

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Vztah mezi strukturou reaktivátorů
acetylcholinesterasy a jejich schopností
reaktivovat cykloserinem inhibovaný enzym

[diplomová práce]

2006

Veronika Račáková

Diplomová práce byla vypracována pod odborným vedením Doc. PharmDr. Martina Doležala, Ph.D. a Ing. Kamila Kuči, Ph.D.; kterým bych tímto chtěla poděkovat za veškerou pomoc a poskytnuté rady.

Děkuji také Mgr. Vlastimilu Dohnalovi, Ph.D. za zpracování naměřených dat pomocí umělých neuronových sítí a laborantce paní Martině Hrabinové za pomoc při měření biologických aktivit testovaných látek.

Tato práce vznikla za podpory projektu Grantové agentury Univerzity Karlovy Grant č. 126/2005/B-Bio/FaF a projektu Ministerstva obrany České republiky Grant č. ONVLAJEP 20031.

Obsah	Chyba! Záložka není definována.
SEZNAM ZKRATEK	4
1. Úvod	5
2. TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1 Acetylcholinesterasa	7
2.2 Inhibitory acetylcholinesterasy	11
2.3 Reaktivátory acetylcholinesterasy	17
2.4 Umělé neuronové sítě	21
3. Cíl práce	30
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
5. Diskuse	44
6. Závěr	46
7. Literatura	48

SEZNAM ZKRATEK

AChE	Acetylcholinesterasa
OFI	Organofosforové inhibitory
BCHL	Bojové chemické látky
AČR	Armáda České republiky
CNS	Centrální nervový systém
GA	Tabun
GB	Sarin
GD	Soman
GF	Cyklosarin
Glu	Glutamová kyselina
His	Histidin
KTOX	FVZ Katedra toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví
NPL	Nervově paralytické látky
Phe	Fenylalanin
Ser	Serin
Trp	Tryptofan
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
ANN	Umělé neuronové sítě
AN	Umělý neuron
M	mol/l
MD	Molekulové deskriptory
MLP	Vícevrstvý perceptron
MLR	Multilineární regrese
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship
QSPR	Quantitative Structure Property Relationship
PCA	Principal component analysis
PCR	Principal component regression
RMSD	Root mean square deviation
R _F	Retenční faktor
MP	Melting point
GA	Genetický algoritmus
SOM	Samoorganizující mapy
BA	Biologická aktivita
2D	Dvourozměrné molekulové deskriptory
3D	Trojrozměrné molekulové deskriptory
BBB	Hematoencefalická bariéra

1. Úvod

Výzkum v neurovědách a snahy zasáhnout do řízení centrálního i periferního nervového systému člověka prostřednictvím neurotransmiterů dnes patří k důležitým oblastem výzkumu. Přenos nervového vzruchu z neuronu na neuron se děje převážně chemicky. Tento fakt je důvodem, proč se touto oblastí zabývají nejen čistě medicínské, ale i biochemické a farmaceuticko-chemické obory.

Hlavním neurotransmiterem parasympatického nervového systému je acetylcholin. Nedostatek nebo naopak nadbytek tohoto mediátoru je pozorován u mnoha různých onemocnění, jako je např. Alzheimerova choroba, Myasthenia gravis, Parkinsonova nemoc. Látky, které mohou tento stav ovlivnit, nazýváme souhrnně jako cholinomimetika (vyvolávají v organismu podobné účinky jako endogenní mediátor acetylcholin) a cholinolytika (antagonizují účinek acetylcholinu).

Sloučeniny, které mají schopnost stimulovat muskarinové nebo nikotinové receptory podobně jako acetylcholin, označujeme jako přímá cholinomimetika. Sloučeniny, jejichž cholinomimetické působení je založeno na inhibici acetylcholinesterasy (enzym odbourávající acetylcholin) a na zvýšení hladiny endogenního acetylcholinu patří mezi nepřímá cholinomimetika.

Pro rozvoj ve skupině nepřímých cholinomimetik bylo důležité objasnění struktury a mechanismu účinku fysostigminu ve 20. a 30. letech minulého století. V tomto období byly objeveny také organofosforové inhibitory (OFI) cholinesteras. Ty měly sloužit především jako insekticida. Sloučeniny vyvinuté před a během 2. světové války však byly vysoce toxické a využitelné spíše jako bojové chemické látky (BCHL) než k pesticidním účelům. Od 50. let se výzkum zaměřil na vývoj sloučenin, u nichž byla strukturálními obměnami selektivně vystupňována toxicita pro hmyz a snížena jedovatost pro teplokrevné živočichy.

Paralelně s těmito snahami probíhal však nadále i vojenský výzkum, zaměřený na nalezení vysoce toxických OFI. Na rozdíl od relativně krátce působících karbamátových inhibitorů, odvozených od fysostigminu, působí OFI dlouhodobou tzv. ireverzibilní inhibicí cholinesterasy. Pro zrušení účinku inhibice je nutné použít tzv. reaktivátory acetylcholinesteras, jejichž vývoj probíhal od 50. let 20. století souběžně s vývojem organofosforových inhibitorů¹.

Sloučeniny stejné základní struktury jako OFI se dnes používají v průmyslu jako změkčovadla, hydraulické kapaliny, na nehořlavé úpravy, ve veterinární či humánní medicíně jako léčiva či jako sloučeniny k výzkumu nervových funkcí. Nejširšího použití dosáhly tyto látky ve vojenství jako nervově paralytické látky (NPL) např. sarin, soman, tabun a v zemědělství jako insekticidy (látky k hubení hmyzu), které jsou běžně dostupné – např. Metathion, Malathion, Actellic, In-stop aj.²

Z takto rozsáhlého použití plyne i vysoké riziko intoxikací OFI, ať už chronických nebo akutních, a tedy i potřeba co nejúčinnější terapie těchto otrav. Základem terapie otravy OFI je *antidotní terapie*, kterou je nutno zahájit co nejdříve. Antidotní terapie je založena na podávání anticholinergik (atropin, benactyzin) společně s *reaktivátory acetylcholinesteras*. Anticholinergika, označovaná jako *funkční antidota*, blokují účinek nahromaděného acetylcholinu na cholinergních receptorech. *Reaktivátory acetylcholinesteras*, označované jako *kauzální antidota*, obnovují aktivitu inhibované AChE, a tím umožňují její normální fyziologickou funkci.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Acetylcholinesterasa

2.1.1 Fyziologická funkce

Acetylcholinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7) je enzym – serinová hydroláza, patřící do skupiny esteras, který je odpovědný za rychlé ukončení účinku neuromediátoru acetylcholinu. Vyskytuje se především v cholinergních neuronech a v okolí cholinergních synapsí (ve vysoké koncentraci se nachází na nervosvalovém spojení). Hydrolyzuje především acetylcholin uvolněný nervovou stimulací do synaptické štěrbiny, a uvnitř nervových zakončení odpovídá za rozklad cytoplazmatického acetylcholinu.

Druhým degradačním enzymem je méně substrátově specifická tzv. *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.

Díky těmto dvěma enzymům se acetylcholin nevyskytuje v plazmě v detekovatelných množstvích a působí tedy skutečně jen jako neurotransmitter, nikoli jako hormon. Za normálních okolností je degradační enzym v nadbytku (přibližně 5krát vyšší aktivita) a nelimituje rozklad acetylcholinu.

Velmi rychlé ukončení účinku acetylcholinu je životně důležité. Cholinergní impulsy mohou vést k uvolnění až 1000 »kvant« acetylcholinu za sekundu a při nedostatečném rozkladu hrozí jeho kumulace a *akutní cholinergní krize* v důsledku dlouhodobého nadměrného dráždění cholinergních receptorů³. Klinickým důsledkem nadměrného dráždění cholinergních receptorů jsou v závislosti na jejich lokalizaci a typu muskarinové, nikotinové a centrální klinické příznaky.

Muskarinové příznaky se projeví zúžením zornic (mióza), na ciliárním svalu poruchou akomodace, ve spojivkách a nosní sliznici překrvením a otokem, na slinných, slzných a potních žlázách zvýšenou sekrecí, na sliznici a hladké svalovině dýchacích cest (zvýšená sekrece bronchiálních žlázek, zúžení bronchů), na hladké svalovině trávicího traktu a močového měchýře (zvýšená střevní peristaltika, bolesti až kolikovitého charakteru). Na srdci je v důsledku zvýšeného tonu parasymptatiku pozorována bradykardie a pokles krevního tlaku.

Nikotinové příznaky jsou způsobeny zvýšenou koncentrací acetylcholinu na nikotinových receptorech, na nervosvalových ploténkách a sympatických gangliích. Jsou charakterizovány svalovou ochablostí, třesem a záškuby jednotlivých příčně pruhovaných svalů, postupně se rozšiřující na všechny kosterní svaly těla. Svalové fascikulace brzy přecházejí v intenzivní tonicko-klonické křeče, které mohou vyústit až v ochrnutí (paralýzu) kosterního svalstva. Tento stav je krajně nebezpečný především v případě paralýzy dýchacího svalstva a následného výrazného omezení dýchání.

Centrální příznaky jsou charakterizovány depresiemi dechových a kardiovaskulárních center v oblasti prodloužené míchy, bolestmi hlavy, úzkostí, nadměrnou emoční labilitou, napětím, neklidem, závratěmi, depresivními stavy, zmateností, poruchami hybnosti a neřídka i bezvědomím. Bezprostřední příčinou smrti v případě těžkých až smrtelných intoxikací látkami inhibujícími AChE bývá akutní respirační insuficience daná poruchou funkce dechových center a paralýzou dýchacích svalů včetně bránice. Těžká dechová nedostatečnost postupně vede k zástavě dechu s následnou zástavou srdce.

V případě překonání akutní cholinergní krize je klinický obraz těžké intoxikace inhibitory AChE charakterizován celkovým metabolickým rozvratem především v důsledku dlouhodobé hypoxie a acidózy. Celé měsíce po akutní těžké intoxikaci mohou přetrvávat především neurologické a neuropsychické příznaky, mezi nimiž dominují zvýšená únava, poruchy spánku, emoční labilita, úzkostné až depresivní stavy a především poruchy retence paměti, učení a koncentrace.

Klinický stav intoxikovaného jedince může být komplikován poruchami organismu v důsledku celkového rozvratu metabolismu. Specifickou komplikací otrav nervově paralytickými látkami (NPL) může být remise otravy daná buď vyplavením NPL z depotních míst (týká se především somanu), nebo uvolněním NPL z vazby na bílkoviny

krvní plazmy. V případě intoxikace organofosforovými insekticidy může být klinický stav komplikován tzv. letální syntézou (metabolizace méně toxického organofosfátu v toxičtější formu).

Pozdní neurotoxický efekt je stav, který je charakterizován motorickými a senzorickými poruchami, histologickými změnami v periferních neuronech (degenerace axonů a následná degenerace myelinu), inhibicí a později dealkylací tzv. neurotoxické esterasy. Jde o stav, který se manifestuje za více dnů či týdnů po expozici. Je způsoben jen některými organofosforovými inhibitory cholinesteras, jejichž hlavním reprezentantem je tri-o-kresylfosfát. Klinický průběh je charakterizován asi v 30-40% anamnézou akutní otravy, avšak vyskytuje se u expozice, která nemusí být klinicky diagnostikována. Následuje období latence, které je v podstatě bezpříznakové a může trvat asi od 7 dní do 1 měsíce.

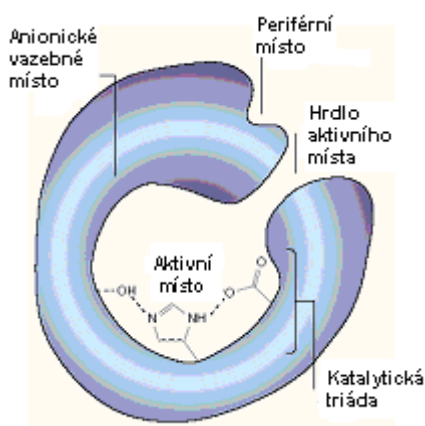
Po období latence může nastat fáze cholinergního dráždění, která je charakterizována zvýšenou sekrecí z horních dýchacích cest, slzením, faryngitidou a laryngitidou. Dále se vyskytují bolesti až parestezie končetin. Charakteristickým příznakem jsou bolesti až křeče v lýtkách. Pak následuje během několika hodin obrna volných pohybů, která se v průběhu dalších dnů zhoršuje. Začíná většinou distálně (prsty dolních končetin) a šíří se proximálně. Jde o paralýzu s minimálním postižením senzitivní inervace, která trvá 1-2 měsíce. Následuje stadium denervace a po ní se vyvíjí těžká atrofie svalů horních i dolních končetin. Tato fáze probíhá v průběhu 2-6 měsíců. Může následovat částečná reparace, avšak období rekonvalescence bývá velmi dlouhé (roky). I po několika desítkách let se zjišťuje sklon k spasticitě a abnormální šlachové reflexy².

