

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra organické a bioorganické chemie



Cholinesterasy inhibované novičoky – výpočetní studie možností reaktivace

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Zbyněk Večeřa

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Mgr. Tomáš Kučera, Ph.D.

Hradec Králové 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

Podpis autora

Poděkování

Děkuji kpt. PharmDr. Mgr. Tomáši Kučerovi, Ph.D. za odbornou pomoc, kterou mi poskytoval při řešení dané problematiky a za čas, který mi věnoval. Dále děkuji doc. PharmDr. Jaroslavu Rohovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce.

Děkuji Katedře toxikologie a vojenské farmacie za umožnění vypracování mé diplomové práce na její půdě.

Děkuji rodičům za podporu během celého studia. A také děkuji mé kamarádce por. PharmDr. Andree Monteiro za významnou pomoc při psaní této práce.

Abstrakt

Název práce: Cholinesterasy inhibované novičky – výpočetní studie možnosti reaktivace

Autor: Zbyněk Večeřa

Katedra: Katedra organické a bioorganické chemie

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Mgr. Tomáš Kučera, Ph.D.

Abstrakt: Látky zvané novičky jsou zakázané bojové chemické látky, které byly vyvinuty v Sovětském svazu v 70. a 80. letech 20. století. Do širšího povědomí se dostaly nedávno – v roce 2018 při otravě dvojitého agenta Skripala a v roce 2020 otravou ruského politika Navalného. Jedná se o 4. generaci nervově paralytických látek (NPL), které ireverzibilní inhibicí acetylcholinesterázy (AChE) navozují cholinergní syndrom, který se manifestuje především zúžením dýchacích cest, křečemi až paralýzou dýchacích svalů a útlumem dýchacího centra v mozku. Zasažený tedy umírá udušením, pokud mu nejsou v co nejkratším čase podána antidota.

Léčba otravy zapříčiněná NPL je založena na oximových reaktivátorech AChE, které na sebe navážou toxickou látku pomocí nukleofilního ataku na elektro pozitivní místo dané NPL, a tím uvolní AChE, která opět může hydrolyzovat acetylcholin. Cílem práce bylo vybrat potenciální reaktivátory (ligandy) AChE a u daných ligandů: i) zjistit, zda se daný ligand stericky dostane dostatečně blízko k novičce navázaného v aktivním místě AChE; ii) stanovit ligandy s největší afinitou k danému místu.

Ke studii byly využity výpočetní metody, které nám pomohly vizualizovat aktivní/zablokované místo AChE a predikovat hodnoty afinity. Konkrétně jsme použili molekulové dokování (rychlejší metoda, méně přesná) pro hrubé síto vybraných ligandů, na které navazovala sofistikovanější metoda – molekulová dynamika, která předpovídá pohyb atomů a molekul v čase.

Pomocí moderních výpočetních metod jsme vybrali ligandy, které by mohly reaktivovat novičky inhibovanou acetylcholinesterázu. Vybrané ligandy (s největší afinitou) budou dále testovány *in vitro*.

Klíčová slova: novičky, nervově paralytické látky, acetylcholin, acetylcholinesteráza, reaktivátory, molekulové dokování, molekulová dynamika

Abstract

Title: Cholinesterases inhibited by novichok agents – in silico study of reactivation possibilities

Author: Zbyněk Večeřa

Department: Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Supervisor: doc. PharmDr. Jaroslav Roh, Ph.D.

Advisor: PharmDr. Mgr. Tomáš Kučera, Ph.D.

Abstract: Substances known as Novichok agents are banned chemical warfare agents, which were developed in Soviet Union between the 1970s and the 1980s. They were brought to the public attention very recently – they were used to poison a double agent named Skripal in 2018 and again in 2020 to poison Russian politician Navalny. It is the 4th generation of nerve agents which cause cholinergic syndrome by irreversible inhibition of acetylcholinesterase (AChE), manifesting symptoms such as depression of bronchial tubes, cramps or even paralysis of respiratory muscles and depression of the respiratory control centre in the brain. Victim then dies of asphyxiation unless antidotes are administered as soon as possible.

Treatment of nerve agents induced poisoning is based on reactivating AChE by oxime compounds which bind themselves with the toxic substance by nucleophilic attack on electropositive point of the nerve agent, releasing acetylcholinesterase that can continue with function of acetylcholine hydrolysis. The task was to choose potential reactivators (ligands) of AChE and using them to: i) find out if the ligand can sterically reach close enough to the novichok agent bound in the active site of AChE; ii) to determine ligands with the highest affinity to that specific position.

Study was done using computational methods which helped us to visualise active or blocked site of AChE and to determine affinity values. Specifically we used molecular docking (faster method but less accurate) for rough sieve of chosen ligands which was followed by more sophisticated method – molecular dynamics which predicts the movement of atoms and molecules in time.

Using modern computational methods we chose ligands which could be able to reactivate acetylcholinesterase inhibited by novichoks. The chosen ligands (with the highest affinity) will continue to be tested *in vitro*.

Keywords: Novichok agents, nerve agents, acetylcholine, acetylcholinesterase, reactivators, molecular docking, molecular dynamics

Obsah

Seznam použitých zkratk	2
Úvod	3
1 Teoretická část	5
1.1 Nervově paralytické látky	5
1.1.1 Historie NPL	5
1.1.2 Organizace pro zákaz chemických zbraní	6
1.1.3 Novičoky	6
1.2 Mechanismus účinku	8
1.2.1 Acetylcholinesteráza	8
1.2.2 Inhibice AChE	9
1.3 Intoxikace NPL	10
1.3.1 Toxicita	10
1.3.2 Projevy intoxikace	10
1.4 Terapie otravy	11
1.4.1 Symptomatická terapie	11
1.4.2 Kauzální léčba	12
2 Experimentální část	14
2.1 Příprava modelů ligandů	14
2.2 Příprava modelů proteinů	14
2.3 Parametrizace	18
2.4 Molekulové dokování	21
2.5 Příprava komplexů	21
2.6 Molekulová dynamika	21
3 Výsledky	22
3.1 Parametrizace	22
3.2 Molekulové dokování	29
3.3 Molekulová dynamika	32
4 Diskuze	41
4.1 Výběr a příprava reaktivátorů a proteinů	41
4.2 Parametrizace	42
4.3 Molekulové dokování	42
4.4 Molekulová dynamika	43
Závěr	52
Seznam použité literatury	53
Seznam obrázků	59
Seznam tabulek	60

Seznam použitých zkratek

2-PAM	pralidoxim
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesteráza
AMK	aminokyselina
Coul-SR	coulombic short-range
CVX	čínský izomer VX
GA	tabun
GAFF	Všeobecné silové pole Amber
GB	sarin
GD	soman
GF	cyklosarin
LD	letální dávka
LJ-SR	Lennard-Jones short-range
MD	molekulová dynamika
NATO	North Atlantic Treaty Organization
NPL	nervově paralytická látka
OPCW	Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons
PDB	Protein Data Bank
RVX	ruský izomer VX
SÚJB	Státní úřad pro jadernou bezpečnost
vdW	van der Waalsův poloměr
VMD	Visual Molecular Dynamics

