcija mozga: memorija, pamćenje...
- M2 receptori, „srčani“, nalaze se u pretkomorama i sprovodnom sistemu srca. Aktivacijom ovih receptora dolazi do smanjenja kontraktilnosti i frekvence srčanog rada.
- M3-„žlezdani“ receptori, nalaze se u egzokrinim žlezdama i glatkim mišićima. Aktivacijom ovih receptora dolazi do pojačane sekrecije pljuvačnih žlezda, pankreasa, bronhija, mukoznih ćelija u GIT i kontrakcije visceralnih glatkih mišića.

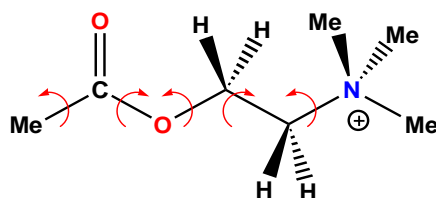
M4 receptori izazivaju efekte slične M2, dok se za M5 receptore veruje da učestvuju u oslobađanju dopamina u nekim strukturama mozga.

Za vezivanje Ach i analoga za holinergičke receptore važno je rastojanje između O i N u strukturi. Ovo rastojanje je različito za nikotinske i muskarinske receptore čime se objašnjava vezivanje nikotina i muskarina za samo jedan tip holinergičkih receptora.



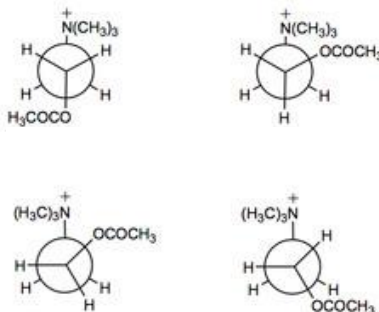
Slika 2. Uslov interakcije sa holinergičkim receptorima

Zbog mogućnosti slobodne rotacije oko jednostrukih veza acetilholin zauzima konformacione oblike koji omogućavaju vezivanje za sve tipove holinergičkih receptora.



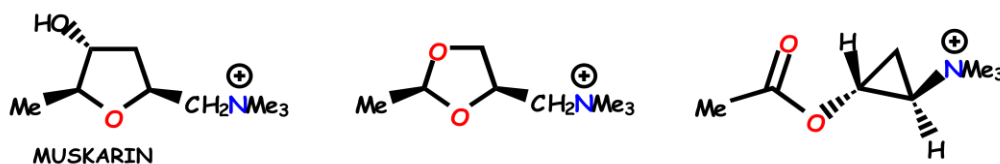
Slika 3. Slobodna rotacija acetilholina oko jednostrukih veza

Acetilholin može da postoji u neograničenom konformeru. Istraživanja konformera acetilholina uglavnom imaju za cilj praćenje i merenje torzionog ugla između kiseonika estarske funkcionalne grupe i kvaternernog amonijum jona (konformacije nastale rotacijom  $C\alpha$ - $C\beta$  veze). Primer ovih izomera prikazn je na slici 4.



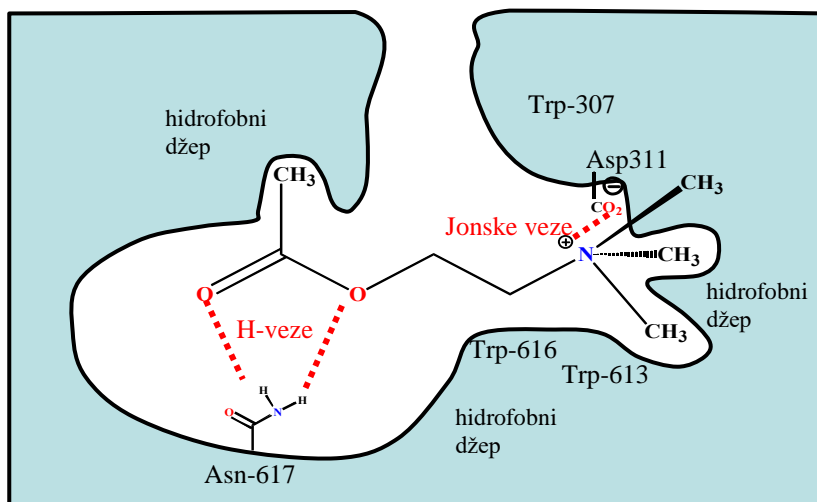
Slika 4. Konformacioni izomeri acetilholina nastalih rotacijom  $C\alpha$ - $C\beta$  veze

Nikotin i muskarin su rigidni analozi Ach kod kojih je slobodna rotacija ograničena prstenom a time i broj mogućih konformacionih oblika.



Slika 5. Primeri rigidnih analoga Ach

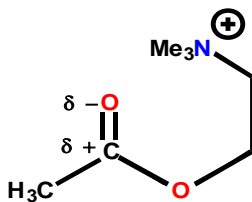
Ach se vezuje za holinergičke receptore gradeći više tipova hemijskih veza. Vezivanje Ach za receptor se odvija preko metil grupa (dve metil grupe se smeštaju u hidrofobni džep receptora), estra (gradi vodoničnu vezu) i kvaternernog azota (gradi jonske veze).



Slika 5. Vezivanje Ach za muskarinske receptore

### 5.0.2. Stabilnost acetilholina

Ach je veoma nestabilno jedinjenje, lako podleže hidrolitičkoj degradaciji. Degradacija je katalizovana u prisustvu kiselina i baza. Nestabilnost acetilholina se objašnjava prisustvom estarske funkcionalne grupe, i uticajem grupa u blizini estra koje pojačavaju elektrofilnost karbonilne grupe i osetljivost prema nukleofilima (acetilholin esterazi).

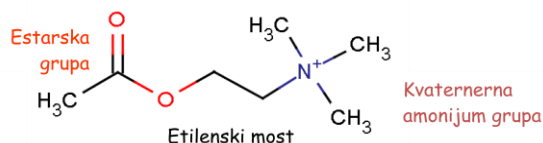


Slika 6. Uticaj kvaternernog amonijum jona na stabilnost acetilholina

Acetilholin pokazuje neselektivno dejstvo prema receptorima (vezuje se za sve holinergičke receptore), nestabilan je i kratko prisutan u biosredini i nema značaja u terapiji kao lek.

### 5.0.3. Veza strukture i dejstva

Struktura Ach može se sagledati kroz tri segmenta koje čine: amonijum (onijum), estarska grupa i etilenski most.

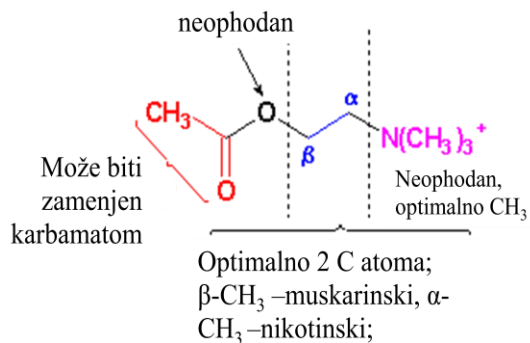


Slika 7. Tri segmenta strukture acetilholina

Amonijum grupa je izuzetno važna za dejstvo Ach. Zamenom N drugim heteroatomima (fosfonijum, sulfonijum, arsenonijum izosteri) ili supstitucijom metil grupa većim alkil radikalima nastaju analozi smanjene aktivnosti (zbog difuzije pozitivne šarže). Dealkilacijom azota nastaju terciarni, sekundarni i primarni amni manje aktivni od Ach. Amonijum grupa predstavlja hidrofilni deo molekule koji stupa u interakciju sa holinergičkim receptorima.

Estarska funkcionalna grupa je uzrok nestabilnosti Ach ali i mesto vezivanja za receptor. Estarska grupa gradi vodonične veze sa ostacima Thr i Asp na receptorskom mestu. Zamenom acetatnog estera karbamatnim (estara karbaminske kiseline) dobijaju se stabilnija jedinjenja.

Etilenski most obezbeđuje određeno rastojanje između estarske i amonijum grupe. Sintezom estara sirćetne kiseline i alkohola koji imaju “duži” niz od holina dobijeni su neaktivni analozi. Ova zapažanja su formulisana u tzv. *pravilo pet* prema kome za maksimalnu muskarinsku aktivnost rastojanje između terminalnog H i N ne sme biti veće od 5 atoma. Dakle, skraćivanje ili produžavanje niza smanjuje holinergičku aktivnost. Izomerizacijom niza se smanjuje dejstvo ali se postiže selektivnost prema holinergičkim receptorima: alkilovanjem  $\alpha$ -položaja dobijaju se jedinjenja selektivnija za nikotinske receptore (npr.  $\alpha$ -metilholin je manje aktivan od Ach, ali je selektivniji za nikotinske receptore). Izomerizacijom  $\beta$ -C atoma povećava se selektivnost prema muskarinskim receptorima.



Slika 8. Veza struktura-dejstvo acetilholina

## 5.1. LEKOWI KOJI POVEĆAVAJU AKTIVNOST HOLINERGIČKOG SISTEMA (PARASIMPATOMIMETICI)

Lekovi koji povećavaju aktivnost holinergičkog sistema nazivaju se holinergici, agonisti holinergičkih receptora ili parasimpatomimetici (Ach se oslobađa i na preganglijskim i na postganglijskim neuronima parasimpatikusa).

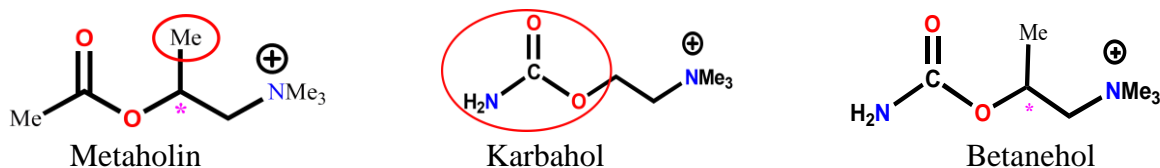
Holinergici su lekovi koji pokazuju isto ili slično dejstvo kao i Ach. Acetilholin je prirodni holinergik, prototip agoniste muskarinskih i nikotinskih receptora. Jednostavne je strukture, može se lako sintetisati, ali se ipak ne koristi u terapiji jer zbog svojih fizičko-hemijskih osobina (estar, kvaternarna amonijum grupa) lako podleže hidrolizi u vodenim rastvorima (stabilan je u kristalnom stanju). Hidroliza je ubrzana u prisustvu kiseline ili baze pa se Ach ne može koristiti oralno (čak i kada bi bilo moguće korišćenje *per os*, bioraspoloživost bi bila veoma mala zbog nemogućnosti jonizovane, kvaternerne amonijum grupe da prolazi lipidne membrane). Ach se ne može koristiti parenteralno jer bi hidrolizovao pod uticajem nespecifičnih esteraza u krvotoku a ni lokalno jer nije dovoljno lipofilan. Osim nestabilnosti, Ach pokazuje i neselektivno dejstvo prema tipu holinergičkih receptora i prema ciljnim tkivima što ograničava njegovu primenu u terapiji.

Sintetski agonisti holinergičkih receptora su dizajnirani sa ciljem da se postigne stabilnost u kiseloj sredini i prema esterazama, selektivnost za holinergičke receptore (prema muskarinskim, odnosno, nikotinskim receptorima). Koriste se za tretman glaukoma, stimulisanje GI i urinarnog trakta posle operacije kao i za tretmant nekih srčanih oboljenja (smanjuju kontraktilnost i frekvencu srčanog rada). Prema mehanizmu dejstva holinergici se mogu podeliti na:

- direktne (vezuju se za receptore);
- indirektne (inhibiraju enzim acetilholinesterazu, koji je odgovoran za hidrolizu Ach).

### 4.1.1. Direktni holinergici

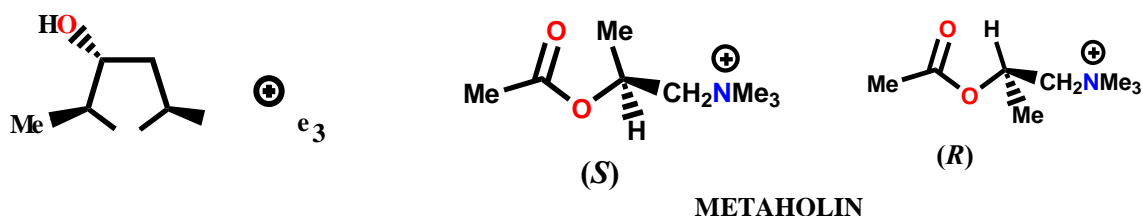
Direktni holinergici su lekovi koji se vezuju za holinergičke receptore slično Ach i proizvode slične efekte. Dizajnirani su na osnovu poznavanja mesta vezivanja Ach za receptor, veličine molekule Ach i odgovarajuće farmakofore. Primer direktnih holinergičkih agonista prikazan je na slici:



Slika 9. Strukture direktnih holinergika

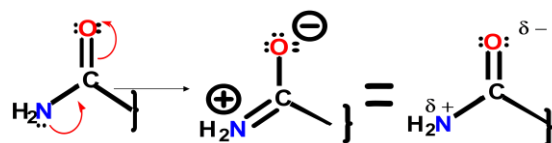
Direktni holinergici su strukturno slični Ach, sa izvesnim hemijskim modifikacijama. Tako je metaholin  $\beta$ -metil derivat acetilholina. U dizajniranju ovog leka korišćen je sterna efekat: alkilovanjem  $\beta$  C atoma estar se štiti od napada nukleofila i enzima čime se povećava stabilnost jedinjenja. Veličina alkil grupe je značajna: alkil radikal treba da bude dovoljno veliki da zaštiti estar od hidrolize i dovoljno mali da ne ometa vezivanje estraske grupe za receptor.

Kod metaholina "sterna štita" je metil grupa. Ovim alkilovanjem povećana je selektivnost za muskarinske receptore i sterno ometena hidroliza estra pa je metaholin 3x stabilniji od Ach. Takođe, alkilovanjem je nastao hiralan centar što znači da postoje dva enantiomera metaholina: R i S. Iako se metaholin koristi u obliku racemata poznato je da je S-enantiomer preko 200 puta potentniji u odnosu na R. Enantiomeri se razlikuju i po brzini hidrolize: S enantiomer sporije hidrolizuje u odnosu na Ach dok R ne podleže dejstvu acetilholin esteraze. Metaholin se vezuje selektivno za muskarinske receptore jer pokazuje strukturnu sličnost sa muskarinom. Iako muskarin ima 3 hiralna centra i 8 optičkih izomera samo prirodni stereoisomer alkaloida sa konfiguracijom 2S, 3R, 5S se vezuje za muskarinske receptore. Zbog molekulske fleksibilnosti metaholin zauzima konformacioni oblik koji je sličan muskarinu (S-metaholin ima istu konfiguraciju kao i hiralan centar u položaju 5 muskarina).



Slika 10. Strukturna i konformaciona sličnost muskarina i S-metholina

Karbahol je dobijen zamenom acetatnog estra karbamatnim, odnosno, primenom elektronskih efekata. Zbog slobodnog elektronskog para na azotu, karbamatni estar može rezonantno da se stabilizuje čime je smanjena elektrofilnost karbonilne grupe i povećana stabilnost na esteraze. Karbahol je stabilniji na reakcije hidrolize u odnosu na acetilholin, ima duže dejstvo i može se koristiti oralno.



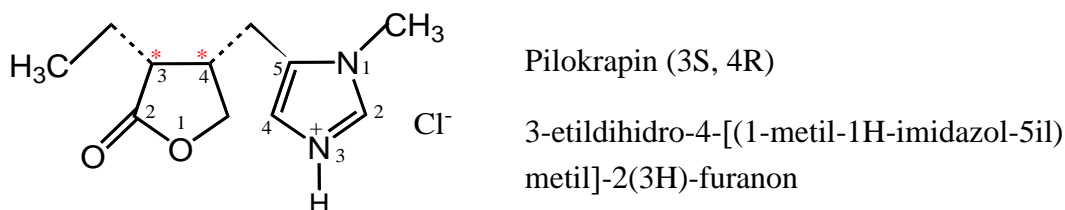
Slika 11. Rezonantna stabilizacija karbamatnog estra

Farmakološka aktivnost karbahola je slična Ach; amino i metil grupa su bioizosteri, iste veličine i zauzimaju sličan prostor na receptorskom mestu. Karbahol se vezuje i za nikotinske i za muskarinske receptore (neselektivan), a zbog prisustva karbamata pokazuje i dejstvo indirektnog

holinergika (slabo inhibira acetilholinesterazu; karbamati su najpoznatiji inhibitori acetilholin esteraze, videti dalje u tekstu).

Betanehol je analog Ach koji je nastao primenom i sternih i elektronskih efekata. Betanehol je oralno aktivni, potentni agonista muskarinskih receptora (u terapijskim dozama se ne vezuje za nikotinske receptore). Slično metaholinu, i betaholin ima dva optička izomera od kojih S(+) enantiomer pokazuje veći afinitet prema muskarinskim receptorima. Koristi se za postoperativno stimulisanje GI i urinarnog trakta.

Prirodni agonista holinergičkih receptora je pilokarpin, alkaloid izolovan iz osušenih listova biljke *Pilocarpus jaborandi*.



Slika 12. Struktura pilokarpina

Pilokarpin je neselektivni agonista muskarinskih receptora. Strukturu pilokarpina čini tetrahidrofuran koji je preko metilenskog mosta vezan za imidazol. Pilokarpin ima dva asimetrična centra, aktivan je stereoizomer apsolutne konfiguracija na hiralnim centrima 3S, 4R. Promenom konfiguracije na jednom hirlnom centru (3R, 4R) nastaje neaktivan izopilokarpin. U baznoj sredini podleže epimerizaciji (položaj 3) i hidrolizi laktona. Koristi se za tretman glaukoma, kao antidot kod trovanja antiholinergicima (atropinom) i kod suvoće usta (neželjeni efekat terapije zračenjem).

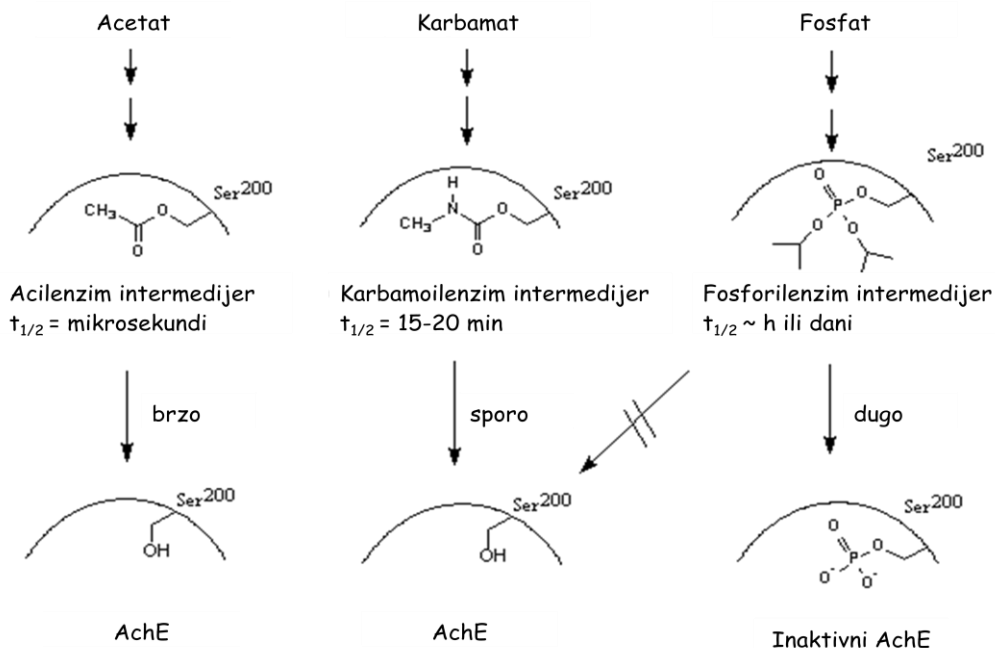
### 5.1.2. Indirektni holinergici

Indirektni holinergici su jedinjenja koja imaju sličnu primenu u terapiji kao i direktni holinergici ali se od njih razlikuju po mehanizmu dejstva. Indirektni holinergici se ne vezuju direktno za holinergičke receptore, već inhibiraju holinesteraze, enzime koji razgrađuje Ach, indirektno povećavaju sinaptičku koncentraciju Ach i tako produžavaju dejstvo. Postoje dva tipa holinesteraza u organizmu koje se razlikuju po distribuciji i specifičnosti. Jedan enzim je acetilholinesteraza koja se nalazi sa spoljašnje strane glija ćelija i katalizuje hidrolizu Ach u sinapsi; inhibitori ovog enzima se koriste u terapiji glaukoma, miastenije gravis i atonije GIT. Novija istraživanja pokazuju da bi inhibitori ovog enzima mogli biti korisni u terapiji Alchajmerove bolesti. Drugi enzim je butilholinesteraza (pseudoholinesteraza) koja se nalazi se u humanoj plazmi, nespecifična je prema substratu i katalizuje reakciju hidrolize ne samo Ach već i drugih estara koji se unose putem hrane.

U pogledu hemijske strukture može se reći da postoje tri grupe jedinjenja koja se vezuju za acetilholinesterazu: acetatna (kojima pripada i Ach), karbamatna i fosfatna. Katalitičko mesto acetilholinesteraze čine aminokiselina serin, histidin i glutaminska kiselina. Vezivanje Ach za



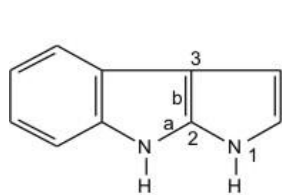
acetilholinesterazu (čiji je rezultat hidroiza Ach) započinje nukleofilnim napadom hidroksilne grupe serina na estarski deo molekule Ach pri čemu nastaje acilenzim intermedijer uz oslobađanje holina. Nastali kompleks je stabilan nekoliko mikrosekundi; bazno katalizovanom reakcijom oslobađa se enzim (reverzibilna inhibicija). Karbamati (npr. Karbahol) takođe predstavljaju supstrat za acetilholinesterazu samo što u ovom slučaju nastaje karbamoil enzim intermedijer koji je stabilan 15-20 minuta (pseudoreverzibilna inhibicija). Fosforil jedinjenja (organofosfati) grade veoma stabilne komplekse sa enzimom čiji poluživot se meri satima a nekada i danima.



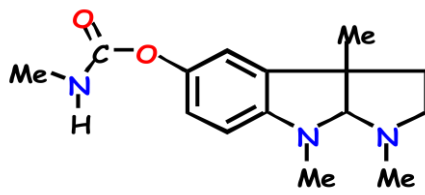
Slika 13. Stabilnost kompleksa acetilholinesteraze i acetata, karbamata i organofosfata  
 Brzina kojom se hidrolitički regeneriše acetilholinesteraza iz nagrađenog kompleksa određuje stepen inhibicije enzima pa tako kažemo da su acetati i karbamati reverzibilni a organofosfati ireverzibilni inhibitori.

### 5.1.2.1. Reverzibilni inhibitori acetilholinesteraze

Klinički najznačajniji inhibitori acetilholinesteraze su karbamati. Direktni agonisti koji sadrže karbamatni estar (karbahol, betanehol) takođe inhibiraju enzim i pokazuju slabu indirektnu holinergičku aktivnost. Ispitivanja su pokazala da su arilkarbamati bolji inhibiroti enzima jer imaju veći afinitet za acetilholinesterazu. Prirodni inhibitor acetilholinesteraze je alkaloid fizostigmin, prvo jedinjenje iz grupe karbamata koje je korišćeno u terapiji glaukoma. Fizostigmin je derivat pirolo-indola tj. fizostigmin je estar fizostigmola (alkohola) i karbaminske kiseline. Fizostigmol se koristi i kao antidot kod trovanja antiholinergicima (atropinom).



Pirol [2,3-b] indol

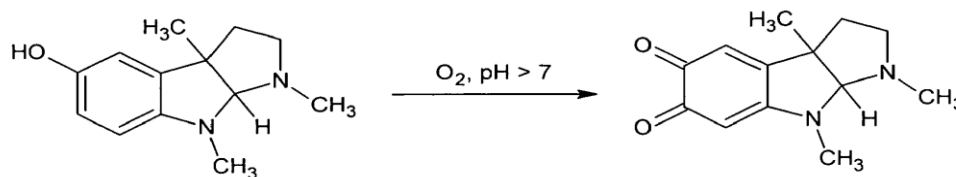


Fizostigmin

(3a*S*-cis) 1,2,3,3a,8,8a-heksahidro-1,3a,8 – trimetil **pirolo**[2,3-b] **indol** -5-ol- metilkarbamat

Slika 14. Struktura fizostigmina

Fizostigmin, slobodna baza, je nestabilan u prisustvu svetlosti i vlage. U baznoj sredini podleže hidrolizi do fizostigmola (ezerolina) koji se dalje lako oksidiše do orto hinona, rubrazerina (crvene boje). Degradacioni proizvodi fizostigmola su ezerolin, supstituisana karbaminska kiselina i rubrazerin koji ne pokazuju aktivnost.



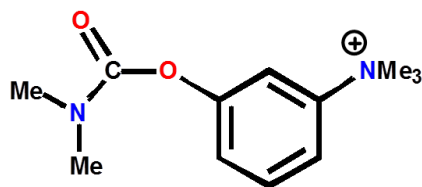
Ezerolin

Rubrazerin

Slika 15. Nestabilnost fizostigmola

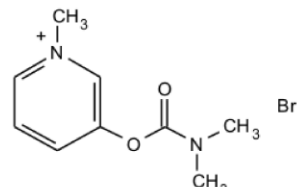
Za dejstvo fizostigmina značajno je prisustvo aromatičnog prstena i pirolidinskog azota, koji je pri fiziološkom pH protonovan i u protonovanom obliku (jonizivan) reaguje sa katalitičkim mestom enzima. Fizostigmin sadrži tercijarni amin (pKa 8,2), lipofilniji je od kvaternernih amonijum jedinjenja i prolazi krvno-moždanu barijeru pa se ispituje mogućnost primene u lečenju Alchajmerove bolesti.

Poznavanje strukture fizostigmina omogućilo je dobijanje sintetskih jedinjenja jednostavnije strukture. Slično fizostigminu, i sintetska jedinjenja su *meta* supstituisani karbamati (najčešće disupstituisani). Za razliku od fizostigmina sintetska jedinjenja su kvaternerna amonijum jedinjenja, dakle jonizovana, i kao takva ne prolaze krvno-moždanu barijeru i ne pokazuju neželjene efekte na CNS. Primer sintetskih inhibitora acetilholinesteraze su neostigmin i piridostigmin.



Neostigmin

3-[[dimetilamino) karbonil]oksi]-  
N,N,N-trimetil-benzen-aminijum bromid

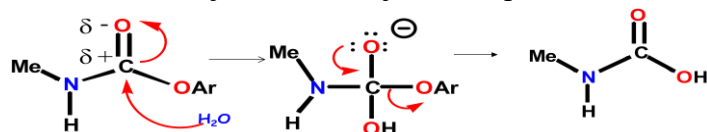


Piridostigmin

3-hidroksi-1-metilpiridinijum bromid  
dimetilkarbamat

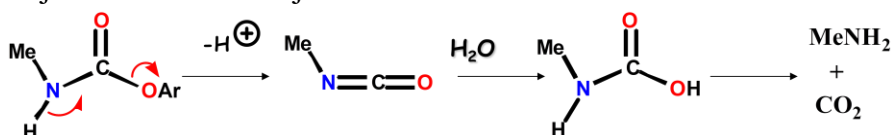
Slika 16. Struktura sintetskih inhibitora acetilholinesteraze

I neostigmin i pridostigmin u strukturi imaju aromatični deo koji je jednostavniji od piroloindola fizostigmina (benzen, piridin) i disupstituisani karbamatni estar. Rastojanje između estera i kvaternernog amonijum jona je približno ista kao kod Ach i fizostigmina. Kao disupstituisani karbamati, sintetska jedinjenja su stabilnija na hidrolizu od monosupstituisanih. Razlog veće stabilnosti leži u samom mehanizmu hidrolize. Hidroliza estera započinje napadom nukleofila na karbonilni C atom i ovaj mehanizam je široko prihvaćen.



Slika 17. Mehanizam hidrolize karbamatnog estera (1)

Prema drugom mogućem mehanizmu hidroliza započinje odlaskom vodonika iz karbamatnog estera, preko izocijanata kao intermedijera.



Slika 18. Mehanizam hidrolize karbamatnog estera (2)

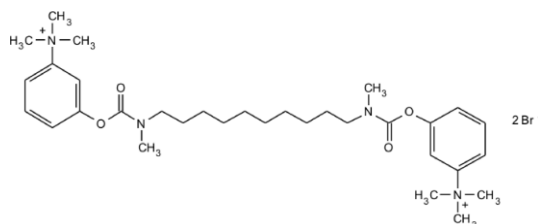
Disupstituisani karbamati ne sadrže vodonik u karbamatnom estaru te ne podležu hidrolizi prema drugom mehanizmu.



Slika 19. Stabilnost disupstituisanih karbamata na reakcije hidrolize

Neostigmin ima sličan mehanizam dejstva kao fizostigmin. Metaboliše se u jetri do 3-hidroksifenil-trimetil-amonijuma koji je aktivan metabolit (slabije dejstvo od neostigmina). Koristi se u prevencije atonije intestinalne muskulature i u terapiji miastenije gravis.

Piridostigmin je strukturno sličan neostigminu. Iako je kvaternerni azot deo strukture piridina piridostigmin ima isti mehanizam dejstva kao nesotigmin. Pokazuje duže desjstvo i manje neželjenih efekata u odnosu na neostigmin, predstavlja bolji izbor za lečenja *myasthenae gravis*.



Slika 20. Demekarijum bromid

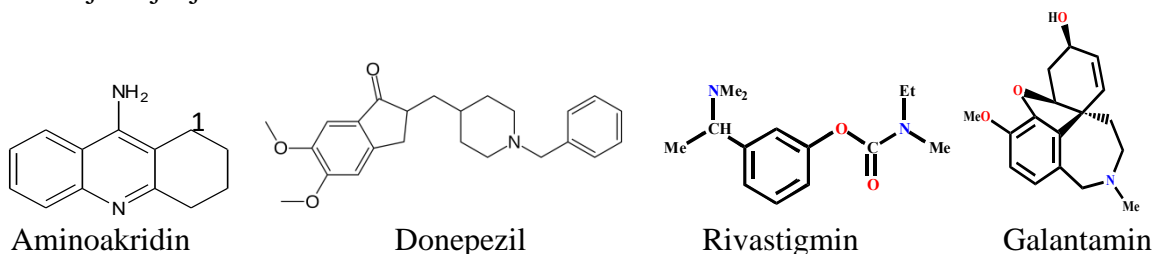
Demekarijum-bromid je biskvaternerno jedinjenje, podjednako efikasan kao i drugi inhibitori acetilholinesteraze ali stabilniji i dužeg dejstva.

### 5.1.2.2. Centralno selektivni inhibitori acetilholinesteraze

Centralno selektivni inhibitori acetilholinesteraze su jedinjenja koja se koriste u terapiji Alchajmerove bolesti. Ispitivanja su pokazala da kod pacijenata sa ovom bolešću postoji deficit neurotransmitera (acetilholin, serotonin, noradrenalin, dopamin, glutamat), prekid u holinergičkoj inervaciji određenih delova mozga kao i nedostatak holinacetiltransferaze (enzim koji učestvuje u biosintezi acetilholina). Centralno selektivni inhibitori acetilholinesteraze su dizajnirani tako da prolaze krvno-moždanu barijeru, reverzibilno inhibiraju acetilholinesterazu i tako produžavaju aktivnost Ach na funkcionalno značajnim mestima u CNS. Iako primena ovih lekova nije bez neželjenih efekata, oni obezbeđuju izvesna poboljšanja kod pacijenata sa Alchajmerovom bolešću. Najznačajniji centralno selektivni inhibitori acetilholinesteraze su aminoakridin, donepezil, rivastigmin i galantamin.

Aminoakridin (Takrin) je neklasičan inhibitor i acetilholinesteraze i butilholinesteraze. Koristi se nekoliko godina u terapiji Alchajmerove bolesti. Slaba bioraspoloživost nakon *per os* primene (doziranje 4 x dnevno) i hepatotoksičnost ograničavaju njegovu upotrebu. Glavni metabolički proizvod je 1-hidroksi-aminoakridin.

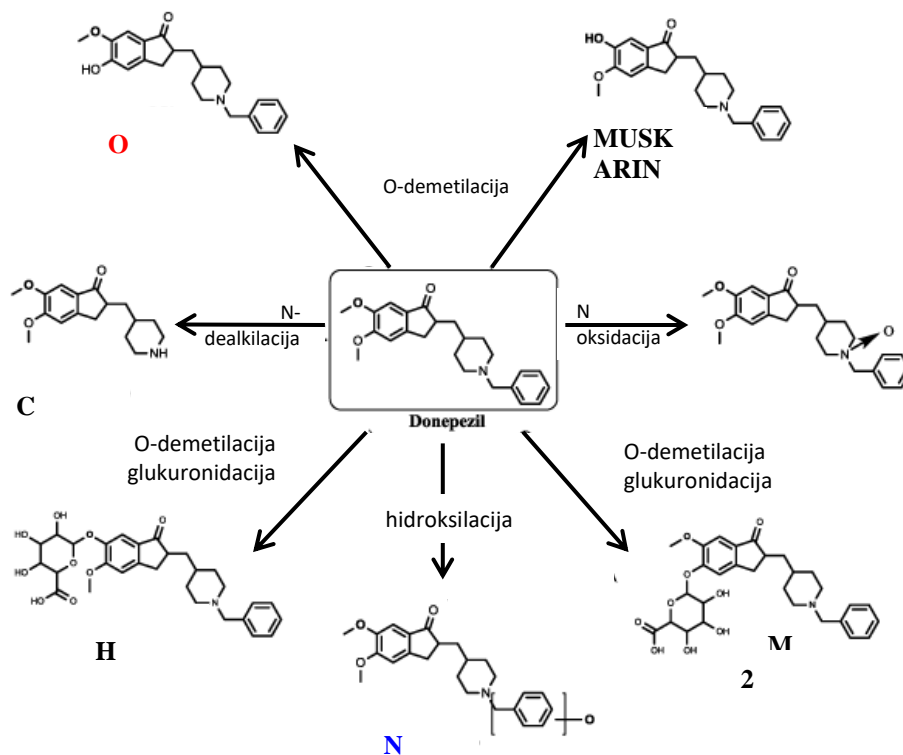
Donepezil je, takođe, neklasičan, reverzibilni, centralno delujući inhibitor acetilholin esteraze. U poređenju sa aminoakridinom pokazuje nekoliko stotina puta veću selektivnost za acetilholinesterazu u odnosu na butilholinesterazu. U organizmu metaboliše dominantno reakcijama oksidacije (O-demetilacija, N-dealkilacija, N-oksidacija) i nastali metaboliti se u obliku glukuronida izlučuju putem bubrega. 6-O-demetil metabolit ima istu aktivnost kao i polazno jedinjenje.



Slika 21. Struktura najznačajnijih centralno selektivnih inhibitora acetilholinesteraze

Rivastigmin je analog fizostigmina koji je 2010. godine odobren za terapiju demencije koja je udružena sa Parkinsonovom bolešću. Za razliku od donepezila inhibira i centralnu acetilholinesterazu i holinesteraze u plazmi. Inhibicija acetilholinesteraze traje i do 10h pa se smatra pseudoireverzibilnim inhibitorom.

Galantamin je prirodno jedinjenje, alkaloid, izolovan iz biljaka familije *Amaryllidaceae*, reverzibilni inhibitor acetilholinesteraze (ne deluje na butilholinesterazu). Poznat je preko 30 godina. U organizmu metaboliše reakcijama O- i N-demetilacije.

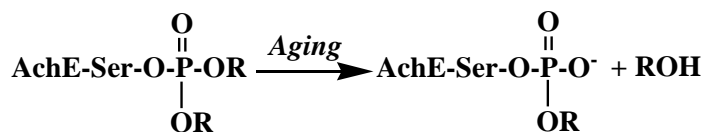


Slika 22. Metabolizam donepezila

### 5.1.2.3. Ireverzibilni inhibitori acetilholinesteraze

Ireverzibilni inhibitori acetilholinesteraze (i butilholinesteraze) su organofosforna jedinjenja koja grade jake kovalentne veze sa enzimom (fosfatni estri). Nastali kompleks je stabilan, enzim se ne može regenerisati pa se ovakva inhibicija smatra ireverzibilnom. Ireverzibilnom inhibicijom acetilholinesteraze nastaje permanentna aktivacija holinergičkih receptora acetilholinom i ima krajnji, letalan ishod.

Velika stabilnost fosforilisanog enzima se objašnjava hemijskom stabilizacijom fosfatne veze koja se dešava tokom vremena. Ovaj proces je poznat pod nazivom *aging* (starenje). Tokom ovog procesa dolazi do raskidanja veze O-R pri čemu atom fosfora postaje manje elektrofilan (rezonatna stabilizacija) i manje podložan reakcijama hidrolize. Organofosforna jedinjenja nemaju terapijski značaj, koriste se kao insekticidi.



Slika 23. Stabilizacija fosforilisane acetilholin esteraze

Prva organofosforna jedinjenja su bojni otrovi od kojih su neki upotrebljavani tokom drugog svetskog rata (Sarin). Sintetisani su brojni analozi koji se danas koriste kao insekticidi. Ova jedinjenja su lipofilna, sa velikim naponom pare pa je potrebno obazrivo rukovanje kao bi se sprečila inhalacija para ili apsorpcija kroz kožu.

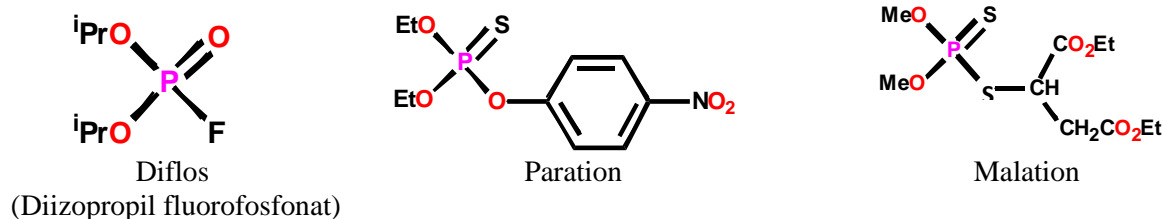


Slika 24. Struktura sarina i opšta struktura ireverzibilnih inhibitora acetilholinesteraze

A-može biti kiseonik ili sumpor (fosfotionati, slabiji od analoga sa kiseonikom)

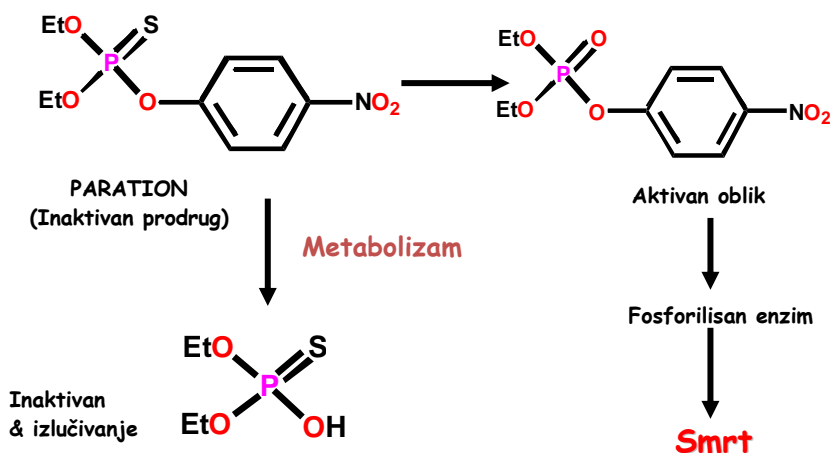
X-lako odlazeća grupa (F, CN, p-nitrofenoksi)

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>-aril, alkil, ariloksi, alkiloksi (povećavaju lipofilnost)



Slika 25. Struktura orhganofosforinih jedinjenja koja se koriste kao insekticidi

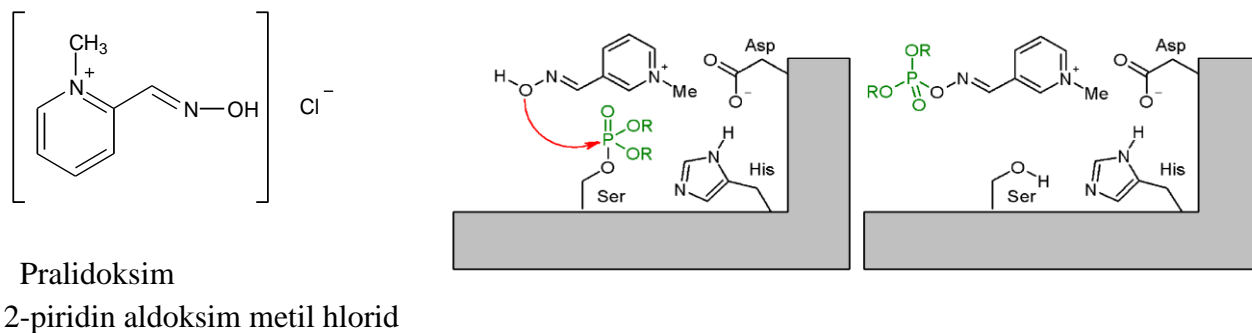
Neki insekticidi u strukturi sadrže atom S umeto P. Ova jedinjenja pokazuju slabu aktivnost prema acetilholin esterazi. U organizmu insekata podležu reakciji desulfuracije dajući aktivna jedinjenja. Organofosfati koji se koriste kao insekticidi relativno su bezopasni za sisare zahvaljujući različitim reakcijama biotransformacije. Primer je biotransformacija parationa. Primarna reakcija biotransformacije parationa kod insekata je desulfuracija pri čemu nastaje aktivan, toksičan metabolit. U humanom organizmu paration metabolize reakcijom hidrolize pri čemu nastaje neaktivan metabolit koji se izlučuje iz organizma.



Slika 26. Metaboliza parationa

Iako male toksičnosti, paration može dovesti do trovanja ako se unese u organizam u većim količinama ili ako je organizam duže vremena izložen malim dozama (zbog kumulativnog efekta).

Široka upotreba insekticida usmerila je istraživanje ka razvoju efikasnog antidota koji se može koristiti u slučajevima trovanja organofosornim jedinjenjima. Cilj je bio sintetisati jedinjenje, jak nukleofil, koje može hidrolizovati fosforilisani enzim. Hidroksilamin ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) je jak nukleofil pa su istraživanja bila usmerena ka funkcionalnim grupama sličnim hidroksilaminu. Kao antidot koristi se pralidoksim koji kao nukleofilnu funkcionalnu grupu ima oksim (nastao reakcijom hidroksilamina i aldehida). Nukleofilni napad kiseonika (iz oksima) rezultuje kidanjem estarske veze i regeneracijom enzima. Pralidoksim je efikasan samo ako se koristi nekoliko sati posle trovanja (pre nego što se završi *aging* proces).



Slika 27. Regeneracija fosforilisanog enzima pralidoksimom

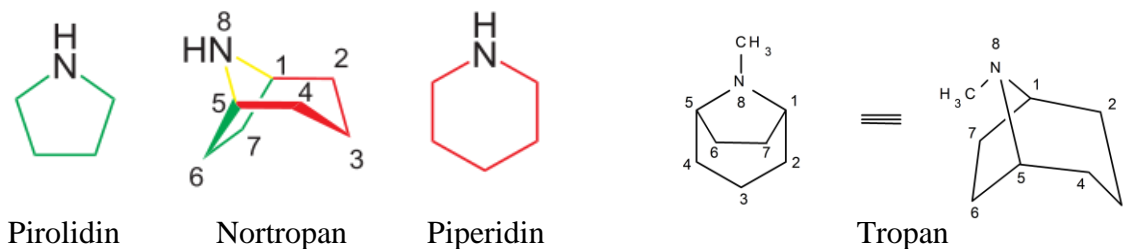
## 5.2. LEKOVI KOJI SMANJUJU AKTIVNOST HOLINERGIČKOG SISTEMA (PARASIMPATOLITICI)

Parasimpatolitici, antiholinergici ili antagonisti holinergičkih receptora su jedinjenja koja kompetitivno inhibiraju dejstvo acetilholina na muskarinske receptore. Termin “antiholinergik” u pravom značenju bi se odnosio na jedinjenja koja antagonizuju i muskarinske i nikotinske receptore ali se uobičajeno koristi samo za muskarinske antagoniste. Antagonisti nikotinskih receptora pripadaju posebnoj farmakoterijskoj grupi-neuromuskularnim blokatorima.

Antiholinergici su kompetitivni antagonisti muskarinskih receptora koji daju farmakološke efekte suprotne dejstvu acetilholina. Ova jedinjenja smanjuju kontrakcije gastrointestinalnog i urinarnog trakta, smanjuju sekreciju salive, izazivaju midrijazu (kontraindikovani su kod glaukoma !!!).

### 5.2.1. Prirodni antiholinergici

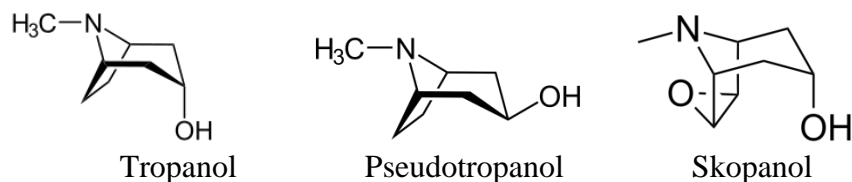
Prvi poznati antiholinergici su prirodni proizvodi izolovani iz porodice Solanaceae-*Atropa Belladonna*, *Hyoscyamus niger* i *Datura stramonium*. Iako je izolovan veliki broj alkaloida najpoznatiji i najaktivniji su atropin, hioscijamin i skopolamin. Svi Solanaceae alkaloidi su estri aminoalkohola 3-hidroksi-tropana pa se nazivaju i tropanskim alkaloidima. Tropan je N-metilovani derivat nortropana; nortropan je biciklični prsten koji se sastoji od piperidina i piperidina.



Slika 28. Struktura nortropana i tropana

Kako se tropan sastoji od dva potpuno hidrirana heterociklična prstena, moguć je veliki broj konformacija. Najstabilnija je ona konformacija kod koje se oba prstena nalaze u obliku stoličastog konformera. Tropan je hemijski: 8-metil-8-aza-biciklo[3,2,1] oktan, ima ravan simetrije i nije optički aktivan.

U strukturi alkaloida prisutan je tropanol, aminoalkohol, kod koga se u položaju 3 nalazi aksijalna (3- $\alpha$ ) hidroksilna grupa (razlikovati od 3- $\beta$ -hidroksilne grupe koja ulazi u sastav pseudotropanola). Alkaloid skopolamin je ester aminoalkohola skopanola, takođe derivat tropanola, koji je hemijski: 6 $\beta$ ,7 $\beta$ -epoksi-1 $\alpha$ H,5 $\alpha$ H-tropan-3 $\alpha$ -ol.

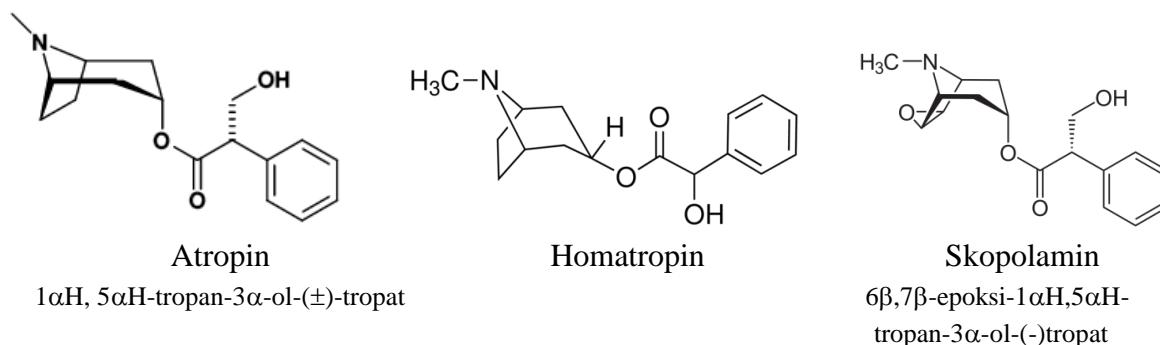


Slika 29. Struktura aminoalkohola koji ulaze u sastav tropanskih alkaloida



Prirodni antiholinergici su estri tropa kiseline (2-hidroksimetil-2-benzen sirćetna kiselina). Tropa kiselina ima jedan hiralan centar i dva enantiomerna oblika. Ova kiselina je specifična za antiholinergičko dejstvo; zamenom tropa kiseline bademovom (2-hidroksi-2-benzensirćetna kiselina) dobijaju se analozi slabije aktivnosti.

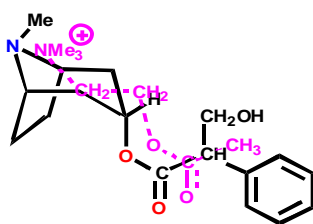
Atropin je estar tropanola i racemata tropa kiseline. Estar tropanola i (-) tropa kiseline je alkaloid (-) hioscijamin koji je potentniji antiholinergik od atropina ali je podložan racemizaciji prilikom izolovanja pa se atropin više koristi u terapiji. Dakle, za (-) hioscijamin se može reći da je levoaktivni oblik racemata-atropina (atropin je (±)-hioscijamin). Desno aktivni oblik atropina tj. (+) hioscijamin se može dobiti sintetski ali pokazuje slabu antiholinergičku aktivnost i ne koristi se u terapiji. Atropin je baza, u terapiji se koristi u obliku soli, sulfata.



Slika 30. Struktura prirodnih antiholinergika

Skopolamin je levoaktivni oblik racemata koji se naziva atrosčin, odnosno, skopolamin je (-) atrosčin. Skopolamin se koristi u obliku soli, bromida. Homatropin je estar sa bademovom kiselinom, slabijeg dejstva od atropina. Kao i skopolamin, koristi se u obliku soli, bromida.

Prirodni antiholinergici u strukturi sadrže sve elemente koji su od značaja za vezivanje za muskarinske receptore.

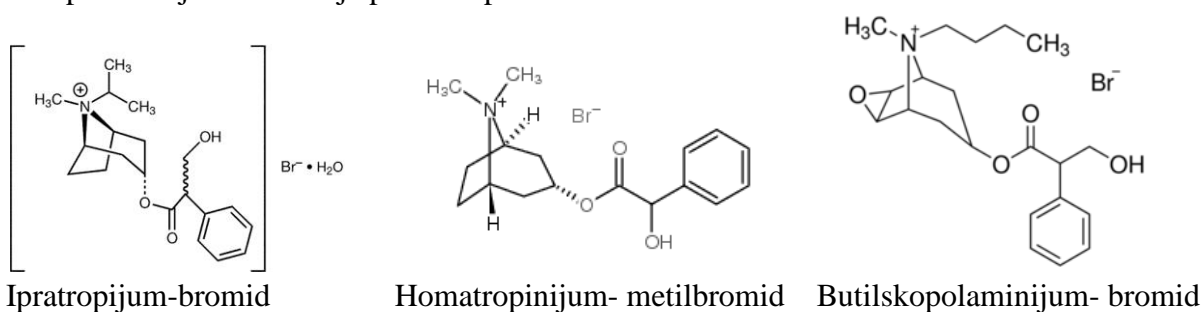


Slika 31. Strukturna sličnost atropina i acetilholina

Rastojanje između estra i terciarnog amina atropina odgovara rastojanju estra i kvaternernog amonijum jona acetilholina. Način vezivanja atropina za receptor je sličan vezivanju Ach (jonske i vodonične veze), pri čemu atropin, preko aromatične tropa kiseline, ostvaruje dodatne Van der Walsove veze.

Solanaceae alkaloidi su dobri antiholinergici i u terapiji se koriste kao midrijatici, spazmolitici. Nedostatak je što kao terciarni amini prolaze u CNS i mogu da izazovu depresiju disanja i krvotoka, deluju dugo i neselektivno, na sve holinergičke receptore. Kvaternizacijom azota prirodnih alkaloida dobijena su polusintetska jedinjenja koja ne prolaze krvno-moždanu barijeru i ispoljavaju periferno dejstvo. Izopropil derivat atropina poznat je pod nazivom

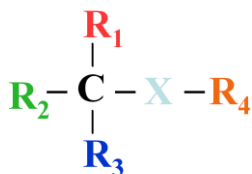
ipratropijum (bromid) i koristi se inhalaciono kod astmatičnog napada. Homatropinijum-metilbromid je metil derivat homatropina i koristi se kod gastrointestinalnog spazma. Butilskopolaminijum bromid je poznati spazmolitik.



Slika 32. Struktura polusintetskih derivata Solanacea alkaloida

### 5.2.2. Sintetski antiholinergici

Sinteza antiholinergika je počela od strukture atropina mada današnji lekovi odstupaju po svojoj strukturi od tradicionalnog tropanola, kao aminoalkohola, i tropana kiseline kao kiseline komponente. Opšta struktura sintetskih antiholinergika se može predstaviti na sledeći način:



gde je :  $R_1, R_2$  - karbociklus ili heterociklus

$R_3$  -H, OH,  $CH_2OH$ ,  $CONH_2$

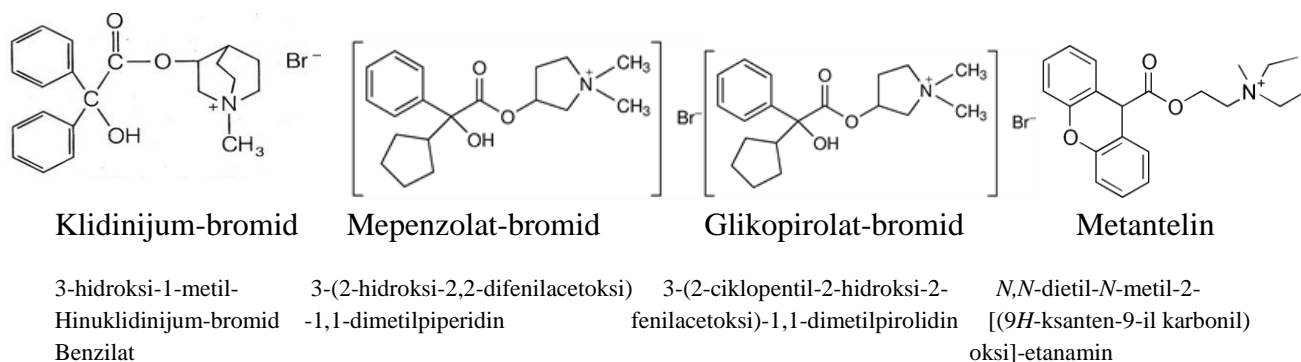
X-( $-COO^-$ ,  $-O-$  ili  $-(CH_2)_n$  -  $n=2-4$ )

$R_4$  -  $(CH_2)_n-N$   $\begin{matrix} 3 \\ 0 \end{matrix}$  ili  $\begin{matrix} 4 \\ 0 \end{matrix}$  amin

Svi sintetski antiholinergici, u zavisnosti od strukture, mogu se podeliti na: aminoalkoholne estre, aminoalkohole, aminoamide i aminoetre. Antiholinergici koji u strukturi sadrže kvaternernu amonijum funkcionalnu grupu slabo se resorbuju iz gastrointestinalnog trakta i uglavnom se koriste za smanjenje gastrične sekrecije i motiliteta gastrointestinalnog trakta. Sintetska jedinjenja koja u strukturi sadrže terciarni amin bolje se resorbuju, prolaze krvno-moždanu barijeru i koriste se u terapiji Parkinsonove bolesti.

#### a) Sintetski antiholinergici-aminoalkoholni estri

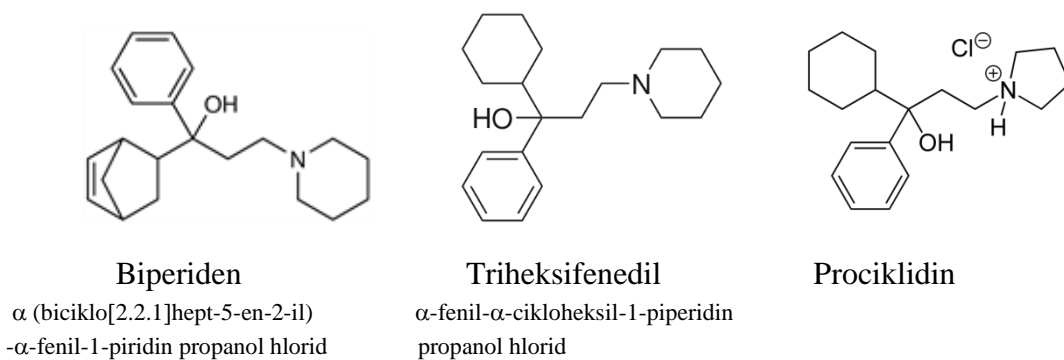
Iako strukturno najsljedniji atropinu (svi su estri aminoalkohola i kiseline) primetno je postepeno odstupanje od konformacije tropanola, uvođenje kvaternernog azota kao i promena u strukturi kiseline. Kiselinasti deo molekule je dizajniran tako da obezbeđuje veliku hidrofobnost i bolje vezivanje za muskarinske receptore.



Slika 33. Sintetski antiholinergici-aminoalkoholni estri

### b) Sintetski antiholinergici-aminoalkoholi

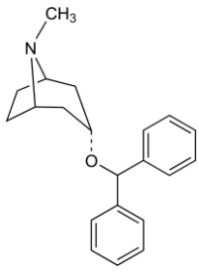
Ova grupa sintetskih jedinjenja dokazuje da za antiholinergičko dejstvo nije neophodno prisustvo estarske grupe (alkoholna grupa je "zamenjuje" karboksilnu). Takođe, rastojanje između O i N je 3 C atoma (razlika od estara kod kojih je 2C atoma). Derivati sa tercijskim aminom se koriste u terapiji Parkinsonove bolesti, dok kvaternarni derivati ne prolaze u CNS i koriste se kao spazmolitici i antisekretorna jedinjenja.



Slika 34. Sintetski antiholinergici-aminoalkoholi

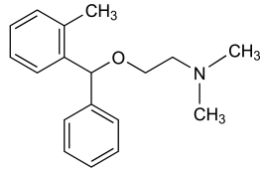
### c) Sintetski antiholinergici-aminoalkoholni etri

Aminoalkoholni etri se više koriste kao antiparkinsonici nego kao antiholinergici. Strukturno su veoma slični antihistaminicima, vezuju se za ove receptore i pokazuju neželjene antihistaminske efekte. I obrnuto, antihistaminici, zbog sličnosti u strukturi pokazuju neželjene antiholinergičke efekte (uporediti strukture orfenadina i hlorfenoksamina sa antihistaminikom difenhidraminom). Struktura benzotropina je, takođe, relativno slična difenhidraminu iako je rastojanje između O i N veće (3C atoma). Pretpostavlja se da je konformacija molekule takva da je rastojanje manje nego što se može zaključiti na prvi pogled.



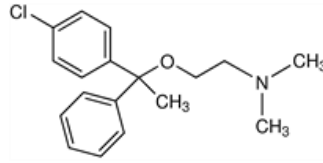
**Benztropin (mesilat)**

3 $\alpha$ -(difenilmetoksi)-1 $\alpha$ H,5 $\alpha$ H-tropan metansulfonat



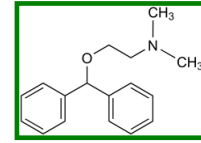
**Orfenadrin**

*N,N*-dimetil-2-[(2-metil-fenil-metoksi]-etanamin



**Hlorfenoksamin**

{2-[1-(4-hlorfenil)-1-feniletoksi]etil}dimetilamin



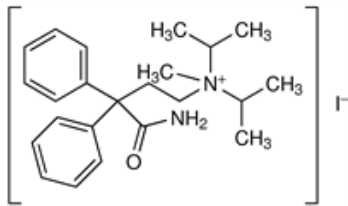
**Difenhidramin,**

Antihistaminik !!!

Slika 35. Sintetski antiholinergici-aminoalkoholni etri

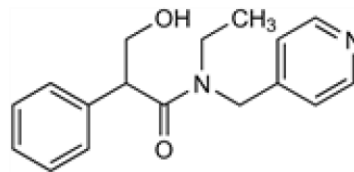
#### d) Sintetski antiholinergici-aminoamidi

U pogledu strukture aminoamidi su slični aminoalkoholima, odnosno, polarna hidroksilna grupa je zamenjena polarnom amidnom grupom. Izopropamid-jodid je jedini lek koji se trenutno koristi. To je potentni antiholinergik koji, iako ima kvaternerni jon, u terapijskim dozama ne dovodi do blokade autonomnih ganglija. Pokazuje spazmolitični i antisekretorni efekat.



**Izopropamid jodid**

(3-karbamoil-3,3-difenilpropil) diizopropilmetilamonijum jodid



**Tropikamid**

*N*-Etil- $\alpha$ -(hidroksimetil)-*N*-(4-piridinilmetil) benzenacetamid

Slika 36. Sintetski antiholinergici-aminoamidi

## Test za proveru znanja:

1. Nacrtajte strukturu acetilholina. Navedite ulogu i značaj pojedinih delova strukture za dejstvo i stabilnost ovog jedinjenja:

-kvaternerni amin \_\_\_\_\_

-etilenski most \_\_\_\_\_

-acetatni estar \_\_\_\_\_

Newmanovom projekcijom formulo prikazite najmanje dva konformaciona oblika jedinjenja D

2. Nacrtati strukturu prema sledećoj nomenklaturi: 2-(acetiloksi)-*N,N,N*-trimetilpropan-1-amonijum hlorid. Objasnite nestabilnost jedinjenja.

3. Nacrtajte strukturu prema datoj nomenklaturi: 1 $\alpha$ H, 5 $\alpha$ H-tropan-3 $\alpha$ -ol-( $\pm$ )-tropat.

a) Jedinjenje prolazi krvno-mozdanu barijeru DA NE

b) Koristi se u obliku natrijumovih soli DA NE

c) Aktivnost pokazuje desno aktivan enantiomer DA NE

d) prikažite proizvod koji nastaje kvaternizacijom

4. Atropin deluje kao:

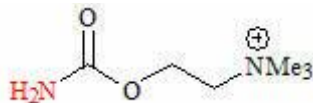
a) Muskarinski agonista

b) Muskarinski antagonista

c) Nikotinski agonista

d) Nikotinski antagonista

5. Amino grupa karbahola (zaokružiti tačne iskaze):



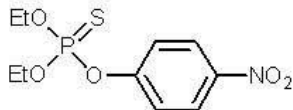
a) je metabolički nestabilna grupa

b) Interaguje sa hidrofilnim džepom receptora

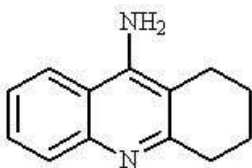
c) Sterno "štiti" estarsku grupu od hidrolize

d) "Štiti" estarsku grupu elektronskim efektima

6) Na slici je prikazana struktura parationa. Reakcijama prikazite metabolizam i objasnite zašto ovaj insekticid nije toksičan za humani organizam.



7. Prikazano jedinjenje se koristi:



a) U terapiji glaukoma

b) Antidot kod trovanja holinergicima

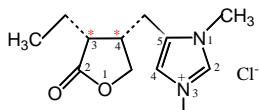
c) Insekticid

- d) U tarpiji Alchajmerove bolesti  
 e) Objasnite mehanizam dejstva \_\_\_\_\_

8. Koja od prikazanih jedinjenja gradi karbamoil estar sa acetilholinesterazom?

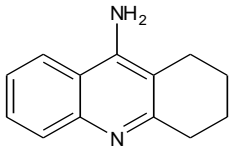
- a) neostigmin  
 b) piridostigmin  
 c) fizotigmin  
 d) malation

9. Na slici je prikazana struktura pilokarpina. Koje od sledećih tvrđenja je tačno:



- a) Pilokarpin sprečava vezivanje muskarina  
 b) Pilokarpin se vezuje za isti receptor kao i muskarin i smanjuje signal  
 c) Pilokarpin proizvodi isti efekat kao i vezivanje acetilholina  
 d) Pilokarpin izazova suprotan efekat od muskarina na receptoru  
 e) Prikazite nestabilnost pilokarpina u baznoj sredini

10. Dajte odgovore na postavljena pitanja:

A		C
D	E	F

U kućici A nacrtajte strukturu prema datoj nomenklaturi: 1 $\alpha$ H, 5 $\alpha$ H-tropan-3 $\alpha$ -ol-( $\pm$ )-tropat

- a) Prirodni proizvodi su A B C D E F  
 b) Enzimski inhibitor je A B C D E F  
 c) Antagonisti holinergičkih receptora su A B C D E F  
 d) Jedinjenje C deluje na \_\_\_\_\_ receptore.  
 e) U kućici D je prikazana struktura \_\_\_\_\_. Navedite hemijske transformacije jedinjenja D koja su omogućile dobijanje lekova za per os primenu.  
 e) Prikazano jedinjenje se vezuje za sve holinergičke receptore. Objasnite.  
 f) Objasnite mehanizam dejstva jedinjenja B \_\_\_\_\_.