2.1.2 Molekulární vlastnosti

Monomer AChE má molekulovou hmotnost okolo 60 000 daltonů. Jeho molekula má elipsoidní tvar o přibližné velikosti 45 x 60 x 65 angströmu a je složená z 12 skládaných centrálně smíchaných beta listů ohraničených 14 alfa spirálami.

Každý monomer má jedno katalytické centrum složené ze dvou částí: esteratické podjednotky obsahující katalytickou triádu a anionické podjednotky, která slouží k navázání kvarterního dusíku ACh. Esteratická podjednotka obsahuje katalytický aparát enzymu – tzv. katalytickou triádu aminokyselin Ser 200, His 440 a Glu 327. Anionická

podjednotka je složena z aminokyselin Trp 84, Phe 330 a Phe 331. Její funkcí je přitáhnout nabitou část neuromediátoru (kvartérní dusík), jež vstupuje do aktivního centra enzymu. Tuto roli plní zejména zbytek aminokyseliny Trp. Současné krystalografické studie AChE umísťují aktivní katalytickou část, oproti dřívějším předpokladům, hlouběji dovnitř struktury enzymu⁴.



Obr.1: Acetylcholinesterasa

2.2 Inhibitory acetylcholinesterasy

Celkový účinek inhibitorů AChE závisí na jejich chemických a fyzikálně-chemických vlastnostech a distribuci v organismu. Inhibitory lze rozdělit na *acylující*, které reagují s AChE podobně jako acetylcholin, *karbamátové* a *organofosforové*.

Karbamátové inhibitory s terciárním dusíkem v molekule se dobře vstřebávají, pronikají hemato-encefalickou bariérou a mají periferní i centrální cholinergní účinky. Sloučeniny typu kvarterních bází působí především periferně. Navíc mají přímé N-účinky, především na nervosvalovou ploténku, a jsou výhodné pro léčbu myasthenia gravis.

OFI jsou vesměs vysoce lipofilní sloučeniny dobře pronikající biologickými membránami a působící jak periferně, tak centrálně.

2.2.1 Acylující inhibitory

Reakce s AChE je podobná jako u acetylcholinu, blokáda enzymu je krátkodobá a plně reverzibilní. Obvykle se uvádí, že nejprve dochází k vytvoření iontové vazby mezi amoniovou skupinou acetylcholinu a anionickým místem enzymu. Není však vyloučeno, že pro navázání jsou důležitější hydrofobní interakce. Navázaný acetylcholin se dále štěpí na cholin a zbytek kyseliny octové. Cholin je na enzym vázán jen slabými vazbami a snadno se uvolní. Zbytek kyseliny octové se přenesse z acetylcholinu na serinový hydroxyl esteratického centra. Vznikne tak acetylovaná AChE, která je rychle (během zlomků sekundy) reaktivována hydrolytickým odštěpením kyseliny octové.

Kromě acylujících inhibitorů mohou krátkodobou a plně reverzibilní blokádu AChE vyvolat i sloučeniny, které kompetitivně brání navázání acetylcholinu na aniontové

místo enzymu, avšak nemají schopnost esterifikovat serinový hydroxyl. Jedná se o neacylující inhibitory, jejichž nejznámějším zástupcem je edrofonium.

2.2.2 Karbamátové inhibitory

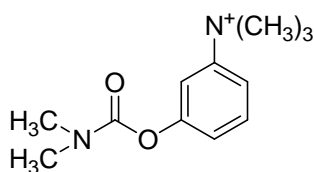
U těchto inhibitorů je hydroxyl aktivního centra esterifikován karbamovou kyselinou. Karbamoylovaná AChE podléhá v organismu spontánní hydrolýze, ale podstatně pomaleji než acetylovaná. Inhibice navozená karbamátovými inhibitory trvá několik minut až hodin.

Předlohou sloučeninou v této skupině inhibitorů je alkaloid obsažený v semenech keře *Physostigma venenosum* (tzv. kalabarských bobech), označovaný jako **fysostigmin** nebo **eserin**. Fysostigmin je ester methylkarbamové kyseliny a fenolu eserolinu. Vyšší homolog **eptastigmin** je potenciálním terapeutikem Alzheimerovy nemoci.

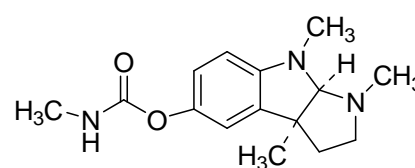
Při studiu zjednodušených modelů fysostigminu bylo zjištěno, že pro inhibiční působení vůči AChE je nezbytná část molekuly, která má charakter esteru alkylované karbamové kyseliny s bazickým fenolem. Bazická a esterová skupina mohou být vzájemně v postavení *para*- nebo *meta*-, případně může být bazický dusík součástí kruhu. V praxi používané deriváty **neostigmin** a **pyridostigmin** mají charakter kvarterních bází, používají se obvykle ve formě bromidů, neostigmin také ve formě methylsulfátu.

Praktické uplatnění nacházejí také zdvojené analogy **demekarium** a **distigmin**. Strukturně poněkud odlišné **ambenonium** je po chemické stránce substituovaný diamid kyseliny šťavelové. Má výrazný nikotinový účinek a používá se při léčbě myasthenia gravis¹.

Karbamáty našly využití také jako insekticida, méně toxická než organofosforová. Methylkarbamáty jsou po použití velmi labilní, takže mezi aplikací látky a požitelností ošetřených zemědělských plodin jsou jen krátké ochranné lhůty a navíc se tvoří méně reziduálních látek⁵.



Neostigmin

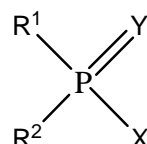


Fysostigmin

Obr.2: Struktury nejznámějších karbamátových inhibitorů.

2.2.3 Organofosforové inhibitory

OFI mohou být odvozeny od kyseliny fosforečné nebo fosfonové, případně jejich thioanalogů. Jejich strukturu lze znázornit vzorcem:



R^1, R^2 = alkoxy, alkyl, substituovaná amidoskupina
 X = halogen, $\text{C}\equiv\text{N}$, fenoxyskupina

Y = O, S

Obr.3. Obecný vzorec organofosforových inhibitorů.

Při použití OFI je hydroxyl aktivního centra AChE blokován zbytkem kyseliny fosforečné nebo fosfonové. Vzniklý inhibovaný enzym není schopen plnit svou fyziologickou funkci – hydrolýzu acetylcholinu. Navíc komplex enzym-inhibitor podléhá tzv. stárnutí, během kterého se stává ještě pevnějším a inhibice má tedy ireverzibilní charakter.

Sloučeniny tohoto typu našly největší uplatnění jako insekticida a jako nejnebezpečnější skupina bojových chemických látek.

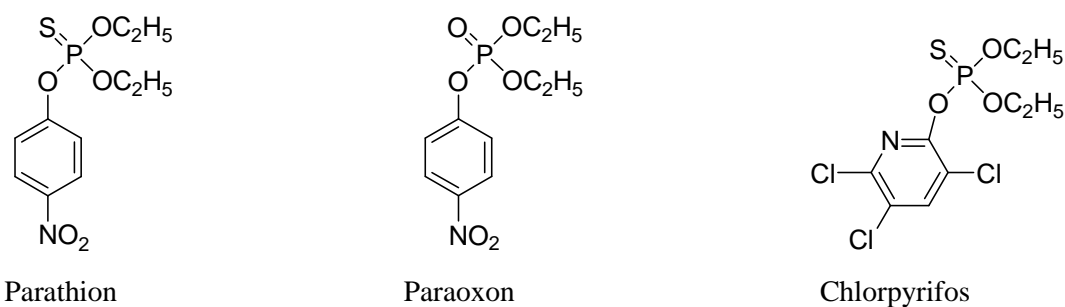
2.2.3.1 Organofosfátová insekticida

OFI začaly být studovány původně v Německu těsně před druhou světovou válkou a v jejím průběhu, skupinou vedenou Dr. Schraderem, v souvislosti s výzkumem BChL s účinkem nervově paralytickým. Rozsáhlá skupina těchto látek našla použití jako insekticida.

Mnoho organofosfátů používaných jako insekticida vykazuje velmi malou anticholinesterasovou aktivitu *in vitro* a jejich vysoká účinnost *in vivo* se projevuje po metabolické aktivaci. Příkladem takové aktivace jsou enzymaticky katalyzované oxidace thiofosfátů, u nichž probíhá přeměna $\text{P}=\text{S}$ na $\text{P}=\text{O}$, např. *parathion* ($\text{LD}_{50} = 7 \text{ mg/kg}$) se metabolizuje na daleko toxičtější *paraoxon* ($\text{LD}_{50} = 0,5 \text{ mg/kg}$). Z hlediska insekticidního

použití těchto látek je významné to, že přeměna probíhá zpravidla v hmyzím střevě daleko rychleji než v tukových tkáních a mikrosomální frakci jater u teplokrevných živočichů. Výsledkem tedy bývá často vysoká toxicita pro hmyz a malá jedovatost pro savce.

Význam mají i jiné metabolické reakce, které mohou zvýraznit oprávněnost použití těchto insekticid. Je to např. u dithiofosfátů oxidace thioesterové skupiny $-S-$ na poněkud účinnější sulfoxidovou $>S-O$ a dále sulfonovou skupinu $-SO_2-$, kde v rostlině poslední reakční stupeň probíhá velice pomalu, zatímco v těle hmyzu rychle. Jinou možností skýtá též rozdílná rychlost hydrolyzy organofosfátů na netoxické, ve vodě rozpustné a rychle vylučované látky u savců⁶.



Obr.4: Struktury organofosfátových pesticidů.

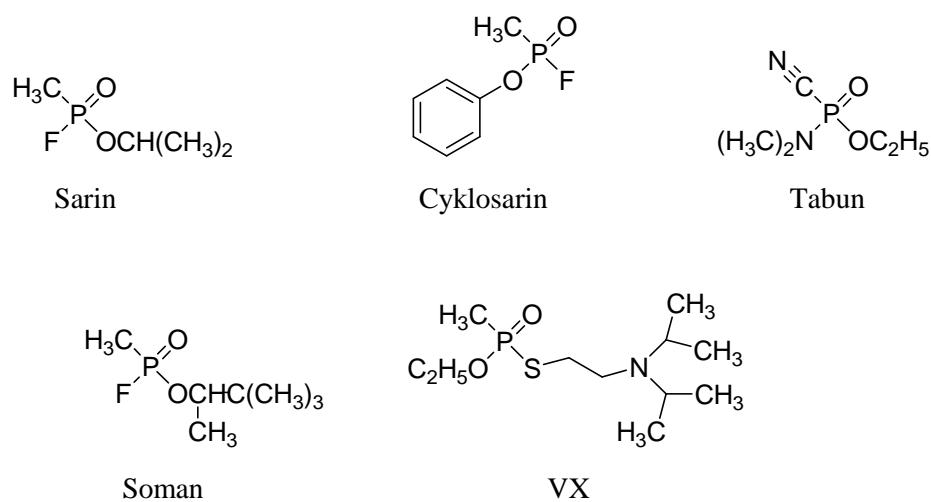
2.2.1 Nervově paralytické látky

Jedná se o organofosfáty či organofosfonáty vyvinuté těsně před druhou světovou válkou (tabun - 1936), během ní (sarin – 1943, soman - 1945) či po druhé světové válce (VX – 60. léta 20. století). Ačkoliv jde již o poměrně „staré“ látky, jejichž použití je zakázáno Úmluvou o zákazu chemických zbraní⁷, jejich vysoká toxicita a relativně snadná a levná syntéza činí z těchto látek lehce zneužitelné zbraně hromadného ničení či nástroje teroristických útoků. V posledních letech vešly NPL do povědomí společnosti při jejich teroristickém užití v tokijském metru sektou Aum Shinrikyo (1995), které si vyžádalo 12 obětí a 5500 zraněných⁸.