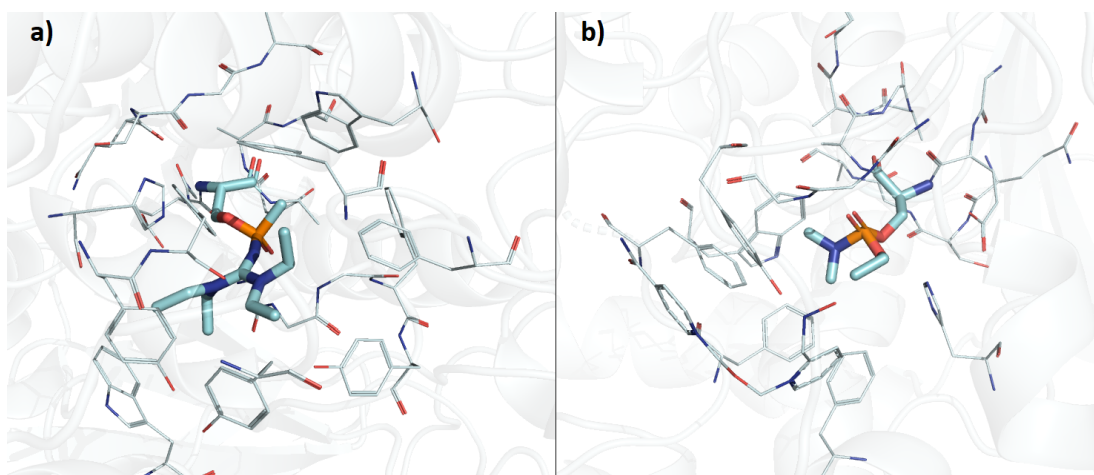
Úvod a cíl

Látky ze skupiny novičoků jsou 4. generací nervově paralytických látek (NPL), jejichž vývoj probíhal v Sovětském svazu v druhé polovině minulého století. Do širšího povědomí se dostaly teprve v roce 2018 při otravě bývalého ruského dvojitého agenta Sergeje Skripala a jeho dcery ve městě Salisbury a v roce 2020 při otravě ruského opozičního aktivisty Alexeje Navalného. Novičoky jsou považovány za ještě toxickejší látky v porovnání s nervově paralytickou látkou s označením VX, a tedy by se mělo jednat o nejvíce toxické látky syntetizované člověkem. [1, 2]

Chemicky se jedná o organické sloučeniny fosforu velmi rozdílných struktur. Tyto sloučeniny (stejně jako starší NPL) se vážou do aktivního místa acetylcholinesterázy (AChE), a tím daný enzym zablokují. V důsledku toho se kumuluje acetylcholin (ACh) v synaptických štěrbinách. Novičoky tedy působí nepřímo cholinomimeticky. [3]

Kauzální léčbou při intoxikaci NPL jsou tzv. reaktivátory, které daný organofosfát na sebe navážou, a tím uvolní aktivní místo enzymu. K úspěšné reaktivaci enzymu je zapotřebí splnit tři podmínky. Za prvé je nutné, aby se daný reaktivátor přiblížil na dostatečnou vzdálenost k fosforu NPL. Za druhé, struktura reaktivátoru musí vykazovat vysokou afinitu k danému místu v enzymu za pomoci ne vazebných interakcí s okolními aminokyselinami. A za třetí, reaktivátor musí být silným nukleofilem, aby mohl vyvolat nukleofilní útok na fosfor, a tím na sebe danou NPL navázal a reaktivoval aktivní místo enzymu. [3]

Jelikož struktury NPL jsou rozdílné, tak neexistuje jeden univerzální reaktivátor. Také doposud není známý reaktivátor, který by byl úspěšný při reaktivaci AChE inhibované novičoky. Navíc struktury novičoků jsou oproti starším NPL prostorově náročnější, proto ve vědecké komunitě existuje hypotéza, která uvádí, že není možné reaktivovat acetylcholinesterázu inhibovanou novičoky z důvodu sterického bránění fosforu novičoku, a tedy není možné přiblížení reaktivátoru na dostatečnou vzdálenost, aby mohl provést nukleofilní útok. Možnosti reaktivace a potenciální reaktivátory při otravách novičoky jsou předmětem této práce. Na obr. 1 je znázorněno větší sterické bránění fosforu novičoku oproti starší NPL.



Obrázek 1: AChE s navázanými NPL na serin-203; a) AChE inhibovaná novičokem A242; b) AChE inhibovaná prostorově méně náročným tabunem

Práce si klade za cíl potvrdit nebo vyvrátit tuto hypotézu za přispění výpočetních metod, pomocí kterých budeme moci studovat první dvě podmínky reaktivace, tedy možné přiblížení reaktivátoru k fosforu novičku a jeho afinitu k danému místu. A dále, bude-li to možné, tak určit struktury reaktivátorů s největší pravděpodobností na reaktivaci inhibovaného enzymu, které budou testovány na aktivitu *in vitro*. K dosažení hlavních cílů je stanoveno pět dílčích cílů:

1. vybrat a připravit modely potenciálních reaktivátorů AChE, připravit modely proteinů inhibovaných novičky;
2. vypočítat chemické parametry aduktů noviček na serin, výsledky využít při molekulové dynamice;
3. pomocí molekulového dokování vybrat vhodné pózy potenciálních reaktivátorů;
4. využít sofistikovanější metodu – molekulovou dynamiku pro popis chování reaktivátorů v enzymech;
5. vyhodnotit výsledky.

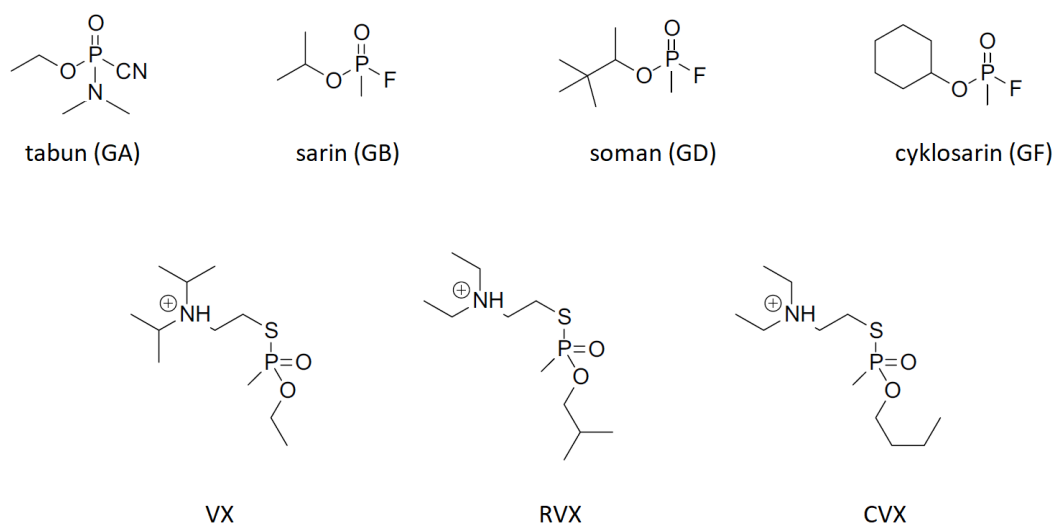
1. Teoretická část

1.1 Nervově paralytické látky

1.1.1 Historie NPL

Nervově paralytické látky (NPL) jsou nejvíce toxické látky syntetizované člověkem (LD_{50} pro látku VX je 0,14 mg/kg) a jsou využívány jako bojové chemické zbraně. [2] Chemicky se jedná o organické sloučeniny fosforu (organofosfáty a organofosfonáty). NPL se dělí do dvou velkých skupin. První skupina látek se značí jako G-látky (odvozené od slova German) a byly objevené ve 30. letech 20. století v Německu. Do této skupiny patří tabun (GA), sarin (GB), soman (GD) a cyklosarin (GF). Druhá skupina látek se označuje jako V-látky (odvozené od slova Venomous). Tyto látky vznikly po druhé světové válce a jedná se o látky: VX (objevena ve Velké Británii), RVX (ruský izomer) a CVX (čínský izomer). V-látky se liší od G-látek nižší těkavostí, vyšší toxicitou a vyšší perzistencí v terénu. Struktury jsou znázorněné na obr. 1.1. [4–6]

NPL byly zneužity v irácko-iránské válce (1980–1988), kdy ozbrojené síly Iráku použily sarin při náletech proti civilistům. [7] Sarin byl také použit radikální náboženskou sektou Óm šinrikjó při teroristických útocích v Japonsku. Dne 27. 6. 1994 ve městě Matsumoto zemřelo 8 lidí při útoku sarinem, stovky dalších byly zraněny při kontaktu s plynem. O devět měsíců později (20. 3. 1995) sekta vypustila tento plyn v tokijském metru. Při útoku zemřelo 13 lidí a u dalších několika tisíc se projeví různé vážné problémy. [8–10] V únoru 2017 byl Kim Jong-Nam, nevlastní bratr severokorejského vůdce, zavražděn na letišti v Kuala Lumpur, když mu dvě ženy vetřely neznámé chemikálie do obličeje. Později pitva identifikovala, že byl otráven NPL známou pod označením VX. [11] Nervově paralytické látky byly také použity v občanské válce v Sýrii (v letech 2013–2017). [12]



Obrázek 1.1: Struktury NPL [6]

1.1.2 Organizace pro zákaz chemických zbraní

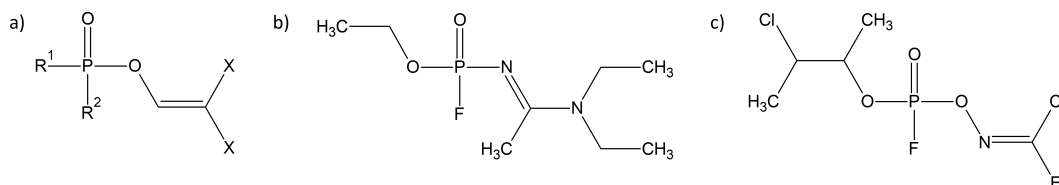
Organizace pro zákaz chemických zbraní (anglicky Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons, zkracováno OPCW) monitoruje dodržování Úmluvy o chemických zbraních. K organizaci se připojilo 193 států. Za Českou republiku s organizací spolupracuje Státní úřad pro jadernou bezpečnost (SÚJB), který zodpovídá za nešíření jaderných, chemických a biologických zbraní. [13, 14]

Úmluva o zákazu použití chemických zbraní (celým názvem Úmluva o zákazu vývoje, výroby, skladování a použití chemických zbraní a jejich ničení) vstoupila v platnost 29. dubna 1997 a zavazuje smluvní strany mj. k zákazu vyvíjení a vyrábění chemických zbraní, k zákazu používání chemických zbraní a ke zničení chemických zbraní, které vlastní nebo má v držení. Smluvní strany ovšem mohou používat tyto zakázané chemické látky pro výzkumné, lékařské, farmaceutické nebo ochranné účely. Konkrétní zakázané chemické zbraně a jejich prekurzory jsou uvedeny v seznamech v Příloze o chemických látkách. [13, 15]

1.1.3 Novičky

Látky přezdívané novičky jsou nejnovější skupinou NPL, které byly vyvinuté v 70. a 80. letech 20. století v Sovětském svazu v rámci tajného programu FOLIANT. Většina informací, které jsou o těchto nových sloučeninách známy, pochází ze svědectví a memoárů dr. V. S. Mirzajanova, který odhalil tajné experimenty s chemickými zbraněmi v Rusku. Podle dr. Mirzajanova byly nasyntetizovány stovky noviček s rozdílnými strukturami a označením (v průběhu let bylo publikováno mnoho struktur, a proto se můžeme setkat s několika různými strukturami, které jsou označené stejným kódem). Na obr. 1.2 je znázorněna organofosfátová kostra noviček a dvě rozdílné struktury novičku A-234. [16–18]

Novičky jsou extrémně toxické. Uvádí se, že některé novičky jsou ještě 5–8× toxičtější než látka VX. Většina noviček je považována za binární látky. V případě A-234 se uvádí, že prekurzory jsou acetonitril a málo účinný organofosfát. Binární látky mají několik výhod. Jednotlivé prekurzory nemusí odporovat Úmluvě o zákazu použití chemických zbraní, a tedy jsou „legální“. Jednotlivé komponenty jsou méně toxické a velmi stabilní, tím se zvyšuje bezpečnost skladování a přepravy. [1]



Obrázek 1.2: a) Organofosfátová kostra noviček. R = alkyl, alkoxy, alkylamino, fluoro; X = halogen (F, Cl, Br) nebo CN.

b) Struktura A-234 popsána Mirzajanovem.

c) Struktura A-234 popsána Hoenigem a Ellisonem. [19, 20]

Otravy způsobené novičoky

Dne 4. března roku 2018 ruský bývalý dvojitý agent Sergej Skripal a jeho dcera zkolabovali na lavičce v parku v anglickém městě Salisbury. Skripalovi byli okamžitě převezeni do nemocnice, kde jim byla poskytnuta léčba pro předpokládanou otravu nervově paralytickou látkou. Do nemocnice byl přijat také zasahující policista, u kterého se také objevily příznaky otravy. O měsíc později vědci z Organizace pro zákaz chemických zbraní (OPCW) potvrdili přítomnost novičoků v biologických vzorcích Skripalových (konkrétně A-234, struktura znázorněna na obr. 1.2 b). S. Skripal byl propuštěn z nemocnice 18. května (jeho dcera o měsíc dříve). [1, 21]

Podobná otrava dvou britských občanů byla hlášena 30. června 2018 ve městě Amesbury, které leží 11 km severně od Salisbury. Charlie Rowley našel lahvičku s parfémem, o které se později zjistilo, že obsahuje stejnou látku jak při otravě Skripalových, v odpadkovém koši v Salisbury. Následně lahvičku dal Dawn Sturgessově, která si ji nastříkala na zápěstí. Sturgessová zemřela 8. července na následky otravy. [22, 23]

Poté, co britské úřady označily otravu Skripalových jako teroristický útok za použití nových NPL, OPCW v červnu 2020 přidala struktury založené na organofosfátové kostře novičoků na seznamy zakázaných chemických zbraní. Nově přidané struktury na seznam 1 úmluvy (celý seznam viz [24]) jsou popsány v tab. 1.1. [25, 26]

Ruský opoziční aktivista Alexej Navalnyj byl otráven novičoky 20. srpna 2020. Během letu z Tomsku do Moskvy se u něho projeví příznaky otravy. Po nouzovém přistání v Omsku byl v tamní nemocnici uveden do kómatu. O dva dny později byl Navalnyj evakuován do berlínské nemocnice. Po měsíci hospitalizace byl Navalnyj z nemocnice propuštěn. V říjnu 2020 OPCW vydala zprávu, kdy na základě výsledků analýzy odebraných biomedicínských vzorků potvrdila, že v Navalného krvi, moči, vzorcích kůže a jeho láchvi byla přítomnost látek strukturně podobných novičokům o struktuře (14) a (15) v seznamu 1 úmluvy. [27, 28]

-
- (13) P-Alkyl (H nebo C10, včetně cykloalkylů)-N-(1-dialkyl (C10, včetně cykloalkylů)amino))alkyliden (H nebo C10 včetně cykloalkylů) fluoridofosfonamidy a odpovídající protonované soli
Registrační číslo CAS: CR0004
 - (14) O-Alkyl (H nebo C10, včetně cykloalkylů)-N-(1-dialkyl (C10, včetně cykloalkylů)amino))alkyliden (H nebo C10 včetně cykloalkylů) fluoridofosfonamidy a odpovídající protonované soli
Registrační číslo CAS: CR0005
 - (15) N-[bis(diethylamino)methylen]amido(P-methyl)fluoridofosfonát
Registrační číslo CAS: 2387496-14-0
 - (16) Karbamáty (kvarterní a biskvarterní sloučeniny) odvozené od dimethylkarbamoyloxypyridinu
Registrační číslo CAS: CR0006, CR0007
-

Tabulka 1.1: Nové látky přidané na Úmluvu o zákazu použití chemických zbraní; (pozn. registrační čísla CAS jsou zároveň odkazy na dané struktury) [14]

1.2 Mechanismus účinku

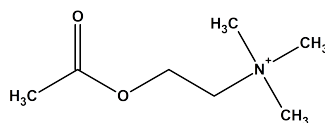
Všechny NPL působí na základě ireverzibilní inhibice enzymu acetylcholinesterázy (AChE).

1.2.1 Acetylcholinesteráza

AChE je enzym, který se primárně nachází na postsynaptických neuromuskulárních spojeních, zejména ve svalech a nervech. AChE hydrolyzuje neurotransmitter acetylcholin (ACh) na kyselinu octovou a cholin. Primární úlohou AChE je ukončit neuronální přenos a signalizaci mezi synapsemi. [29]

Acetylcholin

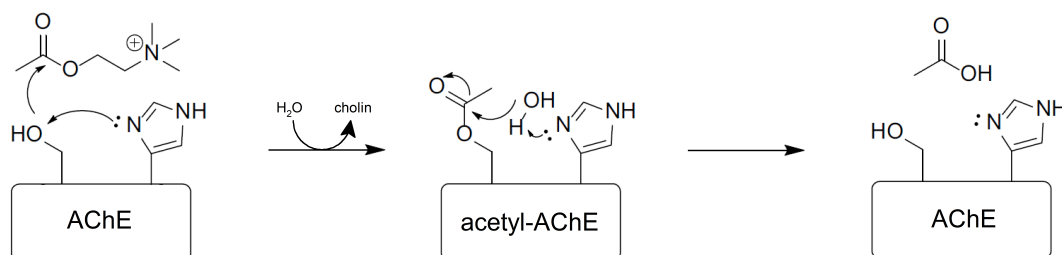
Acetylcholin (struktura na obr. 1.3) účinkuje jako neurotransmitter v periferní i centrální nervové soustavě. Acetylcholin, po vyplavení do synaptické štěrbině nervosvalové ploténky, se váže na nikotinové receptory, což má za následek svalovou kontrakci. ACh působí jako mediátor v parasymptickém nervovém systému vazbou na muskarinové receptory. Důsledkem aktivace parasymptiku je zpomalení srdeční činnosti, zmenšení zorniček, stimulace gastrointestinálního traktu, kontrakce trachey a bronchů, zvýšená sekrece žláz bronchů, silná sekrece slzných a slinných žláz a další. [30]



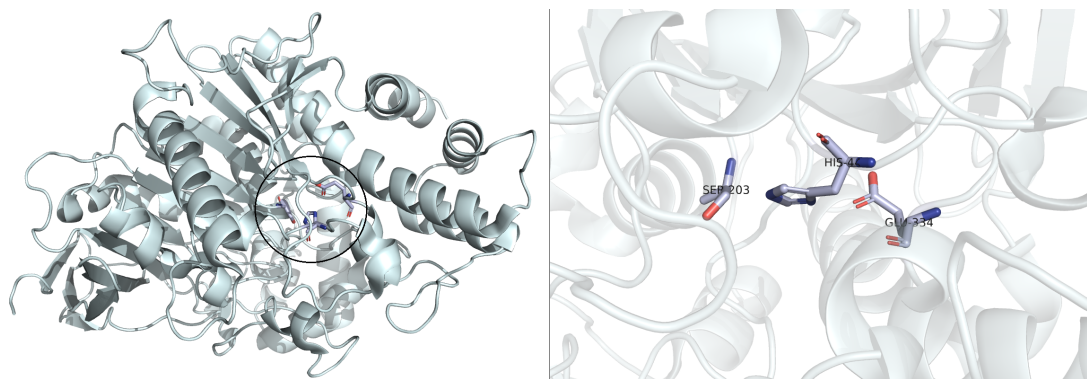
Obrázek 1.3: Struktura acetylcholinu

Hydrolyza ACh

Hydrolyza ACh (na obr. 1.4) probíhá v aktivním místě AChE, které je tvořeno tzv. katalytickou triádou tří aminokyselin (AMK): serin-203, histidin-447 a glutamát-334 (značení pro lidskou AChE), model AChE s detailem na katalytickou triádu na obr. 1.5. Hydroxylová skupina serinu nukleofilně napadne uhlík karbonylové skupiny ACh za vytvoření přechodného stavu acetyl-enzym (a uvolnění cholinu). Poté molekula vody za přispění histidinu-447 nukleofilním atakem na acetyl-enzym uvolní kyselinu octovou a regeneruje volný enzym. [31]



Obrázek 1.4: Mechanismus hydrolyzy acetylcholinu [6]

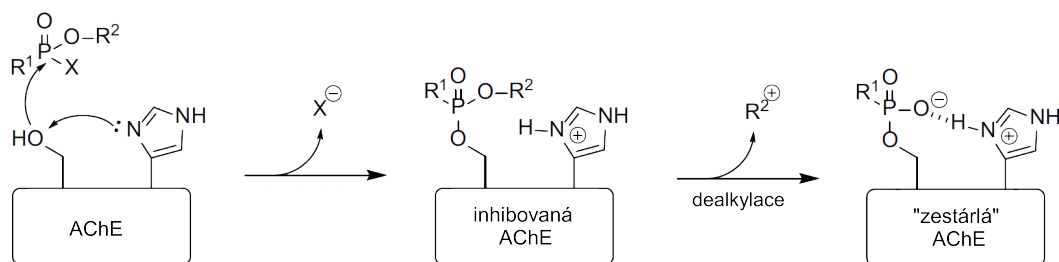


Obrázek 1.5: Model lidské AChE s detailem na katalytickou triádu; krystalická struktura 3LII získána z RCSB-PDB [32]

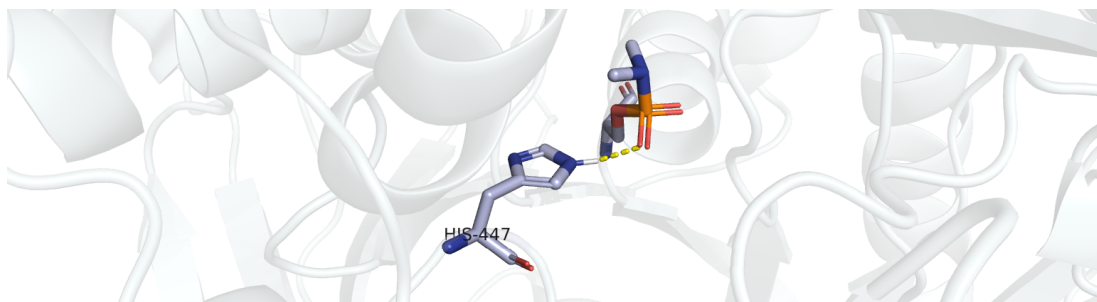
1.2.2 Inhibice AChE

Prvotní krok inhibice AChE je podobný počátečnímu kroku hydrolýzy ACh. Hydroxylová skupina serinu nukleofilně napadne fosfor NPL za vytvoření přechodného stavu (a uvolnění odstoupivší skupiny, většinou halogenidový ion, u tabunu kyanidový ion). Ve druhém kroku nemůže histidinový zbytek aktivovat vodu (z důvodu tvorby nevhodné konformace), a proto je spontánní hydrolýza extrémně pomalá v rozmezí hodin až dnů.

Kromě spontánní hydrolýzy se zde objevuje časově závislá intramolekulární reakce. Tento proces zahrnuje dealkylaci substituentu z atomu fosforu za vzniku fosfonátových aduktů, který je dále stabilizován interakcí s protonovaným histidinem. Tento proces se nazývá jako „stárnutí“ AChE. Takto „zestárlý“ enzym je velmi odolný vůči hydrolýze i proti reaktivaci oximovými reaktivátory. Rychlost tohoto procesu závisí na typu NPL, pro soman to trvá 2–4 minuty, 5 hodin pro sarin, 46 hodin pro tabun a 48 hodin pro VX. Inhibice AChE je znázorněna na obr. 1.6, na obr. 1.7 je znázorněna „zestárlá“ inhibovaná AChE tabunem a interakce tabunu s histidinem. [6]



Obrázek 1.6: Mechanismus inhibice AChE nervově paralytickou látkou [6]



Obrázek 1.7: Model lidské „zestárlé“ AChE inhibované tabunem; interakce s histidinem znázorněna žlutou čárkovanou čarou; krystalická struktura 2X8B získána z RCSB-PDB [33]

1.3 Intoxikace NPL

1.3.1 Toxicita

Bez ohledu na cestu vstupu je látka VX nejúčinnější mezi NPL (jestliže nebudeme brát v úvahu novičoky, o kterých víme zatím málo informací) s hodnotou $LD_{50} = 0,14$ mg/kg. [2] Látka VX je méně těkavá a lépe proniká kůží oproti G-látkám, proto je VX označována jako kontaktní látka a obecně má menší riziko otravy inhalací. G-látky jsou těkavější, a proto je zde větší riziko otravy inhalací (ale i zde zůstává riziko otravy kontaktem, nicméně rychlost absorpce kůží je mnohem menší než inhalační formou). Na základě studií na zvířatech mají G-látky inhalační letální dávku okolo 1 mg u lidí. Celková relativní letalita NPL ve studiích na zvířatech je: $VX > \text{soman} > \text{sarin} > \text{tabun}$. [34] Toxicita novičoků by měla být ještě vyšší než u látky VX. [18]

1.3.2 Projevy intoxikace

Při inhibici AChE nedochází ke štěpení ACh a to vede k jeho kumulaci v synaptické štěrbině, tím dochází k nadměrné aktivaci nikotinových a muskarinových receptorů. Podle aktivace receptorů se klinické příznaky otravy dělí na tři typy: **Příznaky nikotinového typu:** záškuby, křeče až paralýza kosterního svalstva. **Příznaky muskarinového typu:** mióza, slzení, porucha akomodace, bronchokonstrikce, zvýšená bronchiální sekrece, nauzea, zvracení, průjem, zvýšené pocení, slinění, bradykardie a pokles krevního tlaku.

Příznaky centrálního typu: deprese respiračních a kardiovaskulárních center, závratě, úzkost, nespavost, emoční labilita a zmatenost. [35]

Těžká expozice NPL je v akutní fázi fatální. Dochází ke ztrátě kontroly těla nad dýchacími svaly, dochází ke zúžení průdušek a k útlumu dýchacího centra. Hypoxie může vést k edému mozku. Při intoxikaci smrt může následovat během několika minut (v závislosti na dávce) v důsledku udušení či zástavy srdce. [34]

1.4 Terapie otravy

První pomoc při otravě NPL zahrnuje podání antidot, zamezení dalšího pronikání jedu do organismu (opuštění zamořeného prostoru, nasazení prostředků individuální ochrany, ...) a zabezpečení základních životních funkcí. Úspěšná první pomoc může zachránit život a zásadně ovlivnit i další průběh otravy.

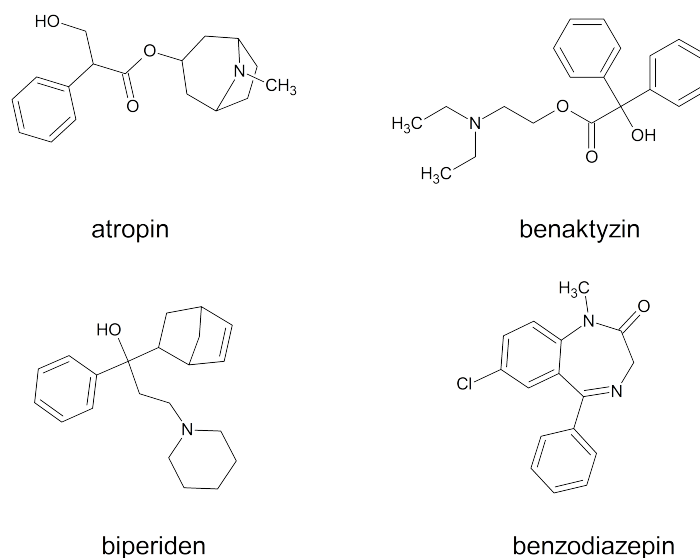
Základem terapie otravy NPL je antidotní terapie, kterou je nutno zahájit co nejdříve. Terapie je založena na podávání anticholinergik (symptomatická léčba) společně s tzv. reaktivátory AChE (kauzální léčba). [3]

1.4.1 Symptomatická terapie

K útlumu projevů otravy se využívají anticholinergika. Jedná se o antagonisty ACh na jeho receptorech, tím jsou schopna zabraňovat nadměrné stimulaci cholinergních receptorů a mírnit příznaky otravy. Nejčastěji používaným anticholinergikem je atropin, který působí jako periferní muskarinový antagonist. Z důvodu nižší prostupnosti hematoencefalickou bariérou ovlivňuje méně centrální příznaky intoxikace. Při těžkých otravách je možné využít anticholinergika s centrálními účinky (benaktyzin, biperiden). Zvláště u intoxikací NPL s převahou centrálního účinku (soman, sarin) je kombinování atropinu s anticholinergiky s převahou centrálního účinku užitečné. [3]

Jelikož nikotinové příznaky nejsou atropinem ovlivněny, tak k prevenci a útlumu křečí se využívají antikonvulzivní léčiva ze skupiny benzodiazepinů. V praxi se nejvíce používá diazepam.

Do symptomatické terapie patří i protišoková terapie (analgetika, sedativa), dále léčba následků akutní respirační insuficience (oxygenoterapie a terapie respirační acidózy) či antiedematózní terapie. [3, 35] Struktury léčiv používaných k symptomatické terapii jsou znázorněny na obr. 1.8.



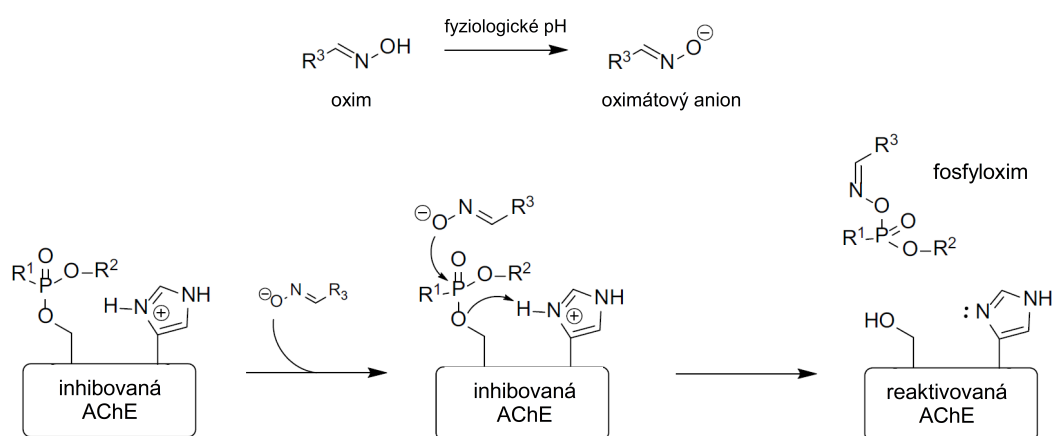
Obrázek 1.8: Struktury léčiv využívaných při symptomatické léčbě intoxikací nervově paralytickými látkami

1.4.2 Kauzální léčba

Mechanismus reaktivity

Ke kauzální léčbě se používají reaktivátory AChE, které na sebe navážou NPL, a tím uvolní (reaktivují) aktivní místo enzymu, který může opět hydrolyzovat ACh. V současné době se používají reaktivátory, které mají ve své struktuře oximovou skupinu (resp. ve fyziologickém pH oximátovou skupinu).

Oximátový anion přistupuje ke kovalentní vazbě P–O mezi NPL a hydroxy-lem serinu-203 v aktivním místě a tvoří reverzibilní oxim-fosfyl-AChE-konjugát. Následně dochází k vytěsnění fosfylvého zbytku z přechodného stavu za vzniku fosfloximu a reaktivity enzymu. [6] Mechanismus znázorněn na obr. 1.9, model inhibované AChE v komplexu s HI-6 na obr. 1.11.



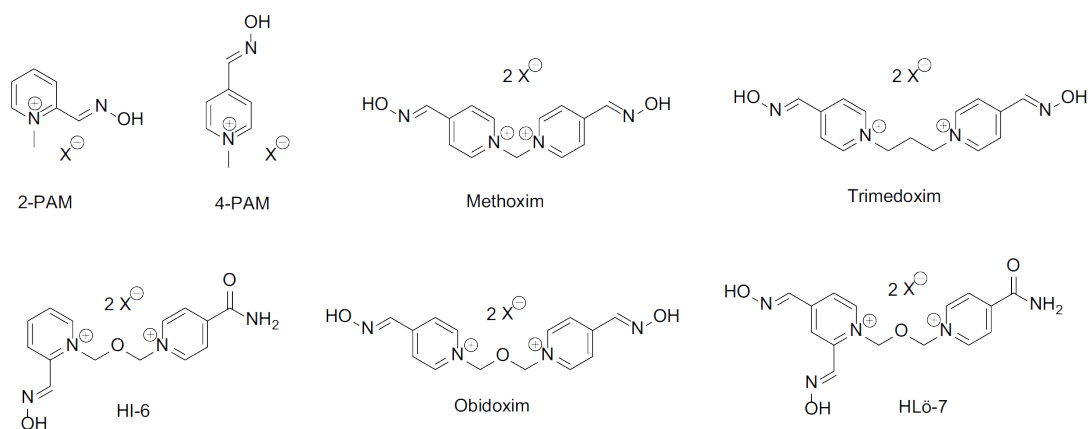
Obrázek 1.9: Mechanismus reaktivity inhibované AChE pomocí oximových reaktivátorů [6]

Reaktivátory

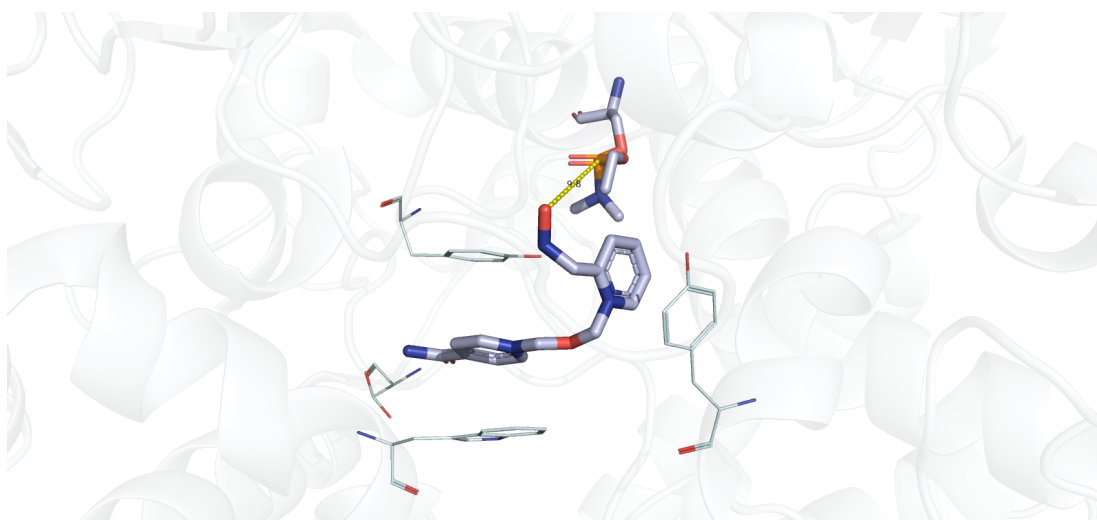
Všechny komerčně dostupné reaktivátory jsou nabitě oximy s jedním nebo dvěma pyridinovými kruhy spojenými různými linkery (strukтуры na obr. 1.10). První účinný oximový reaktivátor, pralidoxim (2-PAM), byl popsán v USA v roce 1955 a jeho charakteristickým strukturálním rysem je monopyridinový kruh a oximová skupina v poloze 2. Je účinný při reaktivaci AChE inhibované sarinem či VX, ale již hůře reaktivuje AChE inhibovanou somanem nebo tabunem. Prvním bis-pyridinovým reaktivátorem uvedeným na trh byl methoxim, který prokázal lepší účinnost proti AChE inhibované tabunem, sarinem i VX ve srovnání s 2-PAM a 4-PAM. Při otravě somanem je však stále neúčinný. Trimedoxim, obidoxim a HLö-7 jsou považovány za nejúčinnější v případě intoxikace tabunem. Naopak při intoxikaci VX jsou méně účinné. Asoxim (HI-6) je jedním z nejúčinnějších reaktivátorů pro léčbu intoxikace somanem, je však neefektivní proti tabunu. Žádný z těchto dostupných reaktivátorů však nepředstavuje univerzální reaktivátor při otravách všemi NPL. [6]

Terapeutická hodnota oximových reaktivátorů je stále nedostačující a to ze tří hlavních důvodů. Za prvé, neexistuje univerzální širokospektrální reaktivátor,

který by dokázal reaktivovat AChE při intoxikaci různými typy NPL. Za druhé, všechny dostupné reaktivátory jsou nabitě, a proto je jejich přestup hematoencefalickou bariérou velmi omezený. Nejsou tedy schopny reaktivovat inhibované AChE v mozku. Za třetí, mezi známými reaktivátory neexistuje žádný, který by byl schopen reaktivovat „zestárlou“ AChE. Všechny tyto nevýhody jsou důvodem výzkumu a vyvíjení nových reaktivátorů, které by byly schopny sloužit jako univerzální antidota ve všech případech intoxikací NPL. [6]



Obrázek 1.10: Komerčně dostupné reaktivátory AChE [6]



Obrázek 1.11: Model lidské AChE inhibované tabunem v komplexu s HI-6; krystalická struktura 6WUY získána z RCSB-PDB [36]

2. Experimentální část

Prvním krokem pro *in silico* studii potenciálních reaktivátorů bylo vytvoření modelů vybraných ligandů a proteinů (vč. parametrizace aduktů serinu s novičkou). Následujícím krokem bylo dokování ligandů do proteinů. Nejlepší ligandy byly dále podrobeny sofistikovanější metodě – molekulové dynamice.

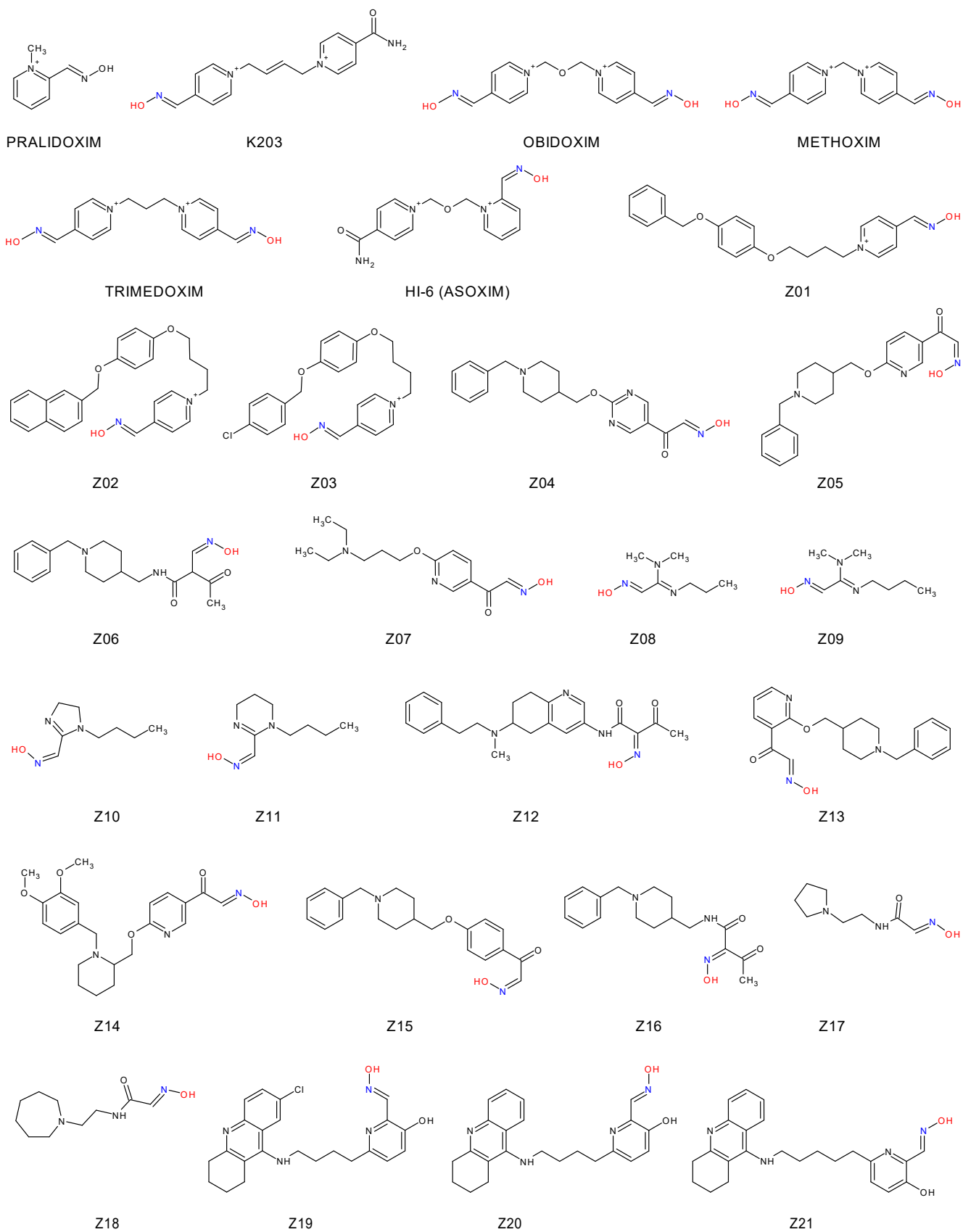
2.1 Příprava modelů ligandů

Z odborných článků bylo vybráno 60 potenciálních reaktivátorů (struktury na obr. 2.1, 2.2 a 2.3), mezi nimiž jsou struktury komerčně dostupných reaktivátorů, které jsou zavedené v armádách NATO (např. obidoxim, pralidoxim, HI-6), ale také nové experimentální reaktivátory s pracovním označením Z01–Z54. [6, 37, 38] Jejich 2D struktury byly vytvořeny softwarem ChemSketch (v. 2021.2.0). [39] Dále byly připraveny 3D struktury, které byly optimalizované podle silového pole GAFF softwarem Avogadro (v. 1.2.0). [40] Následně byly převedeny do formátu *pdbqt* (formát vhodný k dokování) softwarem AutoDock Tools (v. 1.5.6). [41]

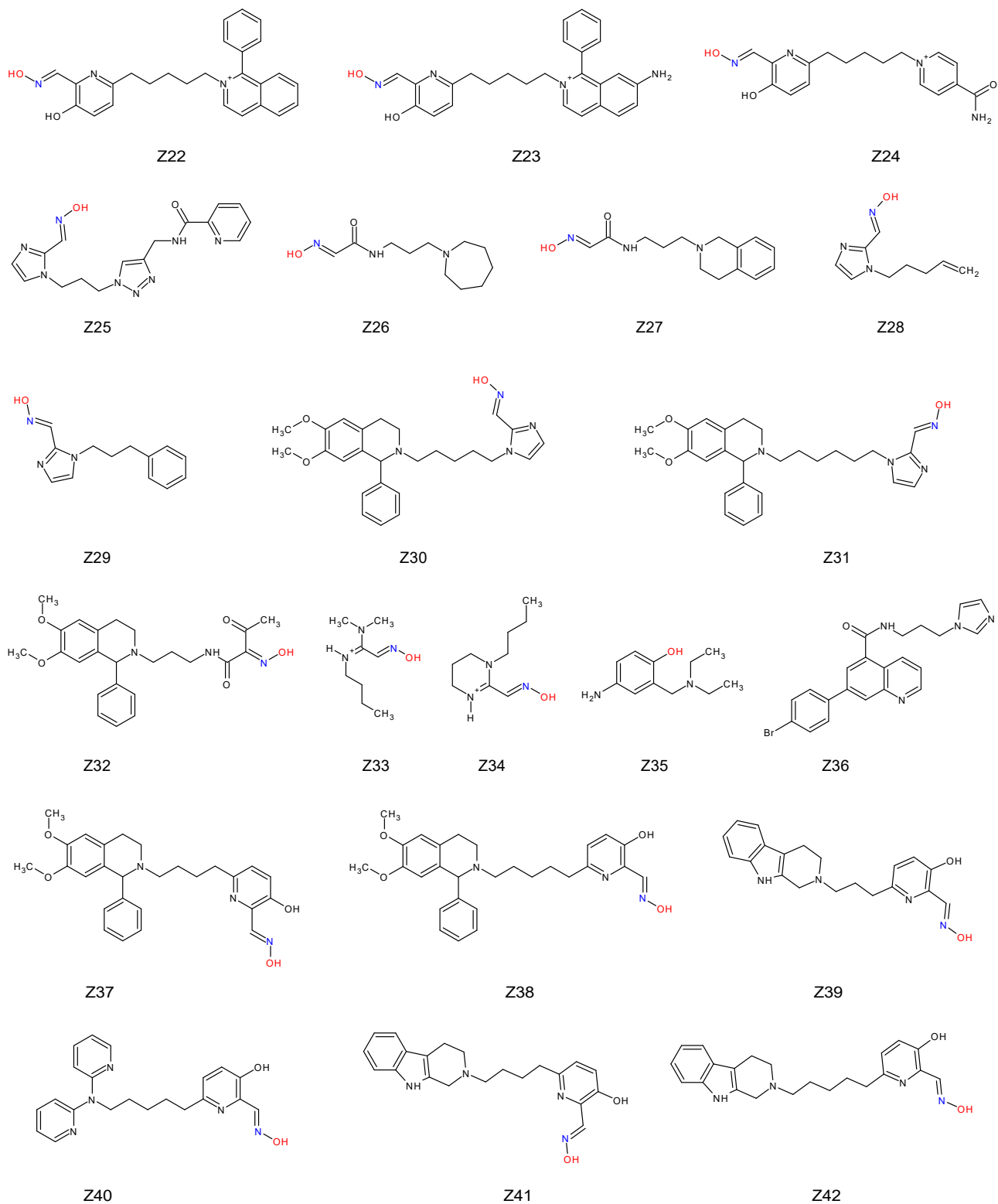
2.2 Příprava modelů proteinů

Z literatury bylo vybráno 5 struktur noviček s označením A230, A232, A234, A242 a A262 (struktury na obr. 2.4). Z databáze RCSB-Protein Data Bank (PDB) byla zvolena krystalická struktura lidské acetylcholinesterázy inhibované paraoxonem (ID 5HF9) s rozlišením 2,20 Å (v době experimentální části studie nebyla v databázi RCSB-PDB žádná struktura AChE inhibované novičkou, proto byla vybraná struktura dále modifikována). [42] Modely cílových proteinů inhibovaných jednotlivými novičkou byly vytvořeny modifikacemi pomocí softwaru UCSF Chimera (v. 1.14). [43] V témže softwaru byly dané modely upraveny pro dokování (nástrojem DockPrep) a převedeny do *pdbqt* formátu softwarem AutoDock Tools. [41] Následně byly provedeny energetické minimalizace modelů softwarem Gromacs (v. 2020.4). [44]

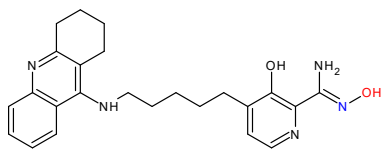
Tímto způsobem bylo připraveno pět modelů acetylcholinesterázy inhibované vybranými novičkou. Vytvořené modely byly na závěr odeslány na server Verify 3D (<https://saves.mbi.ucla.edu/>), který určuje kompatibilitu 3D struktury modelu s jeho sekