

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

STUDIUM NOVÝCH MODULÁTORŮ ACETYLCHOLINESTERASY

Rigorózní práce

Souhrn publikací navazujících na diplomovou práci a nedokončené doktorské studium s komentářem.

Hradec Králové, 2011

Mgr. Veronika Račáková

Prohlášení:

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 31. 10. 2011

Poděkování:

Děkuji své školitelce doc. RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a trpělivost při zpracovávání této rigorózní práce.

Děkuji také doc. Ing. Kamilovi Kučovi, Ph.D. a Katedře toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany, za jejichž pomoci vznikly uvedené publikace.

OBSAH

Abstrakt ČJ.....	5
Abstrakt AJ.....	6
Seznam použitých zkratek.....	7
1. Úvod.....	9
2. Acetylcholin a acetylcholinesterasa.....	10
3. Inhibitory acetylcholinesterasy.....	11
4. Reaktivátory acetylcholinesterasy.....	14
5. Léčba intoxikací organofosforovými inhibitory.....	16
6. Vývoj nových reaktivátorů acetylcholinesterasy.....	20
7. Počítačové metody ve vývoji nových reaktivátorů.....	22
7.1. Virtuální screening.....	22
7.2. Umělé neuronové sítě.....	29
7.3. Konkrétní příklady použití ANN.....	31
8. Komentář k publikovaným pracím.....	31
9. Závěr.....	39
10. Seznam literatury.....	40
11. Přílohy.....	47

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát: Mgr. Veronika Račáková

Konzultant: doc. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.

Název rigorózní práce: Studium nových modulátorů acetylcholinesterasy.

Organofosforové sloučeniny jsou z chemického hlediska organofosfáty či organofosfonáty. Jsou široce používány jako pesticidy, ale jejich vysoká toxicita a relativně snadná a levná syntéza činí z těchto sloučenin lehce zneužitelné zbraně hromadného ničení – nervově paralytické látky. Toxický efekt těchto látek je založen na ireverzibilní inhibici enzymu acetylcholinesterasy (AChE).

V případě otrav těmito látkami se používá jako účinných antidot anticholinergik (atropin) a reaktivátorů AChE. Účinek reaktivátorů je založen na štěpení komplexu enzym-inhibitor. Nejběžnějšími ve světě dosud používanými reaktivátory jsou pralidoxim, trimedoxim, obidoxim a asoxim (HI-6). Jedná se o látky, které ve své molekule obsahují oximovou skupinu a jeden nebo dva kvarterní dusíky, zajišťující dostatečnou afinitu k AChE.

Hledání a syntéza nových účinnějších širokospektrých reaktivátorů AChE, které by zároveň měly nižší nežádoucí účinky, je stále aktuální. Strategie vývoje nových reaktivátorů AChE zahrnuje několik kroků: popis mechanismu intoxikace organofosforovými inhibitory na molekulární úrovni (molecular design), predikci nových struktur reaktivátorů AChE pomocí umělých neuronových sítí (artificial neural networks; ANN), jejich syntézu, ověření účinnosti *in vitro* a nakonec i testy *in vivo*.

Z publikací navazujících na moji diplomovou práci vyplývá, že nejúčinnějším reaktivátorem pro cyklosarin byl oxim K033 a v případě AChE inhibované chlorpyrifosem oximy trimedoxim a obidoxim. Z novějších publikací pracovníků Fakulty vojenského zdravotnictví se jeví jako velmi úspěšným reaktivátor HI-6. Ten ale není schopen reaktivovat AChE inhibovanou tabunem ani pesticidy. V případě intoxikací tabunem jsou velmi nadějnými reaktivátory oximy K027 a K048. Oxim K027 by mohl být v budoucnosti jedním z uvažovaných kandidátů pro léčbu širokého spektra otrav OFI.

V posledních studiích je velmi diskutovaným tématem použití kombinace dvou oximů současně (HI-6 + trimedoxim, HI-6 + K203). Otázkou ale zatím zůstává zvýšení toxicity při použití dvou reaktivátorů současně.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Candidate: Mgr. Veronika Račáková

Consultant: Assoc. Prof. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.

Title of Thesis: Study of new acetylcholinesterase modulators.

Organophosphorus compounds are chemically organophosphates or organophosphonates. They have been widely used as pesticides but because of their high toxicity and relatively cheap and easy synthesis they can be easily misused as chemical weapons – nerve paralytic compounds. Toxic effect of these compounds is based on irreversible inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE).

In case of intoxication by these compounds anticholinergic drugs (atropin) and reactivators of AChE are usually used as antidotes. The effect of the reactivators is based on splitting the complex enzyme-inhibitor. Pralidoxim, trimedoxim, obidoxim and asoxim (HI-6) are still the most often used reactivators all over the world. They are the compounds which contain oxime group and one or two quarternary nitrogens in their molecule, what ensures that their affinity to AChE will be strong enough.

Screening and synthesis of new more effective broad-spectrum reactivators of AChE with lower side effects is still very actual and discussed theme. Strategy of the development of new AChE reactivators includes several steps: description of mechanism of intoxication by organophosphorus inhibitors at molecular level (molecular design), prediction of new structures of AChE reactivators by artificial neural networks (ANN), their synthesis, verification of their effectiveness *in vitro* and finally *in vivo* tests.

According to my publications, the best reactivator for cyclosarin was oxime K033 and in case of AChE inhibited by chlorpyrifos the oximes trimedoxime and obidoxime. According to some new articles published by Faculty of Military Health Sciences, University of Defence the most effective reactivator was oxime HI-6. Unfortunately oxime HI-6 is not able to reactivate AChE inhibited by tabun and pesticides. In case of intoxications by tabun the most effective reactivators were oximes K027 and K048. Oxime K027 seems to be even one of the promising candidates for treatment of intoxications caused by a wide spectrum of organophosphates.

Recently, some combinations of two oximes together (HI-6 + trimedoxime, HI-6 + K-203) have been tested as well. However, future tests are needed, and there is also a question concerning toxicity of using two oximes together.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ANN	umělé neuronové sítě (artificial neural networks)
AChE	acetylcholinesterasa
BCHL	bojové chemické látky
BuChE	butyrylcholinesterasa
CAS RN	registrační číslo podle Chemical Abstract Service
CNS	centrální nervová soustava
ChE	cholinesterasa
DFP	diisopropylfluorofosfát
DMF	dimethylformamid
FVZ UO	Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany
GA	genetický algoritmus (genetic algorithm)
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě (high density lipoproteins)
HEB	hematoencefalická bariéra
HI-6	asoxim
HTS	vysokoučinný screening (high throughput screening)
huBuChE	lidská butyrylcholinesterasa
LBVS	virtuální screening založený na ligandu (ligand based virtual screening)
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě (low density lipoproteins)
MLR	multilineární regrese
MPEG	methoxy-polyethylenglykol
NMR	nukleární magnetická rezonance
NPL	nervově-paralytické látky
OFI	organofosforové inhibitory
2-PAM	pralidoxim
PCA	metoda hlavních komponent (principal component analysis)
PEG	polyethylenglykol
PLS	metoda parciálních nejmenších čtverců (partial least squares)
PON	paraoxonasa
PTE	fosfotriesterasa
rHu-AChE	rekombinantní lidská acetylcholinesterasa

QSAR	vztah mezi strukturou a aktivitou látky (quantitative structure-activity relationship)
QSPR	vztah mezi strukturou a vlastnostmi látky (quantitative structure-property relationship)
SBVS	virtuální screening založený na struktuře (structure based virtual screening)
SOM	samoorganizující se mapy
SVM	support vector machine
VS	virtuální screening

1. ÚVOD

Vojenská toxikologie má v Hradci Králové mnohaletou tradici.(1) Po roce 2000 se rozvinula spolupráce Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy s Katedrou toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany. Zpočátku byl výzkum zaměřen hlavně na obranu proti bojovým chemickým látkám a pesticidům, ale později se zaměřil i na léčbu nemocí, jako jsou například myasthenia gravis, Alzheimerova nemoc apod.

Strategie vývoje nových reaktivátorů acetylcholinesterasy na Katedře toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví zahrnuje několik kroků: popis mechanismu intoxikace bojovými chemickými látkami na molekulární úrovni (molecular design), predikci nových struktur reaktivátorů AChE pomocí umělých neuronových sítí (ANN), jejich syntézu, ověření jejich účinnosti *in vitro* (potenciometrická titrace, Ellmanova metoda) a testy *in vivo* (terapeutický index, LD50, reaktivace v různých tkáních, neuroprotektivní funkce).(2)

Předložený soubor publikovaných prací je věnován především hledání vztahů mezi strukturou reaktivátorů acetylcholinesterasy a jejich schopností reaktivovat cyklosarinem a chlorpyrifosem inhibovaný enzym. Příprava a *in vitro* měření uvedených látek probíhala na Katedře toxikologie. Kromě mě se na měření a hlavně syntézách nových látek podíleli také diplomanti a techničtí pracovníci této katedry.

Katedru toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany jsem začala navštěvovat jako studentská vědecká síla už v průběhu studia třetího ročníku farmacie. Později jsem zde vypracovala svou diplomovou práci na téma Vztah mezi strukturou reaktivátorů acetylcholinesterasy a jejich schopností reaktivovat cyklosarinem a chlorpyrifosem inhibovaný enzym (3) a v návaznosti na toto téma jsem pak pokračovala studiem doktorského studijního programu. V nedokončeném postgraduálním studiu jsem se věnovala především hledání strukturálních vztahů reaktivátorů a jejich biologickou aktivitou pomocí umělých neuronových sítí.

2. ACETYLCHOLIN A ACETYLCHOLINESTERASA

Acetylcholin, po chemické stránce ester kyseliny octové s bazickým alkoholem cholinem, je hlavním neurotransmiterem cholinergního nervového systému. Jako přirozený mediátor má schopnost stimulovat jak muskarinové, tak nikotinové receptory, a proto ho řadíme mezi přímá cholinomimetika. Možnost interakce s různými typy receptorů je dána velkou konformační pohyblivostí molekuly acetylcholinu.(4)

Acetylcholin je velmi rychle rozkládán enzymem *acetylcholinesterasou* (AChE; EC 3.1.1.7). Druhým degradačním enzymem je méně substrátově specifická *pseudocholinesterasa* (cholinesterasa, též *butyrylcholinesterasa*; EC 3.1.1.8), která přednostně rozkládá jiné substráty než acetylcholin (např. butyrylcholin). Je přítomna např. v plazmě, játrech a pouze v omezeném rozsahu v neuronech periferního a centrálního nervového systému.

Na molekulární úrovni mají AChE a BuChE z 65 % společnou sekvenční homologii aminokyselin a jsou kódovány různými geny na lidských chromozomech 7 u AChE a 3 v případě BuChE. O vzniku odlišných, avšak příbuzných molekulárních forem obou enzymů rozhoduje jediný gen v důsledku alternativního sestřihu kódovací oblasti původního transkriptu. Tyto příbuzné molekulární formy pak mají podobné katalytické vlastnosti, ale odlišnou buněčnou a mimobuněčnou distribuci a nekatalytické aktivity.(5)

Molekula AChE je tvořena dvěma peptidovými řetězci α a β . Aktivní místo enzymu, kde dochází k rozkladu acetylcholinu, se nachází na řetězci α .(6) Skládá se ze dvou podjednotek: esteratického centra, které obsahuje katalytickou triádu aminokyselin Ser 200, His 440 a Glu 327, a z anionické podjednotky, která slouží hlavně k navázání kvarterního dusíku acetylcholinu.(7) Toto tzv. α -anionické místo je tvořeno koncovým karboxylem asparagové, případně glutamové kyseliny. Řetězec β obsahuje tzv. β -anionické místo a oblast hydrofobních interakcí.