NPL se dělí na G látky a V látky. Mezi *G látky* patří: tabun (GA; O-ethylidimethylamidokyanofosfát), sarin (GB; O-isopropylmethylfluorofosfonát), cyklosarin (GF; cyklosin; O-cyklohexylmethylfluorofosfonát) a soman (GD; O-pinakolylmethylfluorofosfonát). Akutní toxicita G látek je obecně velmi vysoká, kolísá

v závislosti na bráně vstupu. Nejčastější branou vstupu jsou vzhledem k vysoké těkavosti dýchací cesty.

V látky jsou toxičtější než G látky, zvláště při intoxikaci přes kůži, protože jsou špatně rozpustné ve vodě, zato velmi dobře rozpustné v organických rozpouštědlech a tucích. Největšího vojenského významu dosáhla látka VX (O-ethyl-S-(2-diisopropylaminoethyl)-methylthiofosfonát)².



Obr.5: Chemické struktury nejznámějších nervově paralytických látek.

Vztahy mezi strukturou a účinkem OFI lze shrnout takto:

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

K inhibici AChE dojde vytvořením kovalentní vazby fosforu s OH-skupinou serinu v esteratickém centru enzymu. Tato fosforylace centra odpovídá acetylaci, což je mezireakce při enzymatické hydrolýze acetylcholinu a karbamoylaci při kontaktu esterasy s inhibitory typu fysostigminu. Defosforylace na rozdíl od deacetylace probíhá tak pomalu,

že simuluje ireverzibilní poškození enzymu; aktivní centrum totiž již není k dispozici pro hydrolýzu acetylcholinu. Acetylcholin sám není „schopen“ vytěsnit zbytek kyseliny fosforečné od enzymu; organofosfáty jsou tedy ve vztahu k acetylcholinu nekompetitivní inhibitory.

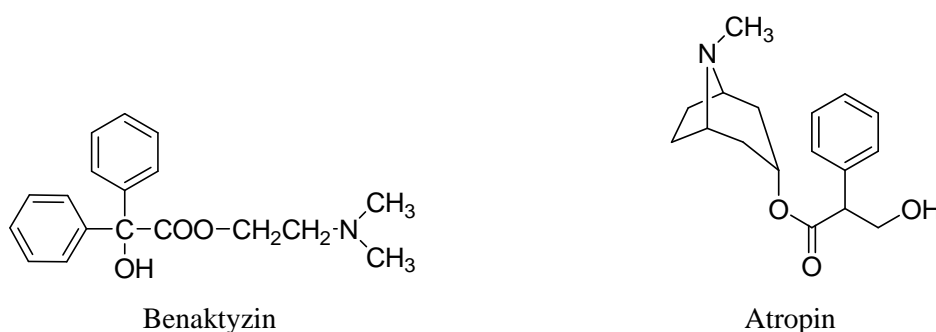
Mechanismus účinku OFI spočívá ve znemožnění AChE odbourávat endogenní acetylcholin a organismus jeho nahromaděním pak sám sebe intoxikuje. Aktivita cholinesterasy se obnoví až po syntéze molekul enzymu *de novo*. Trvá přibližně 50 dní, než cholinesterasa v mozku plně regeneruje. Poněvadž bezjaderné erythrocyty nejsou schopny syntetizovat bílkoviny, zotaví se jejich enzymová aktivita až po nahrazení otrávených buněk novými erythrocyty, tj. až asi za 100 dní. Nebezpečné příznaky otravy vymizí však již v okamžiku, kdy se obnoví pouhý zlomek normální enzymové aktivity⁵.

Obnovení aktivity enzymu vyvolané účinkem vody se nazývá *spontánní reaktivací*. Její rychlost je velmi ovlivněna typem inhibitoru, druhovou a orgánovou specifitou enzymu, teplotou, pH atd. Tato reakce je však velmi pomalá a z hlediska obnovení původní aktivity enzymu prakticky bezvýznamná⁹⁻¹¹.

Reaktivaci inhibované AChE je možné urychlit látkami, které se nazývají *reaktivátory*. Jejich účinek však závisí na rychlosti procesu nazývaného stárnutí (*aging*) – dealkylace, což je chemická reakce, při které je inhibovaná AChE změněna tak, že je účinku reaktivátorů nepřístupná, je v tzv. nereaktivovatelné formě. Rychlost dealkylace inhibované AChE závisí na době kontaktu enzymu s NPL a na chemické struktuře inhibitoru. Z NPL nejrychleji dealkyluje AChE inhibovaná somanem (poločas dealkylace se pohybuje řádově v minutách), zatímco nejpomalejší dealkylací je charakterizován účinek látky VX (poločas dealkylace se pohybuje řádově ve dnech). Tento fakt významně ovlivňuje efekt léčby intoxikací těmito látkami².

2.3 Reaktivátory acetylcholinesterasy

Dojde-li k otravě organofosforovými inhibitory AChE, je možné její průběh a důsledky zmírnit jednak podáním cholinolytik, jednak použitím reaktivátorů AChE. Cholinolytika (atropin, benaktyzin) obsadí acetylcholinové receptory a brání tak působení nahromaděného endogenního acetylcholinu¹.



Obr.6: Struktury cholinolytik.

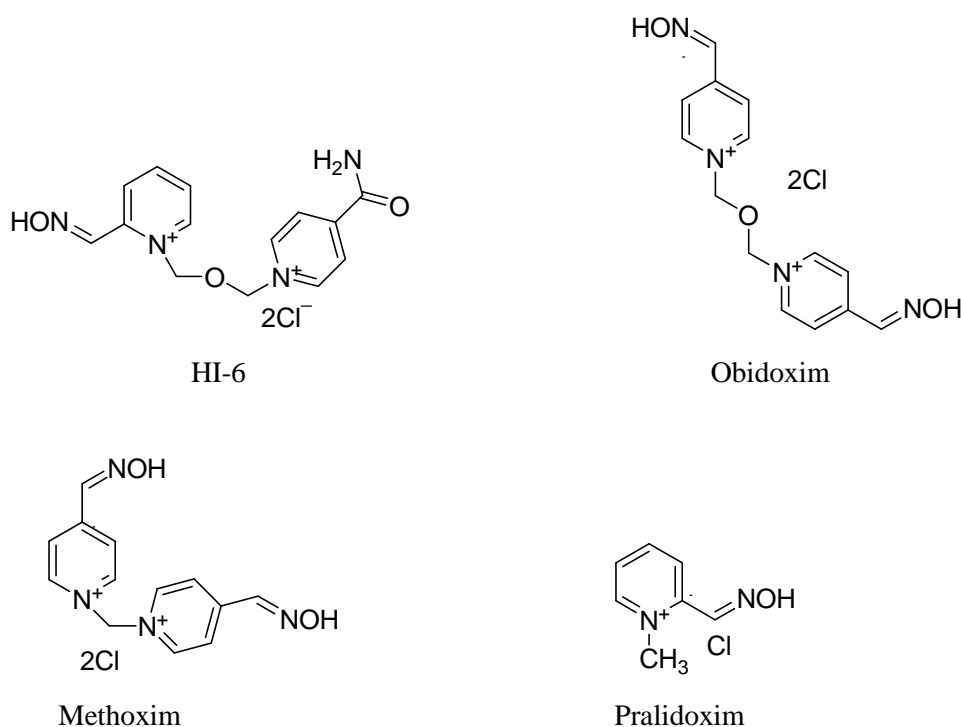
Účinek reaktivátorů AChE je založen na urychleném rozkladu komplexu enzym-inhibitor. K tomuto účelu jsou vhodné sloučeniny, které mají nukleofilitu vyšší než voda. Jediná možnost reaktivace spočívá v ataku atomu fosforu v inhibovaném enzymu vhodným nukleofilem, který je následován odstoupením deprotonované formy.

Předpoklady látky použitelné jako reaktivátor fosforylované nebo fosfonylované AChE :

- 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

Poměrně brzy po zjištění toxicity organofosfátů a organofosfonátů publikoval v roce 1950 Wilson práci, v níž popsal reaktivační účinky hydroxylaminu^{12,13}. Následovala řada sloučenin, obsahujících jako nukleofil hydroxyamino- či hydroxyiminoskupinu, zejména hydroxamové kyseliny a oximy^{14,15}. Prvním prakticky využitelným reaktivátorem byl pralidoxim, syntetizovaný v roce 1955 Wilsonem a Ginsburgovou v USA a Childsem v Anglii^{16,17,18}. Dalším krokem vpřed byly biskvartérní sloučeniny, jako např. trimedoxim, obsahující dvě pyridiniová jádra, čímž se zvýšila afinita reaktivátoru k inhibovanému enzymu^{14,19,20}.

Nejběžnějšími ve světě dosud používanými reaktivátory jsou **pralidoxim** (1-methyl-2-hydroxyiminomethylpyridinium jodid), známý též pod označením **2-PAM** a **obidoxim** (1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium) 2-oxapropan dichlorid). Pro Armádu České republiky (AČR) byl navíc vyvinut reaktivátor s podobnou strukturou - **methoxim** (1,1-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium) methan dibromid) a látka **HI-6** (1-(2-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-karbamoylpyridinium) 2-oxapropan dichlorid). HI-6 se jeví z řady reaktivátorů AChE jako nejúčinnější.



Obr.7: Reaktivátory AChE.

Obecně platí, že reaktivační účinnost výše uvedených reaktivátorů je poměrně omezená, přičemž základní příčinou omezené reaktivační účinnosti těchto látek je rychlost

stárnutí inhibovaného enzymu. Proto akutní intoxikace somanem, u něhož byla pozorována nejrychlejší dealkylace, je považována za nejhůře léčitelnou otravu NPL, zatímco akutní intoxikace látkou VX, pro níž je charakteristická velmi pomalá dealkylace, je velmi dobře léčitelná².

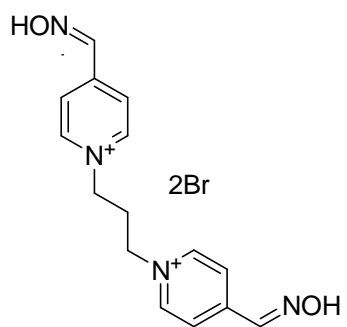
Reaktivátory AChE jsou souhrnně označovány jako oximy, protože obsahují v molekule oximovou skupinu, jež je za pH lidské krve částečně disociována. Vzniklý oximátový anion je pak vlastním nukleofilem štepícím vazbu mezi inhibitorem a enzymem. Z chemického hlediska se tedy jedná o látky, které mají kromě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

- přítomnost kvartérního dusíku
- přítomnost aldoximové skupiny
- u biskvartérních látek přítomnost spojovacího řetězce proměnlivé délky

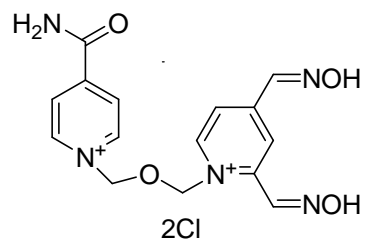
Přítomnost kvartérního dusíku v molekule reaktivátorů AChE zajišťuje afinitu k enzymu. Zvýšená afinita kvartérních látek k AChE je přisuzována jejich interakcím s anionickými místy enzymu²¹.

Dalším často diskutovaným strukturním faktorem ovlivňujícím reaktivační schopnost reaktivátorů AChE je u biskvartérních zástupců tvar a délka spojovacího řetězce mezi oběma kvartérními dusíky. Ačkoliv spojovací řetězec nezasahuje do vlastní reaktivace jakožto reaktivní činitel, jeho délka a tvar významně ovlivňují reaktivační schopnost^{22,23}.

Aldoximová skupina je obvykle umístěna na pyridiniovém jádře v poloze 2 nebo 4. V případě biskvartérních reaktivátorů počet aldoximových skupin nehraje tak důležitou roli jako délka spojovacího řetězce. Kromě jedné aldoximové skupiny (pralidoxim, HI-6) se mohou rovněž v molekule tyto skupiny vyskytovat 2, např. obidoxim, trimedoxim, HLö-7 (1-(2,4-dihydroxyiminomethylpyridinium)-4-(4-karbamoylpyridinium)-2-oxapropan dibromid) nebo i více (Tetroxim; 1,3-bis(2,4-dihydroxyiminomethylpyridinium)-2-oxapropan dibromid)²⁴.



Trimedoxim



HLö-7

Obr.8: Další reaktivátory AChE.

2.4 Umělé neuronové sítě

2.4.1 Úvod

Nalezení vztahu mezi molekulovou strukturou látky (quantitative structure-activity relationship, QSAR) a jejími vlastnostmi, ať již fyzikálně-chemickými či biologickými, je cílem mnoha odvětví. Zejména farmaceutický průmysl investuje značné prostředky při hledání nových tzv. vůdčích (lead) struktur. K nalezení a schválení jednoho léčiva je třeba otestovat průměrně 10 000 látek, při vložených prostředcích přes 600 milionů dolarů. Obrovské finanční náklady posiluje fakt, že syntéza jedné látky v množství a kvalitě potřebné k provedení všech testů se pohybuje kolem 6 000 dolarů²⁵.

Z těchto údajů je zřejmé, že syntéza a testování každé látky by byla časově i ekonomicky neúnosná a spíše než k nalezení nové „lead“ struktury by tato strategie vedla ke krachu firmy. V současné době se využívají kombinatoriální knihovny a syntetizují se cíleně jen některé série látek. Získaná data slouží k vytvoření QSAR modelu, s jehož pomocí jsou pak navrženy nové struktury látek s předpokladem ještě vyšší aktivity, které se pak mohou stát lead strukturami a následně možnými léčivy^{26,27}. K jeho vytvoření se používají různé chemometrické metody, většinou založené na regresi. Kromě biologické účinnosti látek jsou modelovány i další její vlastnosti, jako je například toxicita²⁷. I když se jedná o teoretické modely, je nutno podotknout, že jsou podloženy experimentálními daty.

2.4.2 Modely QSAR

Nejjednoduššími QSAR modely jsou lineární rovnice, ve většině případů obsahující logaritmus rozdělovacího koeficientu n-oktanol-voda, $\log P$ ²⁸. Další, hojně užívanou lineární metodou je kroková multilineární regrese (MLR), která vyjadřuje lineární

kombinací vztah mezi více parametry²⁹. Tato metoda patří mezi „brute force“ metody, které se snaží kombinací několika málo molekulových deskriptorů (MD) z jejich původního počtu sestavit QSAR model. Jako kritérium pro výběr toho nejvhodnějšího slouží většinou korelační koeficient mezi vypočtenými a požadovanými hodnotami vlastnosti molekuly. Je nutné připomenout, že počet možných kombinací je úměrný počtu původních deskriptorů a deskriptorů použitých ve výsledné rovnici a který roste exponenciálně. V případě počtu několika tisíc výchozích deskriptorů je tento postup časově velmi náročný. Proto byly do oblasti selekce MD implementovány tzv. genetické algoritmy (genetic algorithms, GA)³⁰.

Genetické algoritmy jsou založeny na základních evolučních principech, jako je selekce, křížení, mutace a eventuelně elitářství³¹. Na začátku výpočtu je vygenerována populace tzv. chromozomů složených z „genů“ kodujících hodnoty jednotlivých proměnných a vypočteny hodnoty účelové funkce. Dále jsou aplikovány evoluční principy, což vede k vytvoření nové populace. Další generace jsou tvořeny vždy, pokud nejsou splněna kritéria. Těmi může být maximální počet generací, průměrná či nejlepší hodnota účelové funkce apod. Aplikace GA výrazně zvyšuje možnost nalezení globálního minima/maxima účelové funkce.

Z nelineárních vztahů jsou často publikovány kvadratické funkce. Zřejmě nejvíce používanou kvadratickou QSAR funkcí je multiparametrická Hanschova rovnice (viz rov. (1)). Tato rovnice popisuje dostatečně přesně závislost biologické aktivity na vlastnostech molekuly v drtivé většině případů.

$$\log BA = a(\log P)^2 + b(\log P) + c\sigma + dES + e \quad (1)$$

kde BA je biologická aktivita, log P rozdělovací koeficient n-oktanol/voda, σ Hammettova konstanta, ES Taftova sterická konstanta a koeficienty a, b, c, d a e konstanty regresní rovnice.

Výsledkem výše uvedených metod je nalezení závislosti mezi aktivitou látky a její strukturou respektive jejími molekulovými deskriptory, vyjádřené ve formě rovnice s přesně definovanými parametry. Jsou známy regresní koeficienty rovnice i proměnné. Složitější situace je u metod, které s proměnnými v této nativní podobě nepracují a

používají hodnoty deskriptorů již upravené, nebo u metod, jejich výpočetní algoritmus nedovoluje zcela sestavit matematickou rovnici. K prvnímu případu dochází například tehdy, je-li vysoký počet deskriptorů redukován transformací, například do tzv. latentních proměnných v analýze nebo regresi hlavních komponent (principal component analysis, PCA; principal component regression, PCR)^{32,33}.

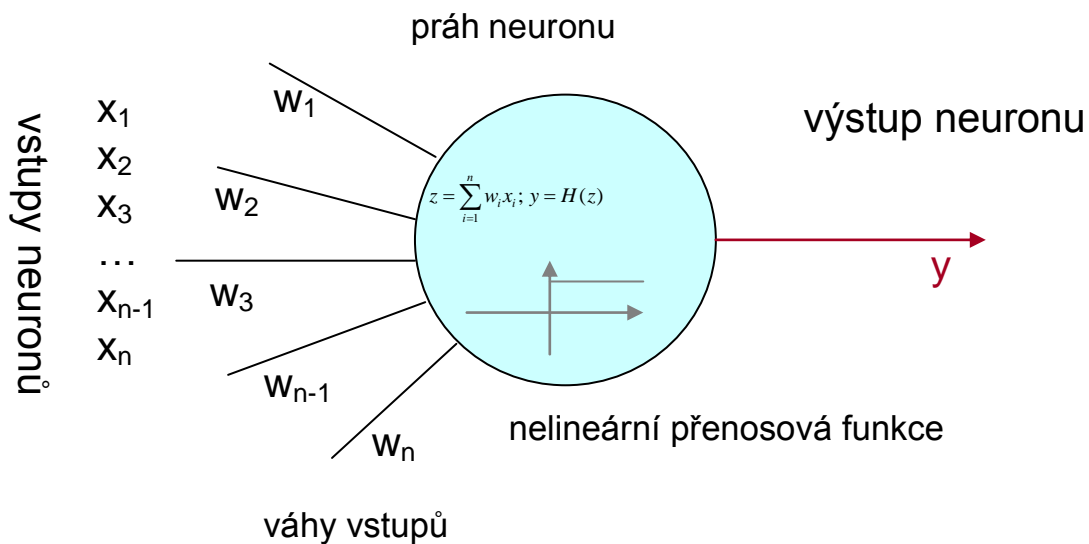
Latentní proměnné, v PCA nazývané hlavními komponentami, jsou lineární kombinací původních proměnných. Je jich výrazně méně, jsou vzájemně nekorelované a vystihují téměř celou variabilitu souboru dat. Jejich pořadí je dáno velikostí popisované variability dat. První hlavní komponenta je tedy lineární kombinací vstupních proměnných, která zahrnuje největší proměnlivost mezi všemi lineárními kombinacemi³⁴. Touto metodou je možné snížit počet deskriptorů o jeden či více řádů bez významné ztráty informace v nich obsažených.

Také některé další chemometrické metody již z principu nedovolují explicitní vyjádření QSAR modelu jako rovnice, protože využívají složité matematické postupy. Jedním z případů je paralelní zpracování dat, což je případ **umělých neuronových sítí (ANN)**³⁵. Ty patří mezi nelineární výpočetní nástroje, kde parciální výpočty jsou paralelně distribuovány a pouze důkladným zkoumáním modelu lze odhadnout některé závislosti a eventuálně odvodit i rovnici. Navzdory faktu, že ANN jsou jakoby „černou skříňkou“, patří mezi nejsilnější modelovací nástroje nejen v QSAR, ale i v mnoha jiných vědních odvětvích. Jedná se zejména o chemii, kde se modelují různé separační děje, dále o medicínské obory, farmacii, finančnictví a podobně^{36,37,38,39}.

2.4.3 ANN

Princip umělých neuronových sítí vychází z funkce lidského mozku. Stejně jako on, i ANN jsou složeny ze vzájemně propojených výpočetních jednotek, tzv. umělých neuronů (AN). V AN, podobně jako v jejich biologické předloze, dochází nejprve k součtu všech vstupních signálů, které jsou dle své významnosti „váženy“ a teprve překročí-li tento součet prahovou hodnotu, šum, je součet zpracován pomocí přechodové funkce a distribuován skrze vážená spojení do dalších AN.

Umělý neuron

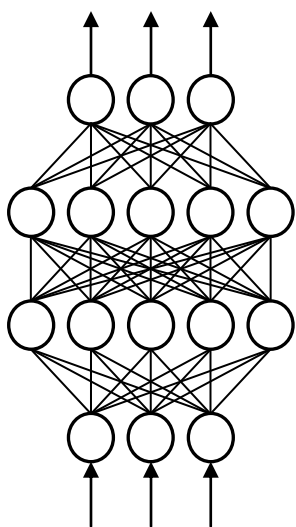


The McCulloch-Pitts model

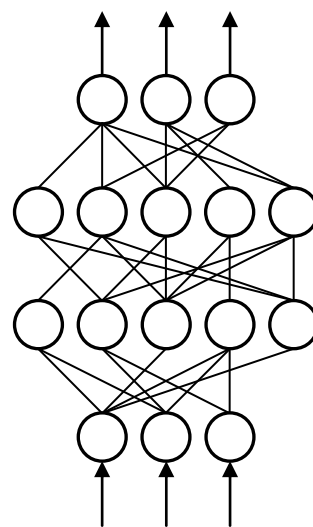
Obr.9: Umělý neuron.

ANN se rozlišují podle použitého adaptačního algoritmu a topologie⁴⁰. Z hlediska topologie se ANN liší v uspořádání AN. Nejčastěji jsou AN uspořádány do vrstev, které jsou vzájemně většinou plně propojené.

Plně propojená síť



Částečně propojená síť



Výstupní vrstva

Skryté vrstvy

Vstupní vrstva

Obr.10: Vícevrstvé neuronové síť

Adaptační algoritmy se dělí na dvě základní skupiny. Ta první hledá vztah mezi dvěma skupinami proměnných (adaptace s učitelem, supervised), zatímco unsupervised ANN organizují data na základě jejich vnitřní struktury (adaptace bez učitele).

Problém s obrovským počtem MD se týká i ANN. Vzhledem k tomu, že ANN obsahují celou řadu proměnných, jejichž hodnoty se optimalizují na základě použitého data setu, je nutná redukce počtu MD a tím i složitosti ANN i zde. Nabízí se mnoho možností, ať již off-line tak i on-line. Nejběžnější předzpracování dat je pomocí PCA⁴¹. Z hlediska uživatele jsou zajímavější on-line metody, nejčastěji různé druhy unsupervised ANN, jako jsou Kohonenovy samoorganizující se mapy (self-organising maps, SOM) či ANN implementující Sangerovo či Ojovo adaptační pravidlo^{42,43,44}.

SOM algoritmus se používá k projekci mnohorozměrných dat do méně dimensionálního prostoru, zpravidla 1-3 D. Algoritmus byl vyvinut finským vědcem Teuvo Kohonenem v roce 1982. Jedná se opět o unsupervised algoritmus (bez znalosti výstupní informace). ANN implementující SOM má dvě plně propojené vrstvy, vstupní a výstupní. Umělé neurony ve výstupní vrstvě ANN bývají v 2D uspořádány plošně zpravidla do mřížky. Adaptace ANN probíhá kompetitivním způsobem. Výsledkem aplikace Kohonenovy ANN je mapa, kde jsou podobná data projektována do topologicky blízkých AN. Vzdálenost mezi AN ve výstupní vrstvě udává „blížkost“ či podobnost⁴².

Další možností redukce dimensionalit vstupních dat pro ANN jsou Sangersův či Ojův adaptační algoritmus. Část ANN, která zajišťuje tento výpočet sestává ze dvou vrstev – vstupní a výstupní. První z nich obsahuje stejný počet umělých neuronů jako je původní počet deskriptorů, počet AN ve výstupní vrstvě odpovídá počtu latentních proměnných. Výstup odpovídá latentním proměnným získaných metodou PCA. Rozdíl mezi oběma pravidly je v pořadí latentních proměnných. Zatímco u Sangerových ANN jsou seřazeny dle toho, kolik variability vystihují (stejně jako u PCA), u Ojova pravidla je toto pořadí víceméně nezávislé.

Na závěr je třeba QSAR model statisticky ověřit, eventuálně validovat. Pro tento účel se vyhodnocuje korelace mezi vypočtenými a experimentálně získanými hodnotami, r^2 , dále F-test a podobně.

2.4.4 Molekulové deskriptory

Modely (Q)SAR eventuelně (Q)SPR vyjadřují vztah mezi strukturou molekuly a její biologickou aktivitou nebo vlastností. K vyjádření struktury molekuly se používá celá řada parametrů, jednoznačně popisujících či charakterizujících danou strukturu. Souhrnně se tyto charakteristiky, převádějící symbolický zápis na číselné veličiny matematicky či pomocí standardizovaných experimentů, nazývají molekulovými deskriptory⁴⁵. Ty se dělí do dvou základních skupin a to na teoretické a experimentální. První skupinou jsou teoretické deskriptory. Ty vznikly matematickou či logickou transformací chemické informace zakodované ve strukturním vzorci. Tuto skupinu deskriptorů lze rozdělit podle dimensionalit na 0 až 4-rozměrné. Do skupiny 0-rozměrných jsou řazeny ty informace, které jsou odvozeny přímo z chemického vzorce. Jsou to například molekulová hmotnost, zastoupení jednotlivých prvků či počet atomů těchto prvků v molekule, van der Waalovy objemy atomů a podobně. Jednorozměrné deskriptory již vypovídají o substrukturách a fragmentech, ze kterých se daná molekula skládá. Jedná se tedy o počet a druh funkčních skupin, cyklů, vazeb a substituentů. Dvourozměrné deskriptory popisují vlastní uspořádání atomů v molekule, to jakým způsobem jsou mezi sebou propojeny. Mohou popisovat částečně i interakce mezi nimi. Další skupinou jsou 3D deskriptory. Jak již vyjadřuje název, jedná se o ty, které jsou odvozeny z prostorového či geometrického uspořádání molekuly. Poslední skupinou, 4D, jsou deskriptory odvozené od stereo-elektronové reprezentace molekuly.

Každá z těchto skupin obsahuje i deskriptory odvozené od těch původních. Do dnešního dne jich bylo publikováno již několik tisíc a tento počet zcela jistě není konečný. Stále jsou vyvíjeny další s cílem se co nejvíce přiblížit realitě.

Experimentální molekulové deskriptory se získávají mnohem obtížněji než teoretické. Mezi experimentálně získané deskriptory patří různé fyzikálně-chemické vlastnosti látek, získané za přesně definovaných podmínek. Jsou to například rozdělovací koeficienty či jejich logaritmy, teploty tání, varu, rozpustnosti a podobně. Dále se mezi ně řadí různé konstanty enzymových reakcí, například reaktivační účinnost, inhibiční a rychlostní konstanty.

Hlavním problémem budování QSAR modelu tedy není ani tak nedostatek teoretických molekulových deskriptorů, ale spíše výběr těch nejvhodnějších. A to buď

selekcí těch nejvýznamnějších (kroková MLR) či matematickou transformací, například (PCA) (viz výše). Jak je vidět, právě výběr nejvhodnějších molekulových deskriptorů jako vstupních dat pro ANN, je velmi podstatným krokem a bezpodmínečným předpokladem pro úspěšné vyhodnocení dat pomocí ANN.

2.4.5 Práce s ANN

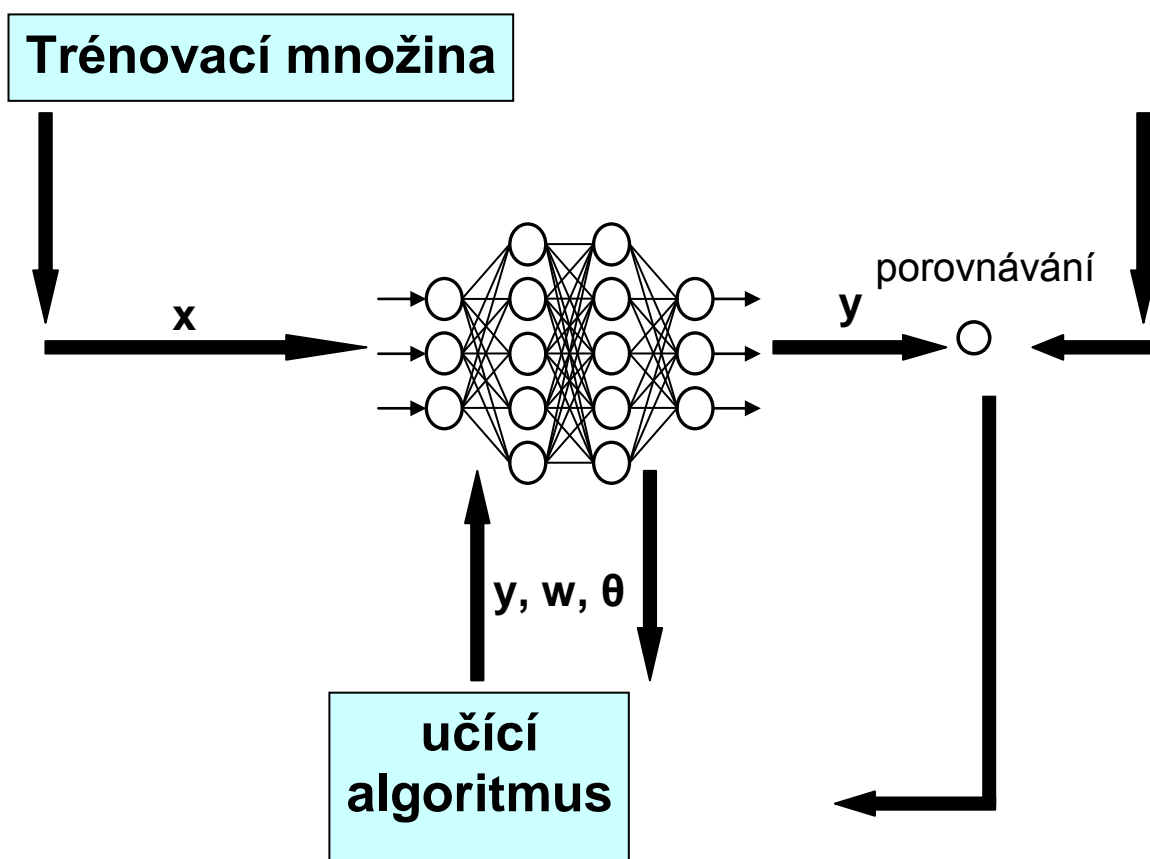
Existuje mnoho typů neuronových sítí. Výběr nejvhodnějšího typu závisí na charakteru a složitosti řešeného problému. Všechny ANN se jak už bylo řečeno skládají z neuronů uspořádaných do vrstev. Jednotlivé neurony ve vrstvě jsou propojeny se všemi neurony v sousedních vrstvách spoji, které jsou váženy. Počet neuronů ve vrstvách a počet vrstev závisí na složitosti řešené úlohy. Zpravidla se uvádí, že 4-vrstevná síť je schopna řešit i ty nejsložitější problémy.

Nejvíce používané a plně dostačující jsou většinou sítě obsahující 3 druhy vrstev. Vrstva neuronů, do které data vstupují, se nazývá vstupní. Ta distribuuje data dále do tzv. „skryté“ vrstvy. Skrytých vrstev může neuronová síť obsahovat i více. Poslední z nich je propojena s výstupní vrstvou neuronů, která slouží k výstupu dat.

Práce s umělými neuronovými sítěmi sestává ze dvou fází. Tou první je adaptace – jedná se o hledání nejvhodnější struktury a parametru ANN. To, že ANN vykazuje minimální odchylky mezi vypočtenými a požadovanými hodnotami, ještě neznamená, že je správně adaptovaná. Je pouze schopna reprodukovat data použitá při adaptační fázi. K zamezení tohoto jevu, nazývaného „přetrénování“ (overtraining), se běžně používá tohoto postupu: data, na která chceme ANN adaptovat, jsou rozdělena do dvou resp. tří skupin.

První část dat tvoří tzv. trénovací data set. Tato data jsou používána umělou neuronovou sítí k adaptačnímu procesu, na jejich základě dochází ke změně parametrů sítě. Druhou skupinou jsou „verifikační“ data. Ta se k výpočtu nepoužívají, pouze je na nich kontrolován průběh adaptace (zda ANN dokáže správně reprodukovat nejen trénovací, ale i verifikační data). Poslední skupinou jsou data, která nebyla zahrnuta do předchozích dvou skupin a slouží pouze k ověření zobecňovací schopnosti ANN.

Vyazuje-li ANN relativně stejné chyby pro všechny data sety, lze konstatovat, že je správně adaptována. Taková ANN může být poté použita k predikci. Síť se předloží vstupní část dat a ta na základě svých parametrů vypočte výstupní veličiny.



Obr.11: Grafické znázornění učení neuronové sítě

2.4.6 Využití ANN

Původní práce zabývající se ANN, přesněji perceptrony, byla publikována před šedesáti lety McCullochem a Pittsem. O čtyři roky později Hebb zdokonalil adaptační fázi, což vedlo k pozdějšímu rapidnímu nárustu zájmu o ANN. Díky neschopnosti perceptronů řešit lineárně neseparovatelné úlohy však tento zájem poklesl a teprve v 80. letech minulého století Hopfield zavedl nelinearitu a zpětnou vazbu, což umožnilo řešit do té doby neřešitelné problémy. Od té doby byly ANN aplikovány při řešení celé řady úkolů, a to nejenom v chemii, ale prakticky ve všech vědních oborech.

Mezi nejčastější oblasti použití ANN ve vztahu k farmacii patří:

- *chemie* – predikce fyzikálně-chemických vlastností sloučenin, optimalizace a řízení chemické výroby, optimalizace separací v analytické chemii, analýze spektroskopických dat, predikci spekter, molekulární modelování – predikce sekundární a terciární struktury proteinů;
- *biologie* – interpretace nukleových sekvencí;
- *medicína* – návrh diagnózy na základě příznaků a výsledků různých laboratorních vyšetření, modelování neurofyziologie mozku⁴⁶

3. Cíl práce

Cílem mé diplomové práce bylo provedení screeningového testování reaktivačních schopností u vybraných strukturně odlišných reaktivátorů AChE při její inhibici cyklosarinem a chlorpyrifosem.

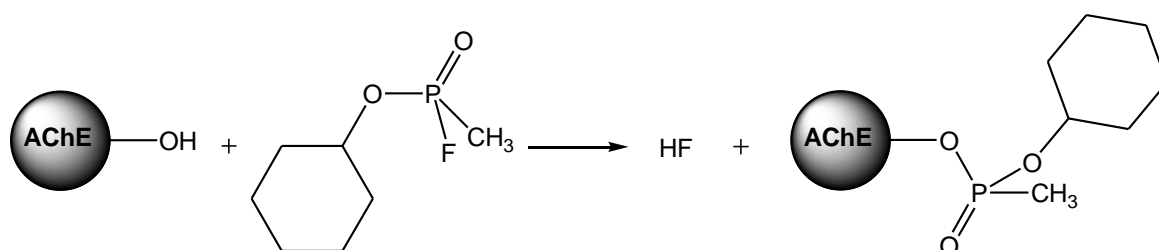
Následně byly výsledky získané *in vitro* testováním vyhodnoceny pomocí umělých neuronových sítí (ANN) s cílem predikce výhodných obměn struktury doposud užívaných reaktivátorů za účelem syntézy nových reaktivátorů AChE s potenciálně vyšší biologickou aktivitou.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál a metody

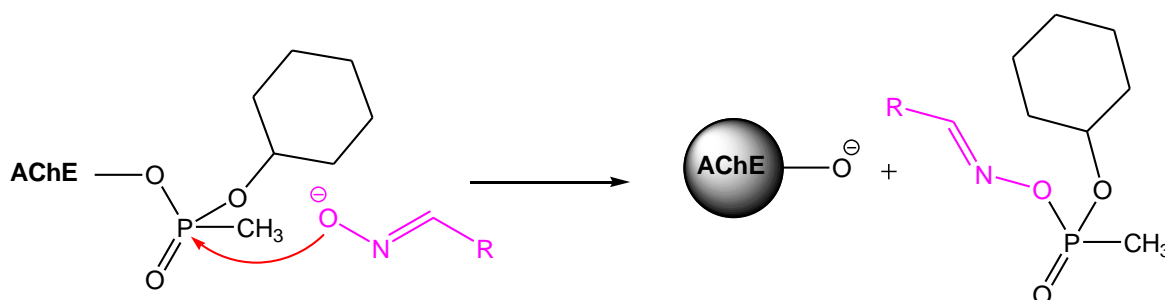
4.1.1 Princip probíhajících reakcí

Při reakci AChE s OFI se snižuje aktivita AChE – vzniká ireverzibilní inhibice. Díky této inhibici pak AChE není schopna štěpit přirozený substrát.



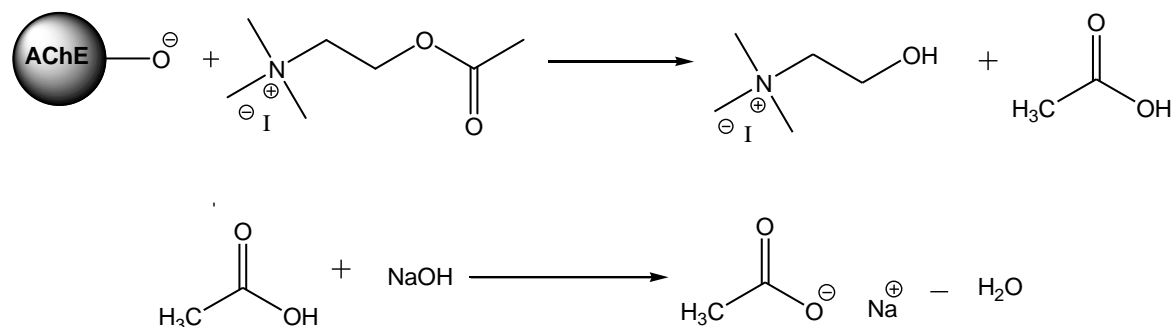
Obr. 12: Inhibice enzymu cyklosarinem.

Reakcí inhibované AChE s oximátovým aniontem dochází k reaktivaci enzymu inhibovaného organofosforovým inhibitorem. Díky reaktivaci pak enzym AChE opět může plnit svou fyziologickou funkci – štěpení acetylcholinu.



Obr. 13: Reaktivace cyklosarinem inhibovaného enzymu.

Reaktivovaný enzym AChE štěpí přidaný substrát – acetylcholin jodid za vzniku cholinu a kyseliny octové.



Obr. 14: Aktivita reaktivovaného enzymu AChE.

4.1.2 Chemikálie

chlorpyrifos (Riedel-de-Haen, Sigma)

cyklosarin - získán z VOZ 072, Zemiarské Kostolany, Slovensko, v 98% čistotě

acetylcholinesterasa – 10% (w/v) vodný homogenát z mozků laboratorního potkana Wistar

acetylcholin jodid p. a.

chlorid sodný p. a.

hydroxid sodný p. a.

oximy – připraveny dříve na Katedře toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví

Univerzity obrany

Dragendorffovo činidlo: I. 850 mg zásaditého dusičnanu bizmutitého + 40 ml H₂O +

10 ml koncentrované kyseliny octové

II. 8 g jodidu draselného + 20 ml H₂O

z toho: 5 ml zás. roztoku + 10 ml CH₃COOH + 50 ml H₂O

4.1.3 Přístroje

Titrátor RTS 822 (Radiometer, Kodaň, Dánsko)

Bodotávek BT-35, zákl. teploměr 0-360°C (Žiar nad Hronom, Slovensko)

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) – Merck, 25 DC – Alufolien, celulosa F

4.1.4 Metoda testování

Všechna měření s AChE byla prováděna na Katedře toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové. Toto pracoviště je akreditováno pro práci s biologickým materiálem a s bojovými chemickými látkami.

Měření bylo provedeno dříve popsanou *in vitro* metodou⁴⁷. Jednalo se o studium reaktivačních vlastností - testování schopnosti syntetizovaných sloučenin obnovit katalytickou aktivitu enzymu inhibovaného chlorpyrifosem a cyklosarinem.

Byla měřena aktivita: neinhibovaného enzymu
inhibovaného enzymu
reaktivovaného enzymu

Podmínky měření: pH 8, 25°C
doba inhibice 30 minut
doba reaktivace 10 minut

Použité inhibitory – cyklosarin, chlorpyrifos

Koncentrace reaktivátorů: 10^{-3} a 10^{-5} M

Počet měření: screeningově bylo testováno 24 reaktivátorů při dvou koncentracích
všechna měření byla prováděna dvakrát

4.1.5 Postup měření

Jak už bylo naznačeno v předchozím textu, v průběhu měření dochází ke třem stěžejním reakcím: nejprve je AChE inhibována zvoleným inhibitorem (cyklosarinem nebo chlorpyrifosem), pak dochází k reaktivaci jednotlivými oximy a následně ke štěpení přidaného acetylcholinu reaktivovanou AChE.

- měření neinhibovaného enzymu: Bylo smícháno 17,5 ml H₂O + 2,5 ml 3M NaCl + 0,5 ml homogenátu + 2,5 ml H₂O (tj. doplnění objemu za chybějící inhibitor a reaktivátor). Vzniklý roztok byl dotitrován pomocí NaOH na pH 8. Poté byly přidány 2 ml 0,02M roztoku substrátu – acetylcholin jodidu, celkový roztok tak získal konečný objem 25 ml. Vznikající kyselina octová byla titrována 0,01M roztokem NaOH. Ze závislosti spotřeby NaOH byla vypočtena aktivita enzymu.

- měření inhibovaného enzymu: Bylo smícháno 0,5 ml homogenátu s 20 μ l roztoku cyklosarinu (chlorpyrifosu) a 0,5 ml H₂O. Po protřepání se roztok ponechal inkubovat 30 minut. Dále byl přidán 1 ml H₂O na vypláchnutí + 1ml H₂O místo reaktivátoru a vše bylo přidáno do kádinky k 17,5 ml H₂O s 2,5 ml 3M NaCl. Vzniklý roztok byl dotitrován 0,01M NaOH na pH 8, poté přidány 2 ml 0,02M substrátu a odečtena aktivita enzymu jako v předešlém případě.
- měření reaktivovaného enzymu: Bylo smícháno 0,5 ml homogenátu s 20 μ l roztoku cyklosarinu (chlorpyrifosu) a 0,5 ml H₂O. Po protřepání se roztok ponechal inkubovat 30 minut. Dále bylo přidáno 200 μ l reaktivátoru + 0,8 ml H₂O a vše přidáno do kádinky k 18,5 ml H₂O s 2,5 ml 3M NaCl. Vzniklý roztok byl dotitrován 0,01M NaOH na pH 8 a 2 ml 0,02M substrátu opět doplněn na konečný objem 25 ml. Aktivita enzymu byla poté odečtena jako v předešlých případech.

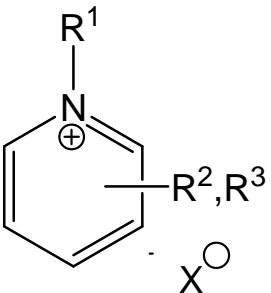
Dosazením do následujících vzorců (viz. kap. 4.1.7) pak byla vypočtena míra reaktivační účinnosti jednotlivých reaktivátorů pro cyklosarin i chlorpyrifos.

4.1.6 Testované látky

Všechny testované reaktivátory AChE byly již dříve připraveny na KTOX FVZ UO.

Z chemického hlediska se jedná o mono (Tab.1) a biskvarterní (Tab.2) pyridiniové soli s funkční oximovou skupinou umístěnou na pyridiniovém jádře v poloze 2, 3 a 4.

Čistota těchto látek byla ověřena měřením teplot tání a pomocí tenkovrstvé chromatografie (mobilní fáze: BuOH : CH₃COOH : H₂O, 5 : 1 : 2; postřik: Dragendorffovo činidlo).

				
	R ¹	R ²	R ³	X ⁻
Pralidoxim	0	2-CH=NOH	-H	I
K100	0	3-CH=NOH	-H	I
K024	0	4-CH=NOH	-H	I
TO 237	0	2-CH=NOH	4-OCOC ₂ H ₅	I
TO 238	0	2-CH=NOH	5-OCOC ₂ H ₅	I
TO 231	0	2-CH=NOH	4-CONH ₂	I
TO 097	-CH ₂ OCH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	4-CH=NOH	-H	2 Cl
TO 021	-benzyl	2-CH=NOH	-H	Br
TO 061	-benzyl	4-CH=NOH	-H	Br
TO 062	-C ₂ H ₅	4-CH=NOH	-H	I
TO 064	-C ₄ H ₇	4-CH=NOH	-H	I
TO 063	-C ₆ H ₁₃	4-CH=NOH	-H	Br
TO 100	-(CH ₂) ₃ N ⁺ (C ₂ H ₅) ₂ CH ₃	4-CH=NOH	-H	2 Br
TO 098	-(CH ₂) ₄ N ⁺ (CH ₃) ₃	4-CH=NOH	-H	2 Br
TO 096	-(CH ₂) ₃ N ⁺ (CH ₃) ₂ (CH ₂) ₂ OH	4-CH=NOH	-H	2 Br
TO 094	-(CH ₂) ₃ N ⁺ (CH ₃) ₃	4-CH=NOH	-H	2 Br

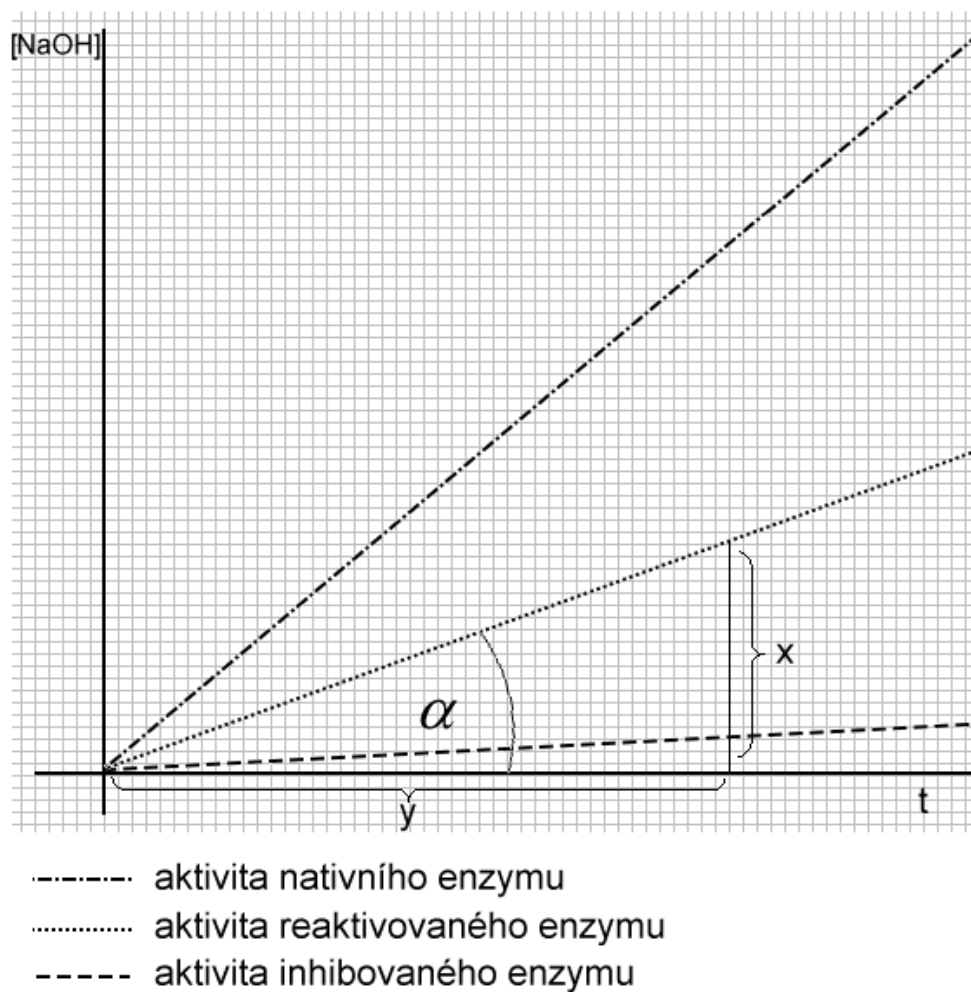
Tab.1. Struktury testovaných monokvarterních látek.

	R1	R2	(A)	X ⁻
Trimedoxim	4-CH=NOH	4-CH=NOH	(CH ₂) ₃	2 Br
K074	4-CH=NOH	4-CH=NOH	(CH ₂) ₄	2 Br
K099	3-CH=NOH	3-CH=NOH	(CH ₂) ₃	2 Br
K101	3-CH=NOH	3-CH=NOH	(CH ₂) ₄	2 Br
K005	2-CH=NOH	2-CH=NOH	(CH ₂) ₃	2 Br
K033	2-CH=NOH	2-CH=NOH	(CH ₂) ₄	2 Br
Obidoxim	4-CH=NOH	4-CH=NOH	(CH ₂ OCH ₂)	2 Cl
TO 050	2-CH=NOH	2-CH=NOH	(CH ₂ OCH ₂)	2 Br

Tab.2. Struktury testovaných biskvarterních látek.

4.1.7 Výpočet reaktivační účinnosti

Ze závislosti spotřeby NaOH na titrování vznikající kyseliny octové byly odečteny hodnoty z výstupních grafů titrátoru:



Obr.15. Graf závislosti spotřeby NaOH.

$$a = \operatorname{tg} \alpha = \frac{x}{y} \quad (2)$$

a ... směrnice přímky

Směrnice přímky a v podstatě vyjadřuje aktivitu enzymu.

Odečtené hodnoty aktivit z grafů byly dále dosazeny do následujícího vzorce pro výpočet reaktivační účinnosti:

$$R = \left(1 - \frac{a_0 - a_r}{a_0 - a_i} \right) \cdot 100 \quad [\%] \quad (3)$$

R ... reaktivace [%]

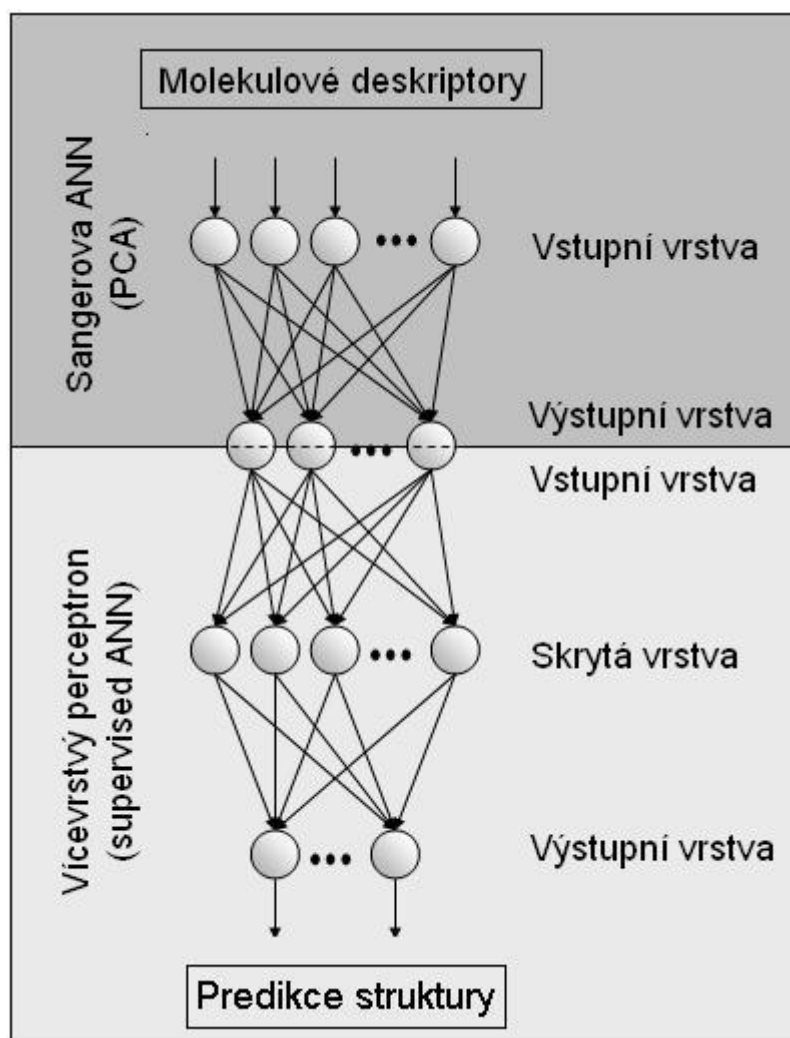
a₀ ...aktivita neinhibovaného enzymu

a_i ... aktivita inhibovaného enzymu

a_r ... aktivita reaktivovaného enzymu

4.1.8 Metoda zpracování pomocí ANN

V této práci byl navržen a otestován nový algoritmus pro tvorbu QSPR modelu při hledání vztahu mezi biologickou aktivitou pyridiniových oximů a jejich molekulovou strukturou. Metodologie využívá hybridní umělou neuronovou síť, kombinující Sangersův algoritmus a vícevrstvý perceptron. Model byl vytvořen na základě teoretických molekulových deskriptorů. Použitá architektura hybridní ANN je na obrázku č. 17.



Obr.17.: Hybridní ANN.

K výpočtu molekulových deskriptorů byl použit program Dragon Professional verze 5.3 (Talete srl., Milán, Itálie). Tato verze programu je schopna generovat 1664 deskriptorů.

Pro látky v této studii bylo vypočteno 929 deskriptorů s dimensionalitou 0 – 2 D. Jednalo se o 48 konstitučních, 119 topologických, 47 walk and path, 33 popisujících konektivitu, 47 informačních deskriptorů, 96 2D autokorelací, 154 počtů funkčních skupin, 29 molekulových vlastností a dalších 356 MD. Z celkového počtu 929 teoretických deskriptorů bylo vyloučeno 295 konstantních. Zbývajících 634 sloužilo jako vstupní data pro ANN.

K vlastnímu vytvoření QSPR modelu byla navržena hybridní ANN, kombinující PCA a MLP. Hybridní ANN sestávala ze 4 plně propojených vrstev AN – vstupní, dvou skrytých a jedné výstupní. První z nich sloužila ke vstupu dat. Ta byla normalizována v intervalu [0;1]. Na vstupní a první skrytou vrstvu a synapse mezi nimi byl aplikován Sangersův algoritmus, provádějící metodu PCA. Počet AN v první skryté vrstvě byl tedy optimalizován tímto algoritmem. Tato vrstva sloužila zároveň jako vstupní vrstva MLP s jednou skrytou a výstupní vrstvou AN. Všechny vrstvy MLP obsahovaly AN se sigmoidní transferovou funkcí. Úprava parametrů ANN od první skryté vrstvy po výstupní vrstvu byla prováděna „back-propagation“ algoritmem⁴⁸. Veškeré parametry obou použitých algoritmů byly optimalizovány genetickými algoritmy. Zejména se jednalo o počet AN ve skrytých vrstvách, momentum a úpravu váhových koeficientů a prahových hodnot u „back-propagation“ algoritmu. Populace v každé generaci obsahovala 50 chromozomů. Během evoluce byly chromozomy vybrané ruletou kříženy jednobodově. Celkem bylo kříženo 90 % chromozomů v populaci. Mutace byla uplatňována v 5 % případů. Správnost konvergence algoritmu byla kontrolována cross validací použitím leave-one-out metody. Dosažení určitého počtu generací bylo vybráno jako ukončující kritérium.

QSPR modely byly poté evaluovány pomocí Pearsonova korelačního koeficientu r^2 , odmocninou z průměru druhých mocnin odchylek mezi vypočtenými a požadovanými hodnotami (root mean square deviation, RMSD; rovnice 2) pro trénovací a testovací data set.

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \cdot \sum_{i=1}^N \left(R^{\text{vyp}} - R^{\text{real}} \right)^2} \quad (4)$$

kde N je počet látek, R^{vyp} je reaktivační účinnost vypočtená pomocí QSAR modelu a R^{real} naměřená reaktivační účinnost.

4.2 Výsledky měření

Vypočítané hodnoty reaktivačních účinností dle byly zpracovány do následujících tabulek:

	Cyklosarin (%)		Chlorpyrifos (%)		R _F	MP (°C)
	10 ⁻³ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻³ M	10 ⁻⁵ M		
Pralidoxim	0	0	55	9	0,316	
K100	6	0	0	3	0,310	
K024	3	0	7	0	0,286	205
TO 237	0	0	0	0	0,539	194-196
TO 238	0	0	48	0	0,573	193-195
TO 231	4	0	82	8	0,213	210-213,5
TO 097	0	0	36	0	0,171	?!
TO 021	0	2	16	8	0,586	205
TO 061	0	2	5	4	0,657	193
TO 062	4	4	13	0	0,471	132
TO 064	2	7	5	4	0,671	80-95
TO 063	2	0	7	3	0,786	115-120
TO 100	1	0	64	0	0,214	187-192
TO 098	0	0	57	0	0,129	230,5-232
TO 096	0	2	19	0	0,129	133-142
TO 094	2	4	54	5	0,129	163-165

Tab. 3: Výsledky I.

	Cyklosarin (%)		Chlorpyrifos (%)		R_F	MP (°C)
	$10^{-3}M$	$10^{-5}M$	$10^{-3}M$	$10^{-5}M$		
Trimedoxim	0	0	79	33	0,169	230-233
K074	2	0	50	30	0,090	239-241
K099	2	2	16	1	0,112	243-246
K101	0	0	6	0	0,067	248-249
K005	1	0	19	6	0,101	uhelnatí
K033	10	8	24	10	0,090	248-250
Obidoxim	2	5	76	43	0,280	211-219
TO 050	18	4	6	5	0,814	170-189

Tab. 4: Výsledky II.

Z tabulek výsledků je zřejmé, že nejvyšší procenta reaktivace vykazovaly kromě již používaných reaktivátorů pralidoximu, trimedoximu a obidoximu monokvarterní látky TO 231, TO 100, TO 098, TO 094 a z biskvarterních látka K074.

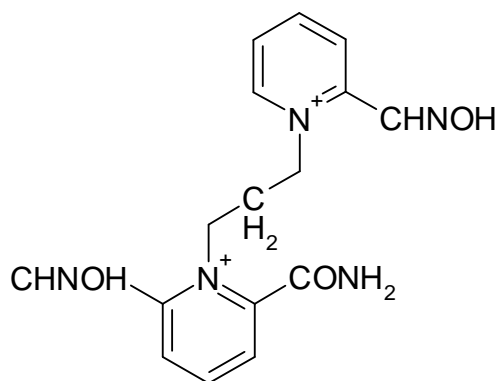
4.3 Výsledky ANN

Byly zkoušeny různé QSPR modely vytvořené pomocí hybridní ANN, testovány cross validací a RMSD, aby byla nalezena optimální ANN s co nejlepším proložením pro oba data sety. Bylo zjištěno, že čtyřvrstvá hybridní ANN je vhodná k popisu řešeného problému a není proto důvod zvýšit počet skrytých vrstev. ANN s architekturou 634:8:3:1 vykazovaly nejnižší hodnoty RMSD a nejvyšší hodnoty Pearsonova korelačního koeficientu r^2 . Přehled naměřených a jim odpovídajících biologických aktivit vypočtených pomocí nejlepšího modelu je uveden v tabulce II.

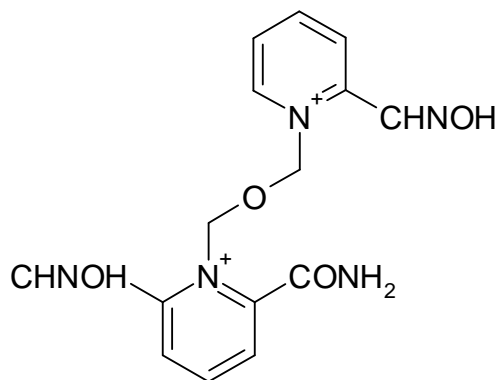
Vytvořený QSAR model relativně dobře popisuje studovaná data a to i s přihlédnutím k tomu, že použitý data set obsahoval velmi malé množství látek s velkou strukturální diverzitou. Při použití většího množství dat by bylo možné ještě více zpřesnit QSAR model.

V této práci byl pro vytvoření QSAR modelu použit nový algoritmus založený na aplikaci hybridní neuronové sítě. Metoda využívá redukci dimensionalit teoretických molekulových Sangerovou neuronovou sítí s následným on-line vytvořením modelu vícevrstevným perceptronem. Algoritmus byl úspěšně otestován.

Navržená struktura reaktivátoru pro inhibici chlorpyrifosem:



Navržená struktura reaktivátoru pro AChE inhibovanou cyklosarinem:



Diskuse

Smyslem této práce bylo screeningové otestování 24 strukturně odlišných reaktivátorů a následné vyhodnocení jejich reaktivačních účinností pomocí ANN s cílem predikovat strukturu reaktivátoru, který by byl účinnější než doposud užívané reaktivátory.

Aby bylo možné reaktivátor označit za prospěšný při záchraně života po intoxikaci inhibitory AChE, musí být schopen reaktivovat inhibovanou AChE minimálně z 10-20%.

Z dosud známých reaktivátorů AChE není prozatím bohužel žádný schopen reaktivovat enzym inhibovaný všemi typy NPL. Například dosud nejnadějnější biskvarterní látka HI-6 nedokáže reaktivovat AChE inhibovanou tabunem a pesticidy. Běžně užívaný pralidoxim nemá schopnost reaktivovat AChE v případě inhibice cyklosarinem a tabunem. Další běžně používaný reaktivátor obidoxim není schopen reaktivovat AChE inhibovanou cyklosarinem a v případě inhibice tabunem je jeho úspěšnost obnovení fyziologické funkce enzymu velmi malá.

Z tohoto důvodu se stále mnoho laboratoří na celém světě zabývá snahou o nalezení univerzálně účinného reaktivátoru, který by byl účinný u všech typů inhibitorů.

Z mnou změřených biologických aktivit reaktivátorů se jeví jako úspěšné v případě inhibice chlorpyrifosem reaktivátory TO 231, TO 100, TO 098, TO 094 a K074. V případě inhibice nervově paralytickou látkou cyklosarinem bylo nejvyšší % reaktivity dosaženo u látek K033 a TO 050. Obě dvě látky jsou tedy úspěšnějšími reaktivátory pro cyklosarinem inhibovanou AChE než běžně užívaný obidoxim, trimedoxim či pralidoxim; nicméně ani u těchto dvou látek nepřesáhla míra reaktivity 10%.

Na proces reaktivity nelze nahlížet pouze z pohledu nejvyššího dosaženého procenta reaktivity, ale rovněž ze strany koncentrace, při které této reaktivační schopnosti

bylo dosaženo. Za optimální reaktivátory se proto považují takové látky, jejichž schopnost reaktivovat inhibovanou AChE je dostatečná při koncentraci 0,001 M a nižší.

Dalším faktem, ke kterému je nutno přihlížet je penetrace reaktivátorů AChE přes hematoencefalickou bariéru (BBB). Vzhledem k tomu, že tyto látky mají v molekule inkorporovány jeden či dva kvartérní dusíky a navíc při pH lidského těla disociují na příslušné oximátové aniony, jejich schopnost pronikat přes BBB je nízká. V literatuře se uvádí, že z krve do mozku přechází cca 10 % látky (Sakurada et al., 2003). Přítomnost této biologické bariéry a následná snížená průchodnost pro ionizované sloučeniny tím snižují maximální dosažitelnou koncentraci reaktivátoru v mozku.

Z mých měření se potvrdil fakt, že cyklosarinem inhibovaná AChE je nejlépe reaktivovatelná reaktivátory s oximovou skupinou v poloze dvě. AChE inhibovaná pesticidy je lépe reaktivovatelná reaktivátory s oximovou skupinou v poloze čtyři.

V dalším vyhodnocování a modelování ANN, která by byla nejvhodnější pro řešení daného problému jsme dospěli k predikci struktur potenciálně úspěšnějších reaktivátorů pro cyklosarin a chlorpyrifos. Ačkoli počet testovaných látek byl velmi malý, lze říct, že s využitím naměřených dat byl navržen a vyzkoušen nový algoritmus založený na aplikaci hybridní neuronové sítě.

Závěr

V rámci této diplomové práce jsem změřila reaktivační účinnost po inhibici AChE cyklosarinem a chlorpyrifosem u těchto reaktivátorů:

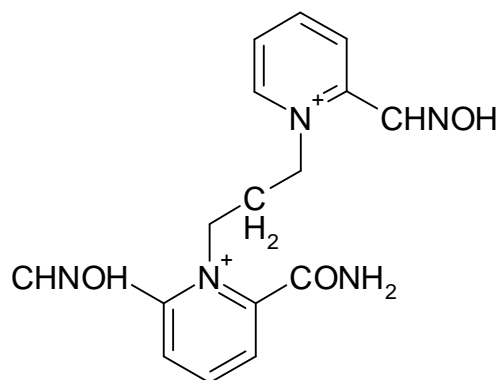
Pralidoxim	TO 050
K100	TO 100
K024	TO 098
TO 237	TO 096
TO 238	TO 094
TO 231	Trimedoxim
TO 097	K074
TO 021	K099
TO 061	K101
TO 062	K005
TO 064	K033
TO 063	Obidoxim

Reaktivátory úspěšné po inhibici AChE cyklosarinem: K033, TO 050.

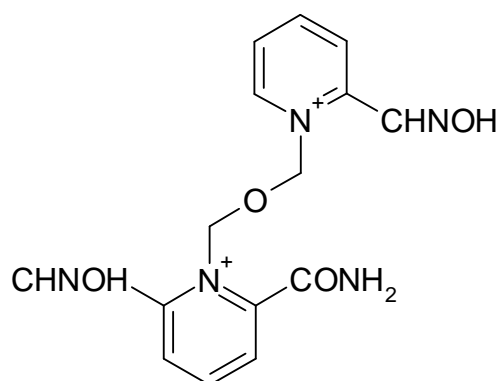
Reaktivátory úspěšné po inhibici AChE chlorpyrifosem: TO 231, TO 100, TO 098, TO 094, K074, Pralidoxim, Trimedoxim, Obidoxim.

Struktury navržené pomocí ANN:

- pro chlorpyrifos:



- pro cyklosarin:



Literatura

- [1] HARTL, J.; PALÁT, K.; DOLEŽAL, M.; MILETÍN, M.; OPLETALOVÁ, V.: *Farmaceutická chemie II/1*. Panorama, Praha 2001.
- [2] PATOČKA, J. a kol.: *Vojenská toxikologie*, GRADA Publishing, Praha 2004
- [3] LINCOVÁ, D.; FARGHALI, H. et al.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, Galén, Praha 2002
- [4] SUSSMAN, J.L.; HAREL, M., FROLOW, F., OEFNER, C., GOLDMAN, A., TOKER, L., SILMAN, I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 1991, vol. 253, č. 5022, s. 872-879.
- [5] LÚLLMAN, H., MOHR, K., WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2002. 694 s.
- [6] Hartl, J.; Palát, K.: *Farmaceutická chemie IV.*, Praha 1992
- [7] BAJGAR, J. *Historie používání chemických zbraní a jednání o jejich zákazu*. 1. vyd. Hradec Králové: VLA JEP, 1997. 114 s.
- [8] NAGAO, M., TAKATORI, T., MATSUDA, Y., NAKAJIMA, M., IWASE, H., IWADARE, K. Definitive evidence for the acute sarin poisoning in diagnosis in the Tokyo subway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1997, vol. 144, č. 1, 198-203.
- [9] REINER, E., PLESTINA, R.: *Toxicol. Appl. Pharmacol* 49(3), 451 (1979)
- [10] REINER, E.: *Bull. Wld. Hlth. Org.* 44, 109 (1971)
- [11] LIESKE, C. N., GESSNER, C. E., GEPP, R. T., CLARK, J. H., MEYER, H. G., BROOMFIELD, C. A.: *Life Sci.* 46(17), 1189 (1990)
- [12] WILSON, I. B., BERGMANN, F.: *J. Biol. Chem.* 185, 479 (1950)

-
- [13] WILSON, I. B., BERGMANN, F., NACHMANSOHN, D.: J. Biol. Chem. 186, 781 (1950)
- [14] ELLIN, R. I., WILLS, J. H.: J. Pharm. Sci. 53(9), 995 (1964)
- [15] MAJEWSKI, M., SEFARIN, B.: Wiad. Chem. 33, 311 (1979)
- [16] CHILDS, A. F., DAVIES, D. R., GREEN, A. L., RUTLAND, J. P.: Brit. J. Pharmacol. 10, 462 (1955)
- [17] WILSON, I. B., GINSBURG, S.: Biochim. Biophys. Acta 18, 168 (1955)
- [18] GINSBURG, S., WILSON, I. B.: J. Am. Chem. Soc. 79, 481 (1957)
- [19] POYIOMEK, E. J., HACKLEY, jun. B. E., STEINBERG, G. M.: J. Org. Chem. 23, 714 (1958);
- [20] MAJEWSKI, M., SEFARIN, B.: Wiad. Chem. 33, 405 (1979)
- [21] PATOČKA, J., CABAL, J., KUČA, K., JUN, D. Oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by toxic phosphorus ester: *In vitro* kinetics and thermodynamics. *Journal of Applied Biomedicine*, 2005, vol. 3, č. 2, s. 91-99.
- [22] KUČA, K., PATOČKA, J., CABAL, J. Reactivation of organophosphate inhibited acetylcholinesterase activity by α,ω -bis-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)alkanes *in vitro*. *Journal of Applied Biomedicine*, 2003a, vol. 1, č. 4, s. 207-211.
- [23] PANG, Y.P., KOLLMAYER, T.M., HONG, F., LEE, J.C., HAMMOND, P.I., HAUGABOUK, S.P., BRIMIJOIN, S. Rational design of alkylene-linked bis-pyridiniumaldoximes as improved acetylcholinesterase reactivators. *Chemistry & Biology*, 2003, vol. 10, č. 6, s. 491-502.
- [24] KUČA dis
- [25] <http://www.fda.com> (datum)
- [26] RÁDL, S.: Chem. Listy 98, 1073 (2004)
- [27] WEAVER, D.C.: Curr. Opin. Chem. Biol. 8, 264 (2004).
- [28] TICHÝ, M., ROTH, Z., BLÁHA, K., WORTH, A.P.: Chem. Listy 99, 675 (2005)

-
- [29] VAJRAGUPTA, O., BOONCHOONG, P., WONGKRAJANG, Y.: *Bioorg. Med. Chem.* 8, 2617 (2000)
- [30] HEMMATEENEJAD, B., MIRI, R., AKHOND, M., SHAMSIPUR, M.: *Chemom. Int. Lab. Syst.* 64, 91 (2002).
- [31] SOLMAJER, T., ZUPAN, J.: *Drug Discovery Today: Technologies*, 1, 247 (2004).
- [32] SARBU, C., DJARKOVIC-SEKULIC T., PERIŠIĆ-JANJIC, N.: *J Pharm. Biomed. Anal.* 30, 739 (2002).
- [33] PUZYN, T., FALANDYSZ, J.: *Atmospheric Envir.* 39, 1439 (2005).
- [34] MELOUN, M., MILITKÝ, J.: *Kompendum statistického zpracování dat, Academia 2002*, str. 227-234.
- [35] NICULESCU, S.P.: *J. Mol. Struct.: THEOCHEM*, 622, 71 (2003).
- [36] DOHNAL, V., ZHANG, F., LI, H., HAVEL, J.: *Electrophoresis* 24, 2462 (2003).
- [37] DOHNAL, V., LI, H., FARKOVÁ, M., HAVEL, J.: *Chirality* 14, 509 (2002).
- [38] NATTKEMPER, T.W.: *J. Biomed. Inform.* 37, 380 (2004).
- [39] QUAH, T.-S., SRINIVASAN, B.: *Expert Syst. Appl.* 17, 295 (1999).
- [40] ARBIB, M.A. (ed.): *The Handbook of Brain Theory and Neural Networks*. MIT Press, London 2003.
- [41] ZHANG, Y., LI, H., HOU, A., HAVEL, J.: *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2006, in press.
- [42] KOHONEN, T.: *Self-Organising Maps*, Springer, Berlin 1995.
- [43] SANGER, T.D.: *Neural Networks* 2, 459 (1989).
- [44] OJA, E.: *Theor. Comp. Sci.* 287, 187 (2002).
- [45] TODESCHINI, R., CONSONNI, V.: *Handbook of Molecular Descriptors*. Wiley-VCH, Weinheim 2000.

- [46] KVASNIČKA, V. a kol.: Úvod do teórie neuronových sietí, Iris, 1997
- [47] KUČA, K., Cabal, J.: Evaluation of Newly Synthesized Reactivators of the Brain Cholinesterase Inhibited by Sarin Nerve Agent. *Toxikol. Mech. Methods*, 2005, 15, 247.
- [48] McCLELLAND J.L., RUMELHART, D.E.: Explorations in parallel distributed processing. MIT Press, Massachusetts 1988.