Obvykle se uvádí, že nejprve dochází k vytvoření iontové vazby mezi amoniovou skupinou acetylcholinu a α -anionickým místem enzymu. Není ale vyloučeno, že pro navázání acetylcholinu jsou důležitější právě hydrofobní reakce.(6)

Aktivní místo BuChE má na rozdíl od AChE 6 ze 14 aromatických zbytků aminokyselin nahrazeno zbytky alifatickými. To způsobuje, že aktivní místo BuChE je mnohem větší než u AChE, a tento rozdíl je pravděpodobně také zodpovědný za rozdílnou substrátovou specifitu obou enzymů.(8)

Velmi rychlé ukončení účinku acetylcholinu je životně důležité. Při nedostatečném rozkladu hrozí jeho kumulace a *akutní cholinergní krize* v důsledku dlouhodobého nadměrného dráždění cholinergních receptorů.(9) Klinickým důsledkem nadměrného dráždění cholinergních receptorů jsou v závislosti na jejich lokalizaci a typu muskarinové, nikotinové a centrální klinické příznaky. Mezi *muskarinové* příznaky patří nauzea, zvracení, zvýšená střevní peristaltika, slinění, slzení, bradykardie, arytmie a poruchy akomodace. *Nikotinové* příznaky se projevují třesem, svalovou ochablostí, svalovými záškuby přecházejícími v křeče až paralýzu svalů dýchacích. *Centrální* příznaky jsou charakterizovány bolestmi hlavy, neklidem, zmateností, závratěmi, bezvědomím a útlumem dechových center.(10)

Neurologické příznaky mohou po intoxikaci přetrvávat velmi dlouhou dobu, řádově až několik měsíců, kdy se objevuje např. únava, depresivní stavy, poruchy paměti, zhoršená koncentrace, emocionální výkyvy a další.

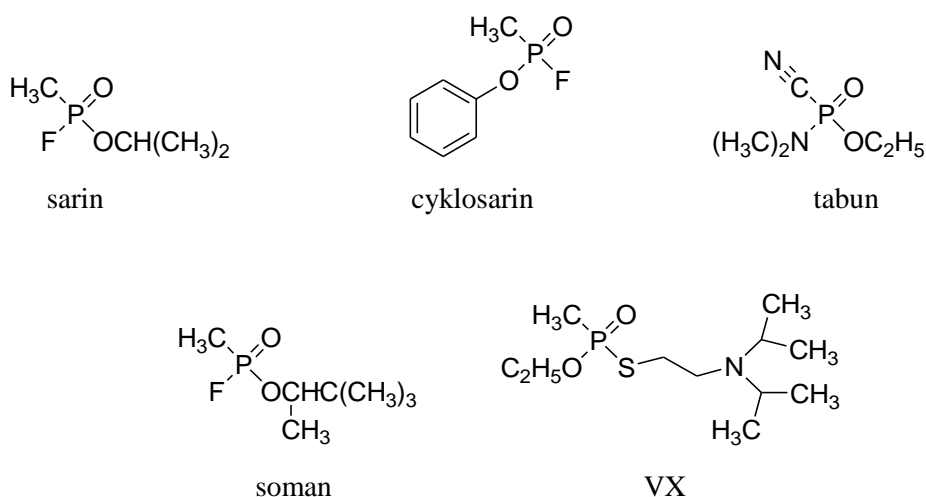
Specifickou komplikací otrav OFI může být *remise* otravy daná buď vyplavením OFI z depotních míst, nebo jejich uvolněním z vazby na bílkoviny krevní plazmy. V případě otravy organofosforovými insekticidy může být klinický stav komplikován tzv. *letální syntézou* (metabolizace méně toxického OFI v toxičtější formu).

Po období latence může dojít k parestézii končetin, obrně volních pohybů a následně ke stadiu denervace s vývojem těžké atrofie svalů horních i dolních končetin. Období rekonvalescence a částečné reparace bývá velmi dlouhé, řádově může trvat až roky.(11)

3. INHIBITORY ACETYLCHOLINESTERASY

Inhibitory AChE označujeme jako nepřímá cholinomimetika. Lze je rozdělit na inhibitory *neacylující*, které se vážou pouze na anionické místo AChE, a *acylující*, které reagují s AChE podobně jako acetylcholin. Acylující inhibitory mohou být *karbamátové* (fysostigmin, neostigmin) nebo *organofosforové*.

Organofosforové inhibitory (OFI) jsou vesměs vysoce lipofilní sloučeniny dobře pronikající biologickými membránami a působící jak periferně, tak centrálně. OFI mohou být odvozeny od kyseliny fosforečné nebo fosfonové, případně jejich thioanalogů. K nejstarším a vysoce toxickým sloučeninám tohoto typu patří **tabun**, **sarin** a **soman**, známé jako bojové chemické látky (BCHL).



Obr.1: Chemické struktury nejznámějších nervově paralytických látek.

Při kontaktu OFI s organismem je blokován serinový hydroxyl aktivního místa AChE zbytkem kyseliny fosforečné nebo fosfonové. Inhibovaný enzym pak není schopen plnit svou fyziologickou funkci – hydrolyzovat zvýšené množství acetylcholinu v periferních efektech, vegetativních gangliích a v nervosvalovém spojení. Navíc komplex enzym-inhibitor podléhá tzv. stárnutí (ageing), během kterého se stává ještě pevnějším a vede k nezvratné (ireverzibilní) inhibici.(12)

Vztahy mezi strukturou a účinkem OFI lze shrnout takto:

- estery fosfonové kyseliny bývají toxicitější než analogické estery fosforečné kyseliny
- sloučeniny s jednou vazbou P-N bývají toxicitější než sloučeniny se dvěma vazbami tohoto typu
- toxicita klesá v řadě F, I, CN
- oxosloučeniny jsou toxicitější než jejich thioanalogy.(6)

Sloučeniny tohoto typu našly největší uplatnění jako pesticidy a jako nejnebezpečnější skupina bojových chemických látek (nervově paralytické látky, NPL). Z pesticidů patří mezi nejpoužívanější např. dichlorvos, chlorpyrifos, malathion, paraoxon a další.

Na následky otrav pesticidy stále umírá velké množství lidí a ve většině případů se tomu tak děje v rozvojových zemích. Velkým problémem je zde samozřejmě také nedostatek ochranných pomůcek, které by pracovníky před chemikáliemi ochránily. Pesticidy se navíc často kumulují v tukové tkáni a poté dochází k jejich zpětnému uvolňování do krve a k recidivě otrav. Během metabolizace v těle dochází většinou k detoxikačním reakcím za vzniku méně toxických metabolitů, v některých případech je však vlastní látka v těle naopak oxidována na mnohem toxičtější derivát, který pak po opětovném vyplavení do krve způsobí novou vlnu intoxikace.(11)

Organofosforové sloučeniny (OFI) se používají také například v průmyslu jako změkčovadla, hydraulické kapaliny, pro nehořlavé úpravy, ve veterinární a humánní medicíně.

V současné době je cílem výzkumu nalézt centrálně působící inhibitory AChE využitelné při léčbě **demencí Alzheimerova typu**. V praxi se dříve používal *takrin* (9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin). Byl to první, široce používaný inhibitor obou cholinesteras – jak acetylcholinesterasy, tak i butyrylcholinesterasy, ačkoliv klinický účinek inhibice BuChE prokázán nebyl. Dnes už se takrin (Cognex) pro své nežádoucí účinky v gastrointestinálním traktu a jaterní toxicitu nepoužívá.(13) V klinickém zkoušení byl také jeden z analogů takrinu 7-MEOTA (9-amino-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroakridin), který byl vyvinut na Katedře toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové(4), ale jehož vývoj byl i přes svou úspěšnost pozastaven z finančních důvodů.

Z inhibitorů cholinesteras se k léčbě Alzheimerovy demence v dnešní době nejvíce používá donepezil, galantamin a rivastigmin. Účinnost inhibice jednotlivými typy těchto inhibitorů je v různých oblastech mozku významně odlišná, v důsledku rozdílné selektivity vůči jednotlivým globulárním formám AChE.

AChE existuje ve třech globulárních formách obsahujících jednu, dvě nebo čtyři katalytické podjednotky (monomerní G1, dimerní G2 a tetramerní G4).(5) Tyto globulární formy se liší chemickou stavbou a topografickým rozmístěním v CNS i na periférii.(14) V mozku zdravého člověka převládá tetramerní forma G4 a pouze minoritní je monomerní forma G1.(15) U pacientů s Alzheimerovou nemocí je

v některých oblastech mozku hladina membránově vázané G4 formy selektivně snížena až o 90 %, zatímco hladiny G1 AChE zůstávají z větší části nezměněny. G1 forma BuChE vykazuje v průběhu nemoci zvýšení o 30-60 %, zatímco hladina G4 formy klesá nebo zůstává nezměněna.(5)

Z terapeutického hlediska je nejdůležitější blokáda formy G1. Méně specifický terapeutický efekt má blokáda formy G4. Vysokou selektivitu vůči G1 vykazuje především rivastigmin. Donepezil a galantamin vykazují relativní selektivitu vůči AChE, zatímco rivastigmin koinhibuje jak AChE, tak i BuChE (duální inhibitor), a má proto i o něco více nežádoucích účinků, zpravidla však pouze přechodných. Jeho nespornou výhodou je i minimum lékových interakcí. Rivastigmin je ve světě nejpoužívanějším inhibitorem cholinesteras v léčbě Alzheimerovy demence. Výhodou galantaminu proti ostatním inhibitorům je schopnost alostericky modulovat nikotinové receptory, což zároveň zvyšuje produkci ACh.(14-16)

Jako terapeuticky slibné se v poslední době jeví také inhibitory přírodního původu. Např. alkaloid **huperzin A** se jeví jako silný reverzibilní inhibitor AChE. V současné době se využívá při léčbě Alzheimerovy nemoci v Číně. Výhodou huperzinu A je i to, že má delší působení než donepezil či rivastigmin a v některých studiích se ukazuje být účinnější než zmíněná léčiva. Oproti galantaminu a ostatním používaným léčivům rychleji prostupuje přes hematoencefalickou bariéru (HEB) a má lepší biologickou dostupnost při orálním podání. Jeho periferní cholinergní účinky jsou naopak nižší. Zajímavá je velmi nízká terapeutická dávka – v řádech setin miligramu na den. Huperzin A je nyní klinicky testován. V poslední době je výzkum zaměřen hlavně na jeho syntetické a semisyntetické analogy v naději, že by malé změny struktury mohly vést k vyšší účinnosti a k lepším farmakokinetickým vlastnostem. Ze stejné rostliny byl také izolován huperzin B, který má sám o sobě slabší inhibiční účinek než galantamin, ale jeho deriváty mají účinnost až o dva řády vyšší.(17)

4. REAKTIVÁTORY ACETYLCHOLINESTERASY

Účinek reaktivátorů AChE je založen na urychleném rozkladu komplexu enzym-inhibitor. K tomuto účelu jsou vhodné sloučeniny, které mají nukleofilitu vyšší než voda, např. hydroxylamin, hydroxamové kyseliny a oximy. Jediná možnost

reaktivace spočívá v ataku atomu fosforu v inhibovaném enzymu vhodným nukleofilem, který je následován odstoupením deprotonované formy.

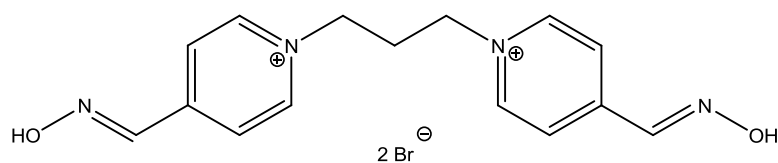
Účinné reaktivátory fosforylované nebo fosfonylované AChE by měly splňovat tyto požadavky:

- přítomnost nukleofilní skupiny, schopné účinně štěpit vazbu P-O
- vysoká afinita k inhibovanému enzymu
- nízká toxicita
- vhodné farmakokinetické vlastnosti zajišťující v krátké době po podání dostatečnou koncentraci reaktivátoru na místě určení
- široké spektrum, tj. schopnost reaktivovat AChE inhibovanou různými OFI

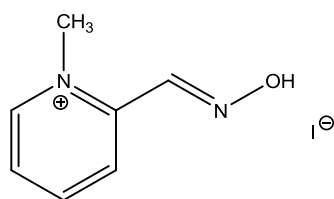
Reaktivátory jsou někdy souhrnně označovány jako oximy, protože obsahují v molekule oximovou skupinu, jež je za pH lidské krve částečně disociována. Vzniklý oximátový anion je pak vlastním nukleofilem štěpícím vazbu mezi inhibitorem a enzymem. Z chemického hlediska se jedná o látky, které mají kromě oximové skupiny ještě další společné základní strukturní rysy důležité pro reaktivaci:

- přítomnost kvarterního dusíku
- u biskvarterních látek přítomnost spojovacího řetězce proměnlivé délky.

Přítomnost kvarterního dusíku v molekule reaktivátorů AChE zajišťuje afinitu k enzymu. Oximy s kvarterním dusíkem v molekule mohou reagovat jak s esteratickým, tak anionickým místem acetylcholinesterasy. **Pralidoxim** (2-PAM) je zástupcem monokvarterních oximů. Nevýhodou této sloučeniny je její špatný průnik do centrální nervové soustavy (CNS), ačkoliv bylo zjištěno, že jde stále ještě o lipofilnější látku než biskvarterní oximy a její penetrace přes HEB se pohybuje kolem 10 %. Biskvarterní pyridinaldoximy sice mohou reagovat se dvěma anionickými centry enzymu a mají proto vyšší účinek reaktivace, ale jejich prostup přes HEB dosahuje maximálně 6 %.(18) Ze sloučenin tohoto typu se používá například **trimedoxim**.



trimedoxim



pralidoxim

Obr.2: Reaktivátory AChE.

Obecně platí, že reaktivační účinnost výše uvedených oximů je poměrně omezená, přičemž jednou z hlavních příčin omezené reaktivační účinnosti těchto reaktivátorů je rychlost stárnutí inhibovaného enzymu. Proto akutní intoxikace somanem, u něhož byla pozorována nejrychlejší dealkylace, je považována za nejhůře léčitelnou otravu nervově paralytickými látkami (NPL), zatímco akutní intoxikace látkou VX, pro niž je charakteristická velmi pomalá dealkylace, je velmi dobře léčitelná.(11)

5. LÉČBA INTOXIKACÍ ORGANOFOSFOROVÝMI INHIBITORY

Inhibice enzymu AChE je v současnosti považována za hlavní mechanismus toxického účinku OFI. Inhibice tohoto enzymu má za následek změny v mnoha důležitých tělesných funkcích.(19)

Současná léčba intoxikace OFI zahrnuje tři strategie: podání anticholinergik (atropin, benaktyzin), cholinesterasu reaktivujících látek (oximy) a antikonvulziv (benzodiazepiny). Oximy, jako cholinesterasové reaktivátory, jsou stále považovány za jediná kauzální antidota při otravě OFI. Nicméně obojí, jak experimentální, tak klinické výsledky ukazují, že různé oximy nejsou srovnatelně účinné při otravách strukturně odlišnými OFI.(20) Hledání univerzálně použitelného oximu při otravách různými OFI tedy stále pokračuje.

Otravy sloučeninami fosforu jsou četné zejména z důvodu jejich širokého využití jako insekticidů. Otravy způsobené organofosforovými insekticidy se řadí počtem 200 000 úmrtí ročně k jednomu z důležitých globálních zdravotních problémů.(21)

Nadále také zůstává hrozbou použití OFI jako bojových chemických látek a při teroristických útocích.(22)

Ačkoliv Světová zdravotnická organizace doporučuje použití pralidoximu jako antidota, jeho pozitivní přínos ve zmenšení počtu úmrtí či následků zůstává stále nejasný. Randomizovaná kontrolovaná studie v r. 2008 neprokázala žádný benefit v podání pralidoximu při otravách OFI. Naopak počet úmrtí byl po podání pralidoximu vyšší (24,8 %) než u pacientů po podání placebo (15,8 %).(21) Ani další studie, porovnávající účinnost pralidoximu ve srovnání s jinými oximy, nepodporují pokračování v léčbě intoxikací OFI pralidoximem. Z těchto studií vyplývá, že by mělo být doporučováno podání jiného účinnějšího oximu než je pralidoxim.(23)

Vzhledem k tomu, že při intoxikaci OFI dochází k hyperstimulaci na muskarinových a nikotinových receptorech, vyvstává také logická otázka, proč se k léčbě nepoužívá kromě kompetitivních muskarinových antagonistů (atropin) spolu s oximy také antagonist acetylcholinu na nikotinových receptorech.(24)

Luo W. a spol. uvádí, že nedostatečná účinnost léčby intoxikací organofosforovými inhibitory nespočívá v nedostatečném efektu atropinu jako antagonisty muskarinových receptorů, ale právě v nevyužití nikotinových antagonistů. Jejich práce naopak poukazuje na příliš silný antimuskarinový účinek atropinu, který sám o sobě často způsobuje vážné toxické reakce vedoucí až k ohrožení života. Proto by mělo být k léčbě intoxikací OFI doporučováno použití bezpečnějšího antidota se slabším antimuskarinovým účinkem než jaký vykazuje atropin. K ověření této hypotézy byla syntetizována látka *benthiaktzin* (diethylaminoethyl-thiobenzilát-hydrochlorid), která blokuje jak muskarinové (mnohem méně než atropin), tak i nikotinové receptory. Výsledky citované studie ukazují výraznější efekt benthiaktzinu v ochraně před intoxikacemi většinou OFI (hlavně VX nebo sarinem). Benthiaktzin vykazuje také nižší afinitu k mukóze gastrointestinálního traktu a tím také nižší nežádoucí účinky v těchto místech. Jeho terapeutický efekt spočívá hlavně v zabránění oběhového selhání.(25)

Další možnou uvažovanou strategií v boji s intoxikací OFI je využití biologických **scavengerů** („vychytávačů“). Publikace Doctora a Saxeny poukazuje na výhodu obráceného pohledu na OFI, tedy že není třeba pohlížet na organofosforové sloučeniny

jen jako na inhibitory cholinesteras, ale také na cholinesterasy jako na inhibitory OFI.(26)

V krevním oběhu reagují OFI s dalšími enzymy, především esterasami. Vazba OFI na esterasy nevyvolává ale žádné klinické příznaky, ty díky tomu působí jako „vychytávači“ OFI a zabraňují rozvoji akutní cholinergní krize tím, že na sebe vážou část dávky OFI, která vstoupila do vnitřního prostředí intoxikovaného organismu, a vyřazují ji tak z vlastního toxického účinku. Předpokládá se tedy, že pouze 1-3 % z celkové dávky OFI se dostane na místo toxického účinku – cholinergní synapse, ostatní je vyvázáno nebo detoxikováno. Současný výzkum se zabývá identifikací proteinů, využitelných jako bioscavengery, které by měly být schopné neutralizovat molekuly OFI v krevním oběhu ještě dříve, než se dostanou na místo svého toxického účinku.(27)

Bioscavengery využitelné k detoxikaci OFI spadají do tří kategorií: (A) ty, které **katalyticky hydrolyzují** OFI, jako např. organofosforové hydrolasy a anhydrazy, (B) enzymy, které OFI **navázáním neutralizují** (tzv. **stechiometrické bioscavengery**), jako např. cholinesterasy, (C) a ty, které obecně označujeme jako „**pseudokatalyzátory**“ – jedná se o kombinaci ChE a oximů, které OFI-inhibovanou ChE reaktivují.

Bioscavenger využitelný k detoxikacím OFI by měl být dostatečně stabilní, za nepřítomnosti OFI biologicky neškodný a neměl by vyvolávat imunitní reakci organismu.(28)

Biochemický mechanismus podání exogenního séra obsahujícího esterasy – např. lidskou BuChE – jako profylaxi byl již několikrát úspěšně testován. Jedním z důvodů je, že BuChE reaguje velmi rychle se všemi vysoce toxickými OFI, a nabízí tedy široké spektrum ochrany před účinky nervově paralytických látek, včetně somanu, sarinu, tabunu a VX. BuChE je také schopna vyvázat či neutralizovat řadu toxických esterů včetně heroinu, kokainu, prokainu a karbamátů.(7)

BuChE má také relativně dlouhý retenční poločas v krevním oběhu, minimální nebo žádné vedlejší účinky a její použití v léčbě intoxikací OFI se zdá být efektivní a bezpečné. Nicméně produkce lidské BuChE (huBuChE) vyžaduje velké množství potřebné plasmy, a proto by měl být další výzkum zaměřen také na vývoj rekombinantní lidské BuChE. V poslední době se ukazuje, že takto velké potřebné množství rekombinantní huBuChE by mohlo být získáváno z mléka transgenních koz.

Jednou z možných cest, jak získat stabilní rekombinantní BuChE s delším plazmatickým poločasem, je vytvořit rekombinantní BuChE ve spojení s lidským sérovým albuminem. Další možností, jak zlepšit farmakokinetické vlastnosti enzymu a různých proteinů, je modifikace molekuly připojením několika molekul polyethylenglykolu (PEG).(29)

Byla také testována a porovnáována farmakokinetika nativní a rekombinantní AChE (rHu-AChE). K prodloužení doby přítomnosti enzymu v krevním oběhu byla také použita cílená konjugace (pegylace) molekul polyethylenglykolu s molekulami lysinu na povrchu rHu-AChE.(30)

Pegylace velmi často zlepšuje nejen farmakokinetický, ale i toxikologický profil rekombinantních proteinů, a může také snižovat jejich imunogenitu. Nicméně jedná se o finančně náročnou metodu.(29)

Mezi zmiňované **katalytické bioscavengery** patří např. *lidská paraoxonasa* (PON1; EC 3.1.8.1). Jedná se o kalcium dependentní esterasu vyskytující se v krvi lidí jako složka subfrakce lipoproteinů o vysoké hustotě (HDL). Fyziologickým substrátem PON1 jsou oxidované fosfolipidy. PON1 je schopna chránit lipoproteiny o nízké hustotě (LDL) před oxidativním poškozením, a tedy se uplatnit např. v prevenci aterosklerózy apod. Skupina paraoxonas zahrnuje ještě další dva členy, PON2 a PON3. Chemicky je PON1 zařazována do skupiny esteras, na rozdíl od PON2 a PON3 je schopna hydrolyticky štěpit organofosfáty, např. paraoxon (podle kterého byla pojmenována), dále insekticidy parathion a chlorpyrifos a nervové jedy jako soman a sarin. V současné době již probíhají in vitro pokusy o syntézu různých mutant PON1, které by vykazovaly vysokou afinitu k oxidovaným lipidům nebo vyšší hydrolytickou aktivitu proti organofosfátům.(31)

Dalším nadějným katalytickým bioscavengerem je *bakteriální fosfotriesterasa* (PTE; EC 3.1.8.1), která byla izolována z bakterií druhu *Pseudomonas diminuta* a z půdních bakterií *Flavobacterium sp.* Nativní forma PTE je dimerický metaloenzym se dvěma atomy zinku. PTE je schopná hydrolyzovat široké spektrum OFI. Bakterie, která vykazuje expresi organofosforové hydrolasy, je volně žijící mikroorganismus, má jednoduché podmínky k růstu, je nenáročná a levná k pěstování. Její exprese organofosforové hydrolasy by mohla vést k levnému a lehce dostupnému biokatalyzátoru, který je užitečný k detoxikaci OFI.(32)

Největší nevýhodou v případě terapeutického využití PTE v terapii a profylaxi intoxikací OFI je její krátký plazmatický poločas a předpokládané vyvolávání imunitní reakce v organismu po jejím opakovaném podání. Rekombinantní PTE je nyní produkována pomocí různých expresních systémů (*Escherichia coli*). K získání výhodnějších vlastností tohoto enzymu byla připravena rekombinantní PTE konjugovaná s methoxypolyethylenglycolem (MPEG). S cílem snížit imunitní reakci organismu byly prováděny také experimenty s enkapsulací PTE do biodegradabilních nosičů (erytrocytů, liposomů).(33)

6. VÝVOJ NOVÝCH REAKTIVÁTORŮ ACETYLCHOLINESTERASY

Jak už bylo řečeno, terapie intoxikací organofosforovými inhibitory (OFI) není dosud uspokojivě vyřešena, přestože je hlavní mechanismus účinku znám. Je jím inhibice životně důležitého enzymu AChE. V současnosti je doporučováno podání kombinace atropinu a reaktivátoru. Atropin blokuje muskarinové receptory, čímž snižuje účinky kumulovaného neurotransmiteru acetylcholinu (ACh) v synapsích vegetativního nervového systému a v orgánech. Působí převážně periferně, je možno jej ale nahradit analogy, jako jsou skopolamin či benaktyzin, u nichž byl prokázán lepší centrální terapeutický efekt. Ani použití těchto analogů či atropinu však nevede k obnově fyziologického odbourávání ACh. K tomuto účelu byla vyvinuta skupina reaktivátorů oximového typu. Tyto reaktivátory znovuobnovují aktivitu inhibované AChE, ta pak začne znovu štěpit ACh a tím sníží jeho hladinu na fyziologickou mez.(34)

Při navrhování nových struktur reaktivátorů AChE je jedním ze základních požadavků na strukturu nového reaktivátoru zavedení kladného náboje do jeho struktury. Čím větší je afinita těchto látek k AChE, tím větší je pravděpodobnost, že nový reaktivátor AChE bude reaktivovat AChE inhibovanou OFI.(35)

Velkým problémem, který úzce souvisí s účinností těchto terapeutik, je jejich vstup přes hematoencefalickou bariéru (HEB) do centrálního nervového systému (CNS). Organofosforové inhibitory jsou ve většině případů lipofilní látky, které do CNS prostupují velmi dobře a zvyšují hladinu ACh a dalších neurotransmiterů v jednotlivých strukturách mozku. Hydrofilní terapeutika (reaktivátory AChE) přes HEB prostupují velmi obtížně, a jsou proto na úrovni CNS téměř neúčinná.(34)

Pro účinnost reaktivátorů je důležité, aby zůstala ve struktuře zachována oximová skupina, která je zodpovědná za vlastní reaktivaci. Avšak její přítomnost zároveň zvyšuje hydrofilitu. Dalším faktorem, jenž je nepříznivý pro průnik oximů přes HEB, je přítomnost kvarterního dusíku.

Podle posledních studií se zdá být velmi důležitá také velikost molekuly reaktivátoru a její molekulová hmotnost. Tuto teorii potvrzuje i fakt, že vstup monokvarterních oximů přes HEB je vyšší než u oximů biskvarterních.(36) Je třeba také brát v úvahu, že účinnost reaktivátorů není ve všech oblastech mozku stejná a některé části mozku se zdají být vůči reaktivaci rezistentnější než jiné.(37)

Existuje několik způsobů používaných pro měření koncentrace oximů v mozku, vedle přímého měření koncentrace oximů (radioaktivním značením, spektrofotometrií, chromatografií) lze měřit také účinnost reaktivované AChE nebo stanovit, nakolik je daný oxim schopen zabránit fyziologickým změnám v mozku, způsobeným intoxikací OFI (např. změny na elektroencefalogramu). V závislosti od použité metody stanovení koncentrace oximů v CNS a použitého druhu laboratorních zvířat můžeme obdržet často velmi rozdílné, někdy až protichůdné, hodnoty.(18)

Možností, jak zvýšit průnik látek do CNS je několik. Jednou z cest je zavedení pro tělo přirozené části do struktury oximu, uvažuje se o zavedení analogů aminokyselin, steroidů, popř. modifikované cukerné části. Tato změna ve struktuře umožní využít fyziologické přenašečové systémy zabudované v HEB. U takto pozměněných reaktivátorů je však předpokládán výrazný nárůst toxicity.

Další možností je využití tzv. prodrug neboli terapeutik, která se na účinná terapeutika změní až v místě působení pomocí místního fyziologického enzymatického systému. U reaktivátorů je potřeba „ukrýt“ náboj na dusíku nebo hydrofilní oximovou skupinu do doby, než prostoupí přes HEB.

Dalším diskutovaným faktorem je změna propustnosti HEB v důsledku samotné intoxikace některými OFI, např. při intoxikaci somanem.(36)

Také zvýšení lipofility může příznivě ovlivnit zvýšení koncentrace terapeutika v CNS. Princip zvýšení lipofility je založen na zmenšení počtu hydrofilních skupin nebo zavedení nových lipofilních skupin do struktury léčiva.

Tento princip byl využit v případě fluorace oximu K203 [(*E*)-1-(4-karbamoylpyridinium)-4-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-but-2-en-dibromidu]. Po zavedení

fluoru byla u tohoto fluorovaného analogu (KR-22836) jeho reaktivační účinnost snížena, ale naopak došlo ke zlepšení jeho neuroprotektivního účinku.(38)

Také průnik dvou nově testovaných oximů K027 [1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-carbamoylpyridinium)propan-dibromid] a K048 [1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-4-(4-karbamoylpyridinium)butan-dibromid] do CNS je jen minimální a nijak nevysvětluje jejich slibnou reaktivační účinnost. Účinnost reaktivace oximu K027 se zdá být podle in vitro testů dokonce lepší než u HI-6 a je velmi nadějným kandidátem pro léčbu intoxikací širokého spektra OFI.(39)

7. POČÍTAČOVÉ METODY VE VÝVOJI NOVÝCH REAKTIVÁTORŮ

Hledání a výzkum nových reaktivátorů je proces velmi zdlouhavý a ekonomicky náročný. Pro zavedení nové látky do terapie je zapotřebí otestovat několik tisíc sloučenin, a proto jsou intenzivně hledány nové způsoby, jak tento proces zkrátit, zkvalitnit a snížit jeho ekonomickou náročnost. Jedním z těchto způsobů je použití metod výpočetní chemie.

Počítačový model zkoumaného systému může poodhalit pohled, který zůstává experimentálními metodám skryt, a umožní poznat, co se v systémech ve skutečnosti děje. Nespornou výhodou je také fakt, že se omezí práce s nebezpečnými toxickými látkami.(40)

Jednou z počítačových metod, kterou jsme se na Katedře toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví ve spolupráci s Masarykovou univerzitou v Brně zabývali, byla aplikace programu AutoDock 3.0 při reprodukci rentgenových krystalografických struktur komplexů AChE s jejími reaktivátory (tzv.dokování). Tato metoda patří mezi metody virtuálního screeningu. Další počítačovou metodou, kterou jsem se v průběhu postgraduálního studia sama zabývala, byly umělé neuronové sítě (ANN), které tvoří samostatnou kapitolu.

7.1. Virtuální screening

Virtuální screening (VS) je soubor metod určených k prohledávání chemických knihoven za účelem nalezení sloučenin s podobnou aktivitou.(41) Jedná se

o doplňkovou nebo alternativní metodu k automatizovanému vysokoúčinnému screeningu, tzv. **HTS** (*high throughput screening* – testování velkého množství látek na určitý druh biologické aktivity), což je metoda časově i finančně velmi náročná a obvykle použitelná jen pro velké farmaceutické společnosti.

Metody virtuálního screeningu zahrnují dva hlavní přístupy: A) přístup založený na struktuře – *Structure based virtual screening* (*SBVS*), který vyžaduje znalost trojrozměrné struktury cílového receptoru. B) přístup založený na ligandu – *Ligand based virtual screening* (*LBVS*), který vyžaduje pouze znalost aktivní molekuly interagující s daným receptorem.(42)

A) Virtuální screening založený na struktuře (SBVS)

Jednou z nejčastěji používaných technik VS založených na struktuře je tzv. „**protein-ligand docking**“. Za pomoci této techniky lze najít pro dvě různé molekuly uspořádání, v jakém spolu mohou tyto dvě molekuly reagovat. Pokud takové uspořádání existuje, najde nejvhodnější orientaci obou molekul z hlediska největší komplementarity a nejmenší energie celého systému.(43)

Dokování (docking)

K tomu, abychom uvedenou techniku mohli použít pro řešení tak komplikovaného problému, jako je reaktivace, potřebujeme mít hned na začátku co nejpřesnější informaci o rozložení atomů studovaného systému v prostoru, tedy trojrozměrnou (3-D) strukturu tohoto systému. Ideální je, když nám takovou informaci poskytne nějaká experimentální metoda. Tato data lze získat rentgenovou difrakcí nebo nukleární magnetickou rezonancí (NMR).

Dnes je úloha převodu molekuly ze dvou dimenzí do reálného světa tří dimenzí vcelku uspokojujivě vyřešena pro malé molekuly, v našem případě pro inhibitory a reaktivátory samotné. Při generování 3D souřadnic se pak celková geometrie skládá z geometrií menších fragmentů. Podstatně komplikovanější je situace u velkých biopolymerů, jako je např. AChE.

K předpovědi struktury celého komplexu nám slouží některá z metod dokování. Tyto metody jsou ale obvykle schopné generovat značné množství ne vždy relevantních

řešení, jejichž spolehlivost se pak musí testovat dalšími omezujícími podmínkami. Prohledání stavového prostoru, kdy dvě molekuly tvoří komplex, představuje poměrně široký problém.

Existuje několik různých metod dokování: • dokování rigidního ligandu do rigidního receptoru • dokování flexibilního ligandu do rigidního receptoru • dokování flexibilního ligandu do „flexibilního“ receptoru.(43)

Pokud budeme považovat obě molekuly za zcela rigidní, řešíme úlohu se šesti stupni volnosti (tři rotační a tři translační). Zahrneme-li ale ještě možné konformační změny obou molekul, problém se stává bez dalších omezení téměř neřešitelným. Při dokování se využívá několika různých algoritmů, vedle manuálního dokování jsou to např. algoritmus Monte Carlo (ligand, v našem případě reaktivátor nebo inhibitor, je vkládán jako celá molekula), postupná stavba ligandu uvnitř receptoru (ligand je rozdělen na několik rigidních částí, které jsou spojené flexibilními můstky), evoluční algoritmy – GOLD, Darwin, AutoDock(42) (pozice ligandu uvnitř receptoru i konformační změny se zapisují pomocí genů a pak se energeticky hodnotí), simulované žihání, předgenerované knihovny konformací nebo molekulová dynamika, která zahrnuje do svých simulací jak flexibilitu ligandu, tak i receptoru.

Molekulová dynamika se snaží popsat reálné pohyby molekulárního systému v čase. Na výpočet pozicí a rychlostí jednotlivých atomů v čase jsou aplikovány *Newtonovy pohybové rovnice* klasické mechaniky a pomocí nich se získá vždy další pozice a rychlost každého atomu na základě předchozí. Tak je produkována posloupnost jednotlivých stavů, která se nazývá trajektorie. U molekulové dynamiky je trajektorie posloupnost stavů v čase. Aby mohly být použity Newtonovy pohybové rovnice, je třeba znát síly působící na jednotlivé atomy v systému. Tyto síly se vypočítají jako derivace energie, která se získá výpočtem.(44)

Pro předpověď vazebných energií mezi molekulami se v dokování používají tzv. *skórovací funkce*. Jejich úkolem je správně optimalizovat polohu ligandu uvnitř receptoru, provádět minimalizace systému, nebo správně určit vazebnou afinitu ligandu. Skórovací funkce by měly například umět vybrat vhodné a nevhodné ligandy z databáze. Existuje několik druhů těchto funkcí podle metody výpočtu: • metody založené na silovém poli • semiempirické funkce • empirické metody (zahrnují funkce jako např. Hammetovy substituční koeficienty, Hanchovy rozdělovací koeficienty, nebo jsou schopny popsat i pH systém). Příklady skórovacích funkcí: FlexX, ChemScore, DrugScore, Dock-like, atd.(43)

Jako příklad dokovacích programů lze uvést např. Glide, Slide, FRED, Hammerhead, GOLD, DOCK a další.(42)

B) Virtuální screening založený na ligandu (LBVS)

Mezi základní metody LBVS patří • metody založené na podobnosti • metody založené na deskriptorech • farmakoforové metody • metody strojového učení.

Metody založené na podobnosti

Metody založené na podobnosti se snaží využít poznatku, že strukturně podobné molekuly mívají zpravidla i podobné vlastnosti. Tato metoda se využívá např. pokud je známá pouze jedna molekula interagující s daným receptorem. Detekce podobnosti je v této metodě založena na superpozici každé z testovaných molekul z databáze k referenční známé molekule.(42)

Metody založené na deskriptorech

Protože přikládání každé jednotlivé molekuly z databáze zabírá příliš mnoho času, byly vytvořeny tzv. molekulové deskriptory. Molekulový deskriptor je v podstatě kvantifikovaná vlastnost molekuly, jinými slovy matematické vyjádření její struktury. Deskriptory lze vnímat také jako pozice na jednotlivých osách mnohorozměrného chemického prostoru, jakéhosi chemického vesmíru, který se snažíme prohledávat.(41)

Vypočítané deskriptory pak nachází uplatnění v predikci aktivity nebo vlastností molekul. Jedná se o tzv. **QSAR** (Quantitative structure-activity relationship) nebo **QSPR** (Quantitative structure-property relationship).

U metod QSAR je nutným předpokladem pravdivost tvrzení, že vlastnosti molekuly jsou funkcí její struktury. Právě nalezení této funkce (modelu) je důležitým krokem k vytvoření zobecňujícího modelu, na jehož základě je možno vypočítat vlastnosti látky, aniž by bylo nutné ji syntetizovat. K vytvoření QSAR modelu se používají různé chemometrické metody, většinou založené na regresi. Kromě biologické účinnosti látek jsou modelovány i další jejich vlastnosti, jako např. toxicita.(45)

Nejjednoduššími QSAR modely jsou lineární rovnice, ve většině případů obsahující logaritmus rozdělovacího koeficientu n-oktanol-voda, log P. Dále se používají metody

lineární regrese, multilineární regrese (MLR) nebo například metoda parciálních nejmenších čtverců (partial least squares, PLS).

V případě, že závislost mezi strukturálními parametry molekuly a její aktivitou není lineární, používají se nelineární metody, jako např. nelineární PLS. Z nelineárních vztahů jsou často publikovány kvadratické funkce. Zřejmě nejvíce používanou kvadratickou QSAR funkcí je multiparametrická Hanschova rovnice.

V současné době je známa celá řada postupů použitelných pro konverzi dat vedoucí k získání molekulových deskriptorů. Některé mohou být omezené pouze na úzkou skupinu látek (např. kódování pomocí fragmentů molekul), jiné jsou univerzální (například logaritmus rozdělovacího poměru n-oktanol/voda, molekulová hmotnost, apod.).

Molekulovým deskriptorem se rozumí nejrůznější strukturální, topologické informace popisující molekulu, mohou to být ale i fyzikálně-chemické či biologické vlastnosti dané molekuly. Existují různé skupiny molekulových deskriptorů: teoretické, experimentální, 1D, 2D, 3D, 4D, lineární, nelineární, skalární. Některé jsou odvozeny přímo z chemického vzorce (molekulová hmotnost, zastoupení prvků, van der Waalsovy síly), jednorozměrné vypovídají o substrukturách a fragmentech (počet a druh funkčních skupin, cyklů, vazeb, substituentů), dvourozměrné popisují vlastní uspořádání atomů v molekule a jejich propojení, případně i jejich částečné interakce, trojrozměrné jsou už odvozeny z prostorového či geometrického uspořádání molekuly a 4D vyjadřují stereo-elektronovou reprezentaci molekuly.⁽³⁾ Dále mezi experimentálně získané molekulové deskriptory lze řadit rozdělovací koeficienty a jejich logaritmy, teploty tání, varu, rozpustnosti, konstanty enzymových reakcí, jako např. reaktivační účinnost, nebo inhibiční a rychlostní konstanty.

Nejčastěji se pak data molekul uvádějí jako n-rozměrný vektor, kde je molekula reprezentována jako řádek hodnot n deskriptorů. Data více molekul pak tvoří matici a jsou následně různými chemometrickými metodami zpracovávána.⁽⁴⁵⁾

Hlavním problémem vytváření QSAR modelů není ani tak nedostatek teoretických molekulových deskriptorů, ale spíše výběr těch nejvhodnějších. Vysoký počet deskriptorů můžeme redukovat selekcí těch nejvýznamnějších (kroková MLR) anebo matematickou transformací do tzv. latentních proměnných (principal component

analysis PCA – metoda hlavních komponent; principal component regression, PCR).(46)

Mnoho deskriptorů je navzájem dobře korelovaných. PCA je metoda otočení prostoru takovým směrem, aby jednotlivé hlavní komponenty (nové osy prostoru) byly co nejméně korelované a vysvětlovaly tím více variability dat, čím mají nižší číslo. První hlavní komponenta je tedy lineární kombinací vstupních proměnných, která zahrnuje největší proměnlivost mezi všemi lineárními kombinacemi.(46)

Výhoda použití PCA spočívá v možnosti nahrazení velkého množství rozměrů (generovaných například spočítáním desítek molekulových deskriptorů) menším počtem hlavních komponent. Většinou vybíráme několik prvních hlavních komponent s větší variabilitou dat a poslední hlavní komponenty zobrazují především šum. Touto metodou je možné snížit počet deskriptorů o jeden či více řádů bez významné ztráty informace v nich obsažených.

Farmakoforové metody

Farmakofor obecně značí soubor strukturních prvků zodpovědných za účinnost léčiva. Kovalentní nebo trojrozměrné struktury známých ligandů jsou studovány s cílem najít strukturní prvky zodpovědné za jejich afinitu k receptoru.(47)

Metody strojového učení

Strojové učení (umělá inteligence) se často značně prolíná s oblastmi statistiky (shluková analýza, regresní analýza,...). Jak strojové učení, tak i statistika tvoří spolu s databázemi hlavní zdroje nové oblasti informatiky zvané dolování dat nebo také data mining. Vývoj těchto disciplín probíhal nezávisle na sobě do chvíle, než rozsah automaticky sbíraných dat začal uživatelům přerůstat přes hlavu.

Metody strojového učení hledají generalizaci libovolných dat nebo slouží pro adaptaci existujícího systému na změny okolí. Jinými slovy se zabývají technikami a algoritmy, které umožňují počítačovému systému se učit.

Hlavní používané modely strojového učení: • rozhodovací stromy • algoritmus k-nejbližších sousedů (k-Nearest Neighbor; neznámý objekt je zařazen podle nejbližšího prvku se známou klasifikací) • bayesovské učení (Bayesův klasifikátor odhaduje ze

znalosti parametrů pravděpodobnost třídy neznámého objektu) • neuronové sítě • genetické algoritmy • Support vector machine (SVM) • Kernelovy funkce.

V případě dobývání znalostí z databází lze mluvit o různých typech úloh, především o klasifikaci, predikci (náš případ predikce reaktivátorů AChE), a deskripci. Při klasifikaci i predikci je cílem nalézt znalosti použitelné pro klasifikaci nových případů. Požadujeme, aby získané znalosti co nejlépe odpovídaly danému konceptu, dáváme přednost přesnosti pokrytí na úkor jednoduchosti (připouštíme větší množství méně srozumitelných dílčích znalostí).

Podstatný rozdíl mezi klasifikací a predikcí spočívá v tom, že u predikce hraje důležitou roli čas; ze starších hodnot nějaké veličiny (starších již používaných reaktivátorů) se pokoušíme odhadnout její vývoj v budoucnosti (najít nové účinnější reaktivátory).

Algoritmy prohledávání prostoru můžeme rozdělit podle dvou hlavních přístupů k danému problému na algoritmus **generalizace** (specific to general search) a algoritmus **specializace** (general to specific search).

Je velmi důležité dodat, že uvedené algoritmy používají jak pozitivní, tak i negativní příklady ke svému učení. Je sice možné zobecnovat pouze z pozitivních příkladů, ale negativní příklady jsou důležité v prevenci přehnaného zobecnění.

Další dva klasifikační přístupy ke strojovému učení jsou podle samostatnosti učení, a to *učení s učitelem*, kdy se stroji předkládají objekty se známou klasifikací, které si „zapamatuje“ a je schopen podle nich zařadit neznámý objekt do definovaných tříd (rolí tady hraje také riziko, že učitel přiřadí objekt do špatné třídy) a *učení bez učitele*, kdy stroj musí sám v parametrickém prostoru například pomocí vyhledávání shluků odhalit třídy objektů.(48)

Genetické algoritmy

Princip práce genetického algoritmu je postupná tvorba generací různých řešení daného problému. Při řešení se uchovává tzv. populace, jejíž každý jedinec představuje jedno řešení daného problému. Jak populace probíhá evolucí, řešení se zlepšují. Tradičně je řešení reprezentováno binárními čísly, řetězci nul a jedniček, ale používají se i jiné reprezentace (strom, pole, matice).

Na začátku výpočtu je populace složena z naprosto náhodných členů, tzv. chromozomů. Ty se dále skládají z jakýchsi „genů“ kódujících hodnoty jednotlivých proměnných.

Během přechodu na novou generaci je pro každého jedince spočtena tzv. fitness funkce, která vyjadřuje kvalitu řešení reprezentovaného tímto jedincem. Podle této kvality jsou stochasticky vybíráni jedinci, kteří jsou modifikováni pomocí mutací, křížení, selekce nebo případně elitářství, čímž vznikne nová populace.(42) Tento postup se iterativně opakuje vždy, pokud nejsou splněna daná kritéria (maximální počet generací, průměrná nebo nejlepší hodnota účelové funkce atd.) a díky tomu se kvalita řešení v populaci postupně stále vylepšuje. Algoritmus se obvykle zastaví při dosažení postačující kvality řešení, případně po uběhnutí předem daného času.

Aplikace GA výrazně zvyšuje možnost nalezení globálního minima/maxima účelové funkce.(49)

7.2. Umělé neuronové sítě

Umělé neuronové sítě (artificial neural networks, ANN) jsou relativně novou chemometrickou metodou, používanou v oblasti hledání vztahů mezi molekulovou strukturou látky a jejími vlastnostmi, ať již fyzikálně-chemickými či biologickými.

Standardní algoritmy obvykle nepracují dobře s porušenými nebo nekomplexními daty. Bohužel v reálném světě je právě toto velmi často jediný dostupný druh dat a právě ke zpracování takovýchto dat se dobře hodí umělé neuronové sítě.(50)

ANN je prostředkem pro zpracování komplexních dat, využívajícím ke své práci množství propojených procesorů a výpočetních cest; jedná se o jakousi paralelní výpočetní jednotku. ANN jsou inspirovány architekturou lidského mozku; jsou schopny se učit a analyzovat rozsáhlé množiny dat, které mnohem lineárnější algoritmy jen těžko zvládnou.

Pokud hledáme pomocí ANN vztahy mezi příčinami a následky, pak je pro nás ANN pouze speciálním statistickým modelem pro nelineární regresi, jehož parametry je třeba odhadnout. Problém je v tom, že součet čtverců odchylek může mít velmi mnoho lokálních minim a my musíme hledat to nejhlubší, tedy globální. Naučenou ANN pak chápeme už jako celek, který nám umožní z budoucích příčin určit budoucí následky.(51)

Umělá síť pracuje tak, že vytváří spojení mezi mnoha různými procesními prvky, analogickými s lidskými neurony. Každý neuron dostává mnoho vstupních signálů od ostatních neuronů a poté na základě vyvažovacího systému produkuje signál výstupní. Hodnota na výstupu neuronu je v podstatě funkcí jeho vstupů. Neurony jsou organizovány do různých vrstev s různým počtem jednotek podle složitosti daného řešeného problému. Pro většinu problémů je plně dostačující 3-vrstevná síť, u velmi složitých 4-vrstevná. Struktura sítě neumožňuje předvídat ani znát přesný tok dat. Aby bylo možné ANN použít pro výpočet chování daného systému, je třeba ji nejprve adaptovat na příslušná data. Proces adaptace v matematickém slova smyslu znamená minimalizaci rozdílů mezi vypočtenými a požadovanými hodnotami.

V podstatě se dá říct, že hlavní myšlenkou neuronových sítí je nalézt prostorovou reprezentaci složitých datových struktur.(52) Jedná se vlastně o pohyb ve vícerozměrném prostoru, po tzv. hyperploše, kde jsou rozměry jednotlivé deskriptory.

Hlavním problémem při konstrukci sítě je volba její architektury. Vedle nejpoužívanější dopředné architektury existují i jiné – např. rekurentní, Hopfieldův model, Kohonenovy mapy atd.

Kohonenovy sítě se učí bez učitele, jejich výstup se tedy neporovnává s žádným předem známým vzorovým výstupem. Tyto sítě mapují vícerozměrný prostor do méně-rozměrného takovým způsobem, že blízké body budou na Kohonenově mapě také poblíž sebe.(41) Jedná se o jakési zobecnění shlukové analýzy, je to metoda založená na vzdálenostech. Hlavní smysl naučené sítě je v tom, že usměřňuje stará i budoucí data do relativně malého počtu, což umožňuje lépe sledovat jejich podobnost.(51)

Jedním z hlavních jevů, které se často vyskytují při použití ANN je jejich tzv. „přetrénování“, kdy síť pouze memorizuje dříve předložená vzorová data. Vykazuje-li ANN minimální odchylky mezi vypočtenými a naučenými hodnotami, neznamená to ještě, že je správně adaptovaná. Proto se vzorová data běžně rozdělují do dvou nebo tří trénovacích skupin (trénovací, verifikační) a teprve pokud všechny trénovací skupiny vykazují relativně stejné chyby, lze síť považovat za správně adaptovanou.

ANN se dají využít mimo predikce vlastností sloučenin také k optimalizaci a řízení chemické výroby, optimalizaci separací v analytické chemii, analýze spektroskopických dat, predikci spekter, interpretaci molekulových sekvencí, návrhu diagnóz a podobně.(53)

7.3. Konkrétní příklady použití ANN

Metody umělé inteligence mají nezastupitelné místo ve vývoji nových léčiv a ve studiu jejich vlastností *in silico*. Použití neuronových sítí v medicíně se soustřeďuje hlavně na klasifikační účely. Zajímavé uplatnění mohou ANN najít v klinických a experimentálních farmakokinetických a farmakodynamických studiích. Neuronové sítě jsou vhodné pro řešení nelineárních problémů a jsou mnohem flexibilnější než tradiční polyexponenciální farmakokinetické modely.(54) Poslední studie využívající metody ANN ukazují, že výsledky získané zpracováním pomocí ANN byly prokazatelně přesnější než získané metodou parciálních nejmenších čtverců (PLS). Navíc bylo zjištěno, že při předchozím zpracování dat pomocí metody hlavních komponent lze přesnost ještě zlepšit.

Jednou z aplikací Kohonenových sítí je výběr vhodných vlnových délek pro stanovení látek se silně překrytými excitačně-emisními spektry, čímž došlo k zjednodušení přípravy vzorku k analýze, a tím i k urychlení celého procesu.(49)

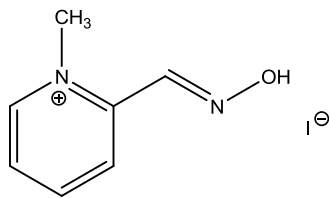
Umělé neuronové sítě už byly několikrát využity také ve vývoji nových reaktivátorů. Bhattacharje a kol. použili ANN k vytvoření modelu stereoelektronických vlastností reaktivátorů AChE inhibované tabunem.(55)

8. KOMENTÁŘ K PUBLIKOVANÝM PRACÍM

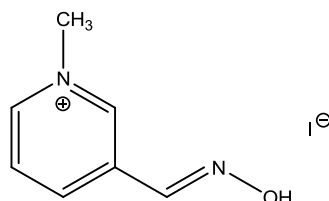
Ve své diplomové práci(3) jsem prováděla testování reaktivační schopnosti vybraných oximů připravených na Katedře toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany. Jako zdroj enzymu jsem používala 10% vodný homogenát mozku laboratorního potkana. Po 30minutové inkubaci s inhibitorem (chlorpyrifosem nebo cyklosarinem) jsem přidala reaktivátor a po dalších 10 minutách jsem stanovila reaktivační účinnost dříve popsanou metodou.(56)

Celkem bylo testováno 21 oximů. Jako standardy byly použity pralidoxim, trimedoxim a obidoxim.

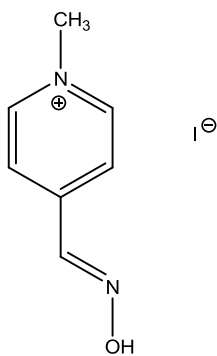
Struktury testovaných sloučenin



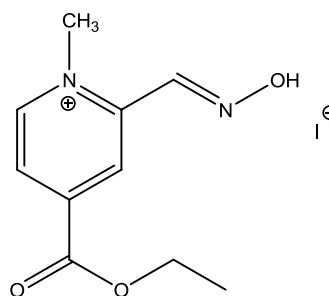
pralidoxim
CAS RN 94-63-3



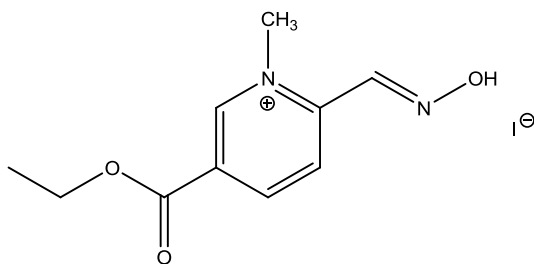
K 100
CAS RN 6060-51-1



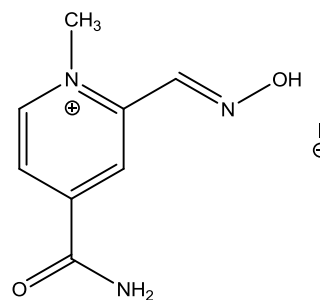
TO 025
Synonymum: K 024^a
CAS RN 2127-14-2



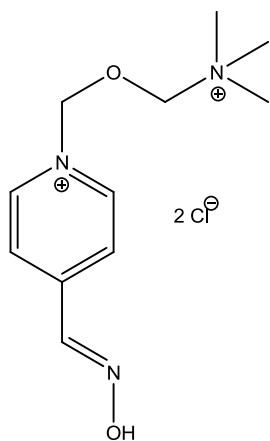
TO 237
CAS RN 208186-75-8



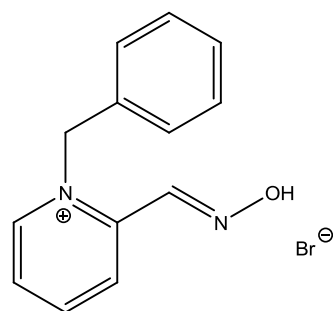
TO 238
CAS RN 251955-54-1



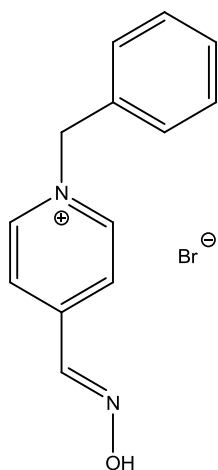
TO 231
CAS RN 180341-10-0



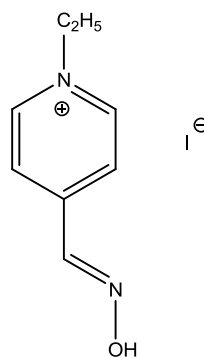
TO 097
CAS RN 34328-83-1



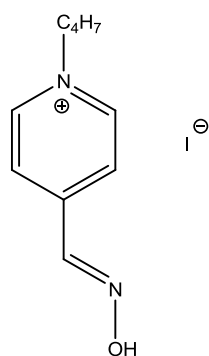
TO 021
Synonymum: K 347^a
CAS RN 54846-16-1



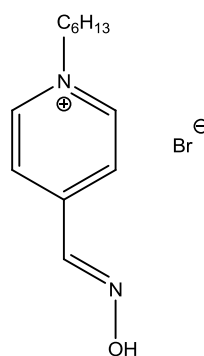
TO 061
CAS RN 78282-65-2



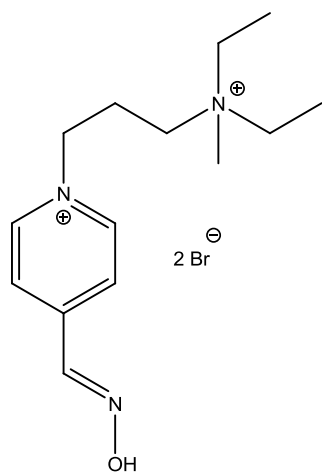
TO 062
CAS RN 92475-74-6



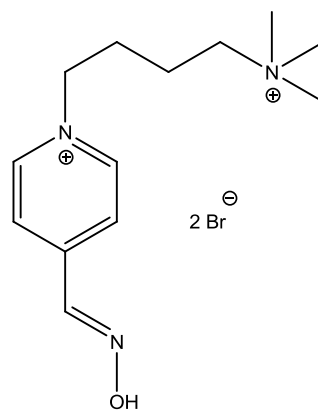
TO 064
CAS RN 116999-31-6



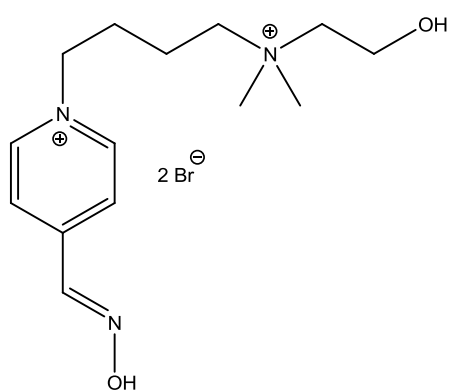
TO 063
CAS RN 81593-16-0



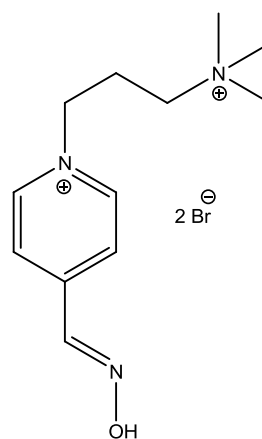
TO 100
CAS RN 13642-36-9



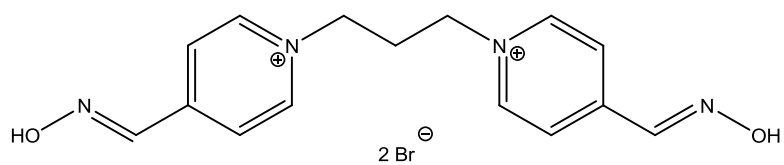
TO 098
CAS RN 34328-79-5



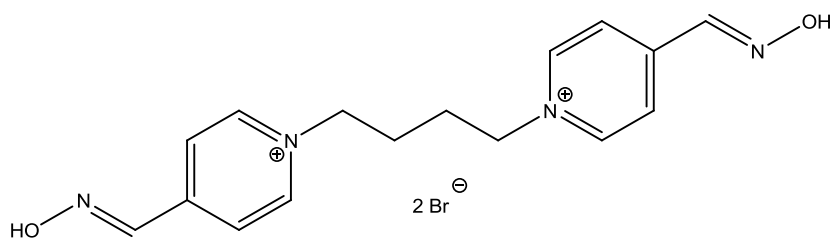
TO 096
CAS RN 34328-81-9



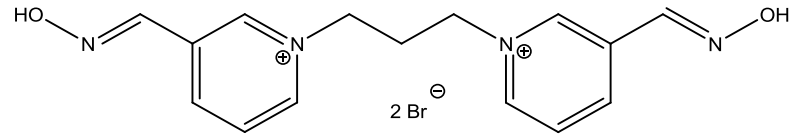
TO 094
CAS RN 3779-44-0



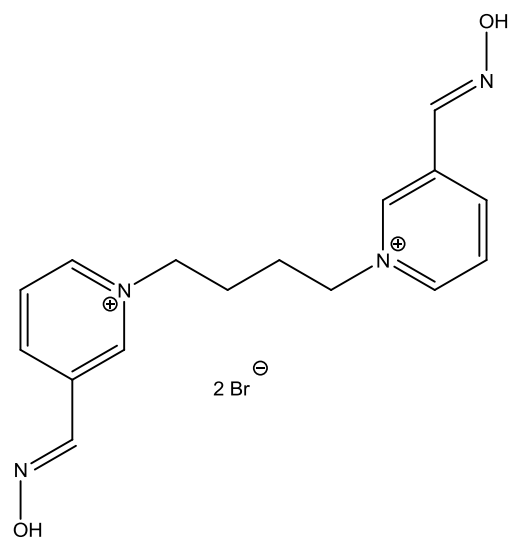
trimedoxim
CAS RN 56-97-3



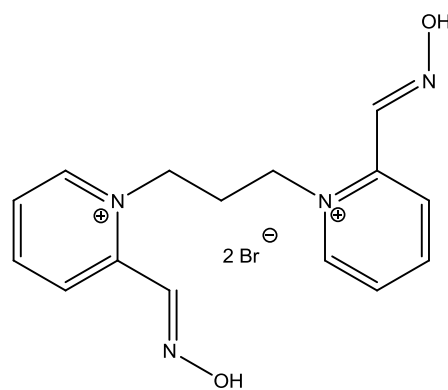
TO 046
Synonymum: K 074^a
CAS RN 2438-48-4



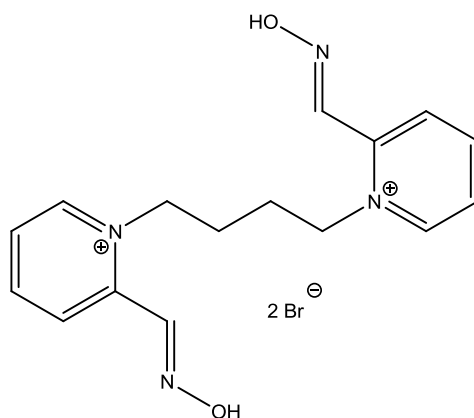
K099
CAS RN 6060-54-4



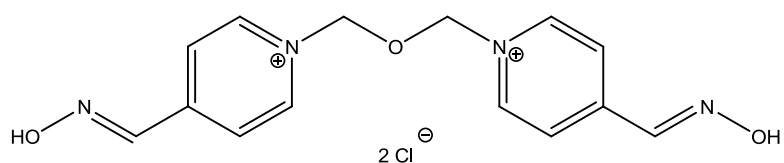
K 101
CAS RN 6060-53-3



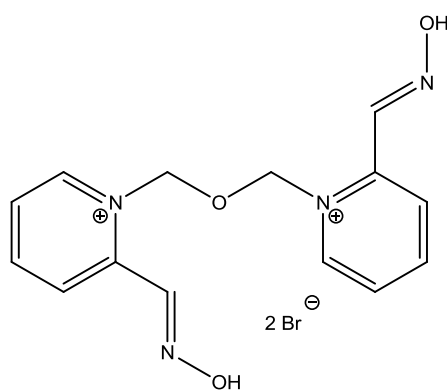
K005
CAS RN 42585-95-5



K033
CAS RN 133325-76-5



obidoxim
CAS RN 7683-36-5

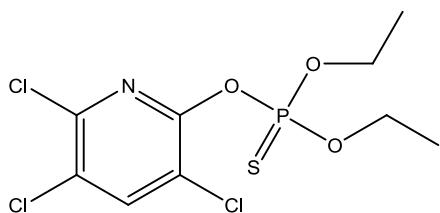


TO 050
Synonymum: K 316^a
CAS RN 1204520-51-3

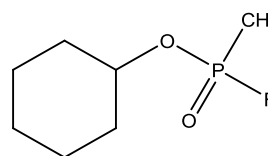
^aNěkteré oximy označené původně jako TO-oximy byly později připraveny znovu a označeny jako K-oximy v souladu s ostatními sloučeninami studovanými na Katedře toxikologie FVZ UO.

V první publikaci byly výsledky mé experimentální práce publikovány v časopise Arhiv za hygienu rada i toxikologiju (Archives of Industrial Hygiene and Toxicology)(57) – **Příloha 1**. Toto sdělení zahrnovalo tři monokvartérní sloučeniny – TO 231, TO 237

a TO 238. Žádná z těchto sloučenin nebyla schopná reaktivovat AChE inhibovanou nervově paralytickou látkou cyklosarinem. AChE inhibovanou pesticidem chlorpyrifosem nejlépe reaktivoval oxim TO 231 (82% reaktivace při koncentraci 1.0 mmol/l). Jeho reaktivační schopnost byla srovnatelná s pralidoximem a obidoximem. TO 238 měl účinnost přibližně poloviční a TO 237 byl neúčinný.



chlorpyrifos
CAS RN 2921-88-2



cyklosarin
CAS RN 329-99-7

V další studii, věnované vlivu oximů na AChE inhibovanou chlorpyrifosem(58) – **Příloha 2** – byly již zahrnuty i některé biskvartérní oximy (K 005, K 033, K 074, K 099 a K 101). V případě intoxikace pesticidy jsou vhodnými reaktivátory pralidoxim a obidoxim. Výhodou obidoximu je jeho vyšší účinnost.(59)

Dobrá reaktivační schopnost vůči AChE inhibované pesticidy byla prokázána i u trimedoximu(60), ale jeho praktickému využití brání nedostatek klinických studií.(20) V naší studii měl oxim K 074 v koncentraci 10^{-5} mol/l reaktivační schopnost srovnatelnou s trimedoximem. Z hlediska vztahů mezi strukturou a účinkem je důležité zjištění, že všechny tři reaktivátory (obidoxim, trimedoxim a K 074) mají na obou pyridiniových kruzích oximové skupiny v poloze 4 a liší se pouze charakterem spojovacího řetězce.

Reaktivace AChE inhibované chlorpyrifosem byla diskutována také v práci publikované v roce 2007)(61) – **Příloha 3**. Do této publikace byly zahrnuty výsledky reaktivační schopnosti všech sloučenin testovaných v mé diplomové práci, s výjimkou TO 231, TO 237 a TO 238. Na základě těchto výsledků byly formulovány podrobnější QSAR.

- V koncentraci 10^{-3} mol/l byly všechny studované sloučeniny dostatečně účinné, avšak v koncentraci 10^{-5} mol/l, která je dosažitelná v plazmě při terapeutickém použití reaktivátorů, měly uspokojivou reaktivační schopnost pouze trimedoxim,

obidoxim a K 074. Tím byla potvrzena důležitost oximových skupin v poloze 4 pyridiniových kruhů.

- Monokvartérní sloučeniny s oximovou skupinou v poloze 4 – K 024 (v publikaci označená jako 4-PAM), TO 061, TO 062, TO 063 a TO 064 měly reaktivační účinnost velmi nízkou bez ohledu na to, zda substituent na pyridiniovém dusíku byl alifatický (K 024, TO 062, TO 063 a TO 064) nebo aromatický (TO 061).

Zavedením dalšího kvartérního dusíku do postranního řetězce (oximy TO 094, TO 096, TO 098 a TO 100) se sice aktivita zvýšila, ale pouze při vyšší koncentraci. V koncentraci 10^{-5} mol/l byly tyto sloučeniny neúčinné. Z toho plyne, že pro dostatečnou reaktivační účinnost je nutné, aby sloučeniny byly symetrické a oba kvartérní dusíky byly součástí pyridiniového cyklu.

Práce publikovaná v časopise Letters in Organic Chemistry (62)- **Příloha 4** byla věnována dalším pokusům o formulace QSAR za pomoci studia reaktivace AChE inhibované cyklosarinem.

Pouze 6 testovaných oximů přesahovalo hranici reaktivace 5 %, která je považována za dostatečnou pro přežití laboratorních zvířat intoxikovaných OFI. Nejvyšší reaktivační účinnost dosahoval oxim TO 050, nicméně pouze v koncentraci 10^{-3} mol/l.

V koncentraci 10^{-5} mol/l byl nejúspěšnější oxim K033. Jedná se o biskvartérní sloučeniny s 3 nebo 4 členným spojovacím řetězcem a s oximovou skupinou v poloze 2.

V poslední uvedené publikaci byly diskutovány nové metody syntézy reaktivátorů AChE a jejich schopnost reaktivovat cyklosarinem inhibovanou AChE (63) – **Příloha 5**. Monokvartérní oximy byly připraveny novější metodou syntézy – metoda A (za použití acetonu a při nižší teplotě 60 °C). Biskvartérní sloučeniny byly připraveny starší metodou B (DMF, 100 °C), která se ukázala jako efektivnější, výsledků bylo dosaženo v kratším čase.

Reaktivační účinnost byla při obou měřených koncentracích nejvyšší u oximu K033. V koncentraci 10^{-3} mol/l se jevil jako úspěšný i oxim K100, ale v koncentraci 10^{-5} mol/l už žádnou účinnost neprokázal. Monokvartérní oximy byly zcela neúčinné.

9. ZÁVĚR

Nalezení a syntéza nového účinnějšího a hlavně univerzálně použitelného reaktivátoru AChE inhibované OFI zůstává i nadále nevyřešeným problémem. Z dosud známých reaktivátorů není prozatím bohužel žádný schopen reaktivovat enzym inhibovaný všemi typy NPL.

Z publikovaných prací vyplývá, že u intoxikací chlorpyrifosem byly neúčinnějšími reaktivátory obidoxim a trimedoxim. V případě reaktive AChE inhibované cyklosarinem se jevil jako neúčinnější oxim K033.

Z novějších studií se jako velmi nadějný jeví biskvarterní oxim HI-6, nedokáže však reaktivovat AChE inhibovanou tabunem ani pesticidy. V případě otrav tabunem byly velmi úspěšnými reaktivátory oximy K027 a K048.(64) Oxim K027 by mohl být v budoucnosti jedním z uvažovaných kandidátů pro léčbu širokého spektra otrav OFI.(65)

V posledních studiích je velmi diskutovaným tématem použití kombinace dvou oximů současně (HI-6 + trimedoxime, HI-6 + K203).(66) Otázkou zatím zůstává zvýšení toxicity při použití dvou reaktivátorů současně.

10. SEZNAM LITERATURY

- (1) BAJGAR J., FUSEK J. The history of military toxicology. *Acta Medica (Hradec Králové)*. 1997; 40(3): 79-82.
- (2) KUČA K., CABAL J., JUN D., KASSA J., BARTOŠOVÁ L., KUNEŠOVÁ G., DOHNAL V. Strategy for the development of new acetylcholinesterase reactivators – antidotes used for treatment of nerve agent poisonings. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005; 149(2): 429-31.
- (3) RAČÁKOVÁ V. Vztah mezi strukturou reaktivátorů acetylcholinesterasy a jejich schopností reaktivovat cyklosarinem reaktivovaný enzym [diplomová práce]. Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2006.
- (4) HARTL J., PALÁT K., DOLEŽAL M., MILETÍN M., OPLETALOVÁ V. *Farmaceutická chemie II/1*. Praha: Karolinum; 2001.
- (5) BRUNOVSKÝ M. Inhibitory cholinesteráz v léčbě Alzheimerovy nemoci. *Neurologie pro praxi*. 2007; 8(2): 112-17.
- (6) DOLEŽAL M., OPLETALOVÁ V., MILETÍN M., ZIMČÍK P., KUČEROVÁ M. *Farmaceutická chemie léčiv působících na autonomní nervový systém*. Praha: Karolinum; 2009.
- (7) PATOČKA J., KUČA K., JUN D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. *Acta Medica (Hradec Králové)*. 2004; 47(4): 215-28.
- (8) NESE COKUGRAS A. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turk J Biochem*. 2003; 28(2): 54-61.
- (9) LINCOVÁ D., FARGHALI H. et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén; 2002.
- (10) JOKANOVIĆ M., PROSTRAN M. Pyridinium oximes as cholinesterase reactivators. Structure-activity relationship and efficacy in the treatment of poisoning with organophosphorus compounds. *Curr Med Chem*. 2009; 16(17), 2177-88.
- (11) PATOČKA J. et al. *Vojenská toxikologie*. Praha: Grada Publishing; 2004.
- (12) PAVLÍKOVÁ R., MAREK J., MUSÍLEK K., FUSEK J., KUČA K., ŽDÁROVÁ KARASOVÁ J. *Nové biskvarterní inhibitory acetylcholinesterasy*

- jakožto profylaktika při otravě organofosfáty. Vojen Zdrav Listy. 2010; 79(2): 46-49.
- (13) CHOPRA K., MISRA S., KUHAD A. Current perspectives on pharmacotherapy of Alzheimer's disease. Expert Opin. Pharmacother. 2011; 12(3): 335-50.
- (14) PIDRMAN V., BOUČEK J., LÁTALOVÁ K. Léčba demence inhibitory cholinesteráz – bezpečnost a snášenlivost v praxi. Neurologie pro praxi. 2003; 4(5); 258-62.
- (15) JIRÁK R. Současné trendy v kognitivní farmakoterapii Alzheimerovy choroby. Psychiatrie pro praxi. 2002; 3(2); 55-58.
- (16) JIRÁK R. Farmakoterapie Alzheimerovy choroby. Praktické lékařství. 2009; 5(4), 176-78.
- (17) MARTIN J., KRŠKOVÁ Z., DUŠEK J. Huperzin A a jiné látky v léčbě Alzheimerovy choroby. Praktické lékařství. 2011; 7(1): 39-41.
- (18) LORKE D.E., KALASZ H., PETROIANU G.A., TEKES K. Entry of oximes into the brain: a review. Curr. Med. Chem. 2008; 15(8): 743-53.
- (19) ŽĎÁROVÁ KARASOVÁ J., KUČA K., JUN D., BAJGAR J. Užití Ellmanovy metody pro stanovení aktivit cholinesteras při *in vivo* hodnocení účinků reaktivátorů. Chem. Listy. 2010; 104(1): 46-50.
- (20) ANTONIJEVIĆ B., STOJILJKOVIĆ M. Unequal efficacy of pyridinium oximes in acute organophosphate poisoning. Clin Med Res. 2007; 5(1): 71-82.
- (21) EDDLESTON M., EYER P., WOREK F., JUSZCAK E., ALDER N., MOHAMED F., SENARATHNA L., HITTARAGE A., AZHER S., JEGANATHAN K., JAYAMANNE S., VON MEYER L., DAWSON A.H., SHERIFF M.H., BUCKLEY N. A. Pralidoxime in acute organophosphorus insecticide poisoning – a randomised controlled trial. PLoS Med. 2009; 6(6): e1000104. Dostupné z:
<http://www.plosmedicine.org/article/fetchArticle.action?articleURI=info:doi/10.1371/journal.pmed.1000104>
- (22) BIDMANOVÁ Š., POHANKA M., CABAL J., PROKOP Z., DAMBORSKÝ J. Biosenzory k včasné detekci otravných látek. Chem. Listy. 2010; 104(5): 302-08.
- (23) PETROIANU G.A., ARAFAT K., KUČA K., KASSA J. Five oximes (K-27, K-33, K-48, BI-6, and methoxime) in comparison with pralidoxime: *in vitro*

- reactivation of red blood cell acetylcholinesterase inhibited by paraoxon. *J Appl. Toxicol.* 2006; 26(1): 64-71.
- (24) SHERIDAN R.D., SMITH P.A., TURNER S.R., TATTERSALL J.E. Nicotinic antagonists in the treatment of nerve agent intoxication. *J R Soc Med.* 2005; 98(3), 114-15.
- (25) LUO W., GE X., CUI W., WANG H. Targeting cholinesterase inhibitor poisoning with a novel blocker against both nicotinic and muscarinic receptors. *Neurotox. Res.* 2010; 18(2): 173-86.
- (26) DOCTOR B.P, SAXENA A. Bioscavengers for the protection of humans against organophosphate toxicity. *Chem Biol Interact.* 2005; 157-158: 167-71.
- (27) JUN D., MUSILOVÁ L., MUSÍLEK K., KUČA K. *In vitro* ability of currently available oximes to reactivate organophosphate pesticide-inhibited human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. *Int J Mol Sci.* 2011; 12(3), 2077-87.
- (28) JUN D., MUSILOVÁ L., LINK M., LOIODICE M., NACHON F., ROCHU D., RENAULT F., MASSON P. Preparation and characterization of methoxy polyethylene glycol-conjugated phosphotriesterase as a potential catalytic bioscavenger against organophosphate poisoning. *Chem Biol Interact.* 2010; 187(1-3): 380-83.
- (29) HUANG Y.J, LUNDY P.M., LAZARIS A., HUANG Y., BALDASSARRE H., WANG B., TURCOTTE C., COTE M., BELLEMARE A., BILODEAU A.S., BROUILLARD S., TOUATI M., HERSKOVITS P., BEGIN I., NEVEU N., BROCHU E., PIERSON J., HOCKLEY D.K., CERASOLI D.M., LENZ D.E., WILGUS H., KARATZAS C.N., LANGERMANN S. Substantially improved pharmacokinetics of recombinant human butyrylcholinesterase by fusion to human serum albumin. *BMC Biotechnology.* 2008; 8: 50. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/8/50>
- (30) MAZOR O., COHEN O., KRONMAN C., RAVEH L., STEIN D., ORDENTLICH A., SHAFFERMAN A. Aging-resistant organophosphate bioscavenger based on polyethylene glycol – conjugated F338A human acetylcholinesterase. *Mol Pharmacol.* 2008; 74(3): 755-63.
- (31) FLEKAČ M., ŠKRHA J., NOVOTNÝ Z. Faktory ovlivňující aktivitu a koncentraci antioxidantního enzymu paraoxonáza 1. *Klin. Biochem. Metab.* 2006; 14(35), No.1: 33-39.

- (32) CHUNGJATUPORNCHAI WIPA, SIRIRAT FA-AROONSAWAT
Biodegradation of organophosphate pesticide using recombinant cyanobacteria with surface- and intracellular-expressed organophosphorus hydrolase. *J Microbiol Biotechnol.* 2008; 18(5): 946-51.
- (33) BUDAI M., CHAPELA P., GROF P., ZIMMER A., WALES ME., WILD JR., KLEBOVICH I., PETRIKOVICS I., SZILASI M. Physicochemical characterization of stealth liposomes encapsulating an organophosphate hydrolyzing enzyme. *J Liposome Res.* 2009; 19(2): 163-68.
- (34) ŽĎÁROVÁ KARASOVÁ J., KASSA J., MUSÍLEK K., Jung Y., Kuča K. Je fluorace oximů tou správnou cestou ke zvýšení průniku těchto látek do centrálního nervového systému? *Vojen Zdrav Listy.* 2010; 79(1): 23-27.
- (35) CABAL J., KUČA K., BAJGAR J. Vazebné vlastnosti látek obsahujících kvarterní dusík vůči enzymu AChE [online]. Liblice 2003: Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii, dodatky s. 1201. In *Chem. Listy.* 2003; 97; 2001-2007 [cit. 2011-07-30]. Dostupné z: http://www.vscht.cz/chem_listy/liblice/2003-2001-2007.pdf
- (36) ŽĎÁROVÁ KARASOVÁ J., STODŮLKA P., KUČA K. *In vitro* screening of blood-brain barrier penetration of clinically used acetylcholinesterase reactivators. *J Appl Biomed.* 2010; 8(1): 35-40.
- (37) VOICU V.A., THIERMANN H., RADULESCU F.S., MIRCIOIU C., MIRON D.S. The toxicokinetics and toxicodynamics of organophosphonates versus the pharmacokinetics and pharmacodynamics of oxime antidotes: biological consequences. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2009; 106(2), 73-85.
- (38) KASSA J., ŽĎÁROVÁ KARASOVÁ J., TESAŘOVÁ S., MUSÍLEK K., JUNG Y. A comparison of neuroprotective efficacy of the oxime K203 and its fluorinated analogue (KR-22836) with obidoxime in tabun – poisoned rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010; 107(5): 861-67.
- (39) LORKE D.E., HASAN M.Y., NURULAIN S.M., KUČA K., SCHMITT A., PETROIANU G.A. Efficacy of two new asymmetric bispyridinium oximes (K-27 and K-48) in rats exposed to diisopropylfluorophosphate: comparison with pralidoxime, obidoxime, trimedoxime, methoxime, and HI-6. *Toxicol Mech Methods* 2009; 19(4): 327-33.

- (40) URBÁNEK J. Aplikace programu AutoDock 3.0 při reprodukci rentgenových krystalografických struktur komplexů acetylcholinesterasy s jejími reaktivátory [bakalářská práce]. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2009.
- (41) SEDLÁK F. Chemický vesmír [online]. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze [cit. 2011-07-30].
Dostupné z: http://web.vscht.cz/sedlakf/dip/chem_space.pdf
- (42) REDDY SRINIVAS A., PRIYADARSHINI PATI S., PRAVEEN KUMAR P., PRADEEP H.N., NARAHARI SASTRY G. Virtual Screening in Drug Discovery – A Computational Perspective. *Curr Protein Pept Sci.* 2007; 8(4): 329-51.
- (43) KŘÍŽ Z. Docking (dokování) [online]. Letní škola Struktura a funkce biomolekul – počítačové modelování a experiment, Brno, 4.-8. září 2006. Národní centrum pro výzkum biomolekul, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta [cit. 2011-07-30]. Dostupné z:
<http://ncbr.chemi.muni.cz/school06/downloads/Docking-Kriz.pdf>
- (44) WIESNER J., KŘÍŽ Z., KUČA K., JUN D., KOČA J. Počítačové modelování a simulace – nové technologie při vývoji prostředků proti chemickým bojovým látkám. *Vojen Zdrav Listy.* 2005; 74(5-6): 165-71.
- (45) DOHNAL V. Aplikace umělých neuronových sítí pro predikci retenčních faktorů v tenkovrstvé chromatografii a modelování biologických aktivit oximů. [rigorózní práce]. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2007.
- (46) MELOUN M., MILITKÝ J. Kompendium statistického zpracování dat. Praha: Academia, 2002.
- (47) SPIWOK V., KRÁLOVÁ B. Virtuální screening léčiv. *Chem. Listy.* 2009; 103(1): 52-55.
- (48) BASTL P., KUČERA J., LÉWOVÁ D. Metody strojového učení [online]. Fyzikální týden 2003, Praha, 15.-19. června 2003. České vysoké učení technické v Praze, Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská [cit. 2011-07-30]. Dostupné z:
<http://fyztyd.fjfi.cvut.cz/2003/cd/prispevky/sbpdf/strojuc.pdf>
- (49) DOHNAL V., KUČA K., JUN D. Metody umělé inteligence: nový trend ve farmacii. *Česk Slov Farm.* 2005; 54(4): 163-67.
- (50) Co jsou to umělé neuronové sítě [online]. Science World: Technologie, 18. 12. 2001 [cit. 2011-07-30]. Dostupné z:
<http://scienceworld.cz/technologie/co-jsou-to-umele-neuronove-site-4077>

- (51) KUKAL J. Metody dolování dat a jejich užitečnost. *Automatizace*. 2008; 51(1): 40-42.
- (52) KOTYRBA M., VOLNÁ E. Samoorganizace v umělé inteligenci. *Umělá inteligence. Automatizace*. 2008; 51(12): 777-779.
- (53) KVASNIČKA V. a kol. Úvod do teorie neuronových sítí. Bratislava: Iris. 1997.
- (54) GORLICOVÁ L. Umělé neuronové sítě v lékařské diagnostice [diplomová práce] Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 2006.
- (55) BHATTACHARJE A.K., KUČA K., MUSÍLEK K., GORDON R.K. In silico pharmacophore model for tabun-inhibited acetylcholinesterase reactivators: a study of their stereoelectric properties. *Chem. Res. Toxicol.* 2010; 23(1): 26-36.
- (56) KUČA K., CABAL J. Evaluation of newly synthesized reactivators of the brain cholinesterase inhibited by sarin nerve agent. *Toxicol Mech Methods* 2005; 15(4): 247-252.
- (57) RAČÁKOVÁ V., HRABINOVÁ M., JUN D., KUČA K. Substituted monoquarternary oximes as reactivators of cyclosarin- and chlorpyrifos-inhibited acetylcholinesterase. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2006; 57(4): 387-390.
- (58) RAČÁKOVÁ V., JUN D., OPLETALOVÁ V., KUČA K. Reactivation of acetylcholinesterase inhibited by the pesticide chlorpyrifos. *J Appl Biomed.* 2006; 4(3): 147-151.
- (59) EYER P. The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning. *Toxicol. Rev.* 2003; 22(3): 165-90.
- (60) ANTONIJEVIĆ B., BOKOJNIĆ D., STOJILJKOVIĆ M.P., KILIBARDA V., MILOVANOVIĆ Z.A., NEDELJKOVIC M., MAKSIMOVIĆ M. Efficacy of trimedoxime in mice poisoned with dichlorvos, heptenophos or monocrotophos. *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2005; 96(2): 111-117.
- (61) KUČA K., RAČÁKOVÁ V., JUN D. Structure-activity relationships for in vitro oxime reactivation of chlorpyrifos-inhibited acetylcholinesterase. *Chem Pap.* 2007; 61(4): 256-261.
- (62) KUČA K., RAČÁKOVÁ V., JUN D., BAJGAR J. Structure-activity relationship of acetylcholinesterase reactivators – antidotes against nerve agents. *Lett Org Chem.* 2007; 4(3): 212-217.
- (63) MUSÍLEK K., LIPKA L., RAČÁKOVÁ V., KUČA K., JUN D., DOHNAL V., DOLEŽAL M. New Methods in Synthesis of Acetylcholinesterase Reactivators

and Evaluation of their Potency to Reactivate Cyclosarin-Inhibited AChE. Chem Pap. 2006; 60(1): 48-51.

- (64) KASSA J., KUČA K., BARTOŠOVÁ L., KUNEŠOVÁ G. The development of new structural analogues of oximes for the antidotal treatment of poisoning by nerve agents and the comparison of their reactivating and therapeutic efficacy with currently available oximes. Curr Org Chem. 2007; 11(3): 267-283.
- (65) KUČA K., MUSÍLEK K., JUN D., POHANKA M, GHOSH K., HRABINOVÁ M. Oxime K027: novel low-toxic candidate for the universal reactivator of nerve agent and pesticide inhibited acetylcholinesterase. J Enzyme Inhib Med Chem. 2010; 25(4): 509-512.
- (66) KASSA J., ŽDÁROVÁ KARASOVÁ J., SEP SOVÁ V., CAISBERGER F. The benefit of combinations of oximes for the reactivating and therapeutic efficacy of antidotal treatment of sarin poisoning in rats and mice. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2011; 109(1): 30-34.

11. PŘÍLOHY

Příloha 1: RAČÁKOVÁ V., HRABINOVÁ M., JUN D., KUČA K. Substituted monoquarternary oximes as reactivators of cyclosarin- and chlorpyrifos-inhibited acetylcholinesterase. Arh Hig Rada Toksikol. 2006; 57 (4): 387-390.

Příloha 2: RAČÁKOVÁ V., JUN D., OPLETALOVÁ V., KUČA K. Reactivation of acetylcholinesterase inhibited by the pesticide chlorpyrifos. J Appl Biomed. 2006; 4 (3): 147-151.

Příloha 3: KUČA K., RAČÁKOVÁ V., JUN D. Structure-activity relationships for in vitro oxime reactivation of chlorpyrifos-inhibited acetylcholinesterase. Chem Pap. 2007; 61 (4): 256-261.

Příloha 4: KUČA K., RAČÁKOVÁ V., JUN D., BAJGAR J. Structure-activity relationship of acetylcholinesterase reactivators – antidotes against nerve agents. Lett Org Chem. 2007; 4 (3): 212-217.

Příloha 5: MUSÍLEK K., LIPKA L., RAČÁKOVÁ V., KUČA K., JUN D., DOHNAL V., DOLEŽAL M. New methods in synthesis of acetylcholinesterase reactivators and evaluation of their potency to reactivate cyclosarin-inhibited AChE. Chem Pap. 2006; 60(1): 48-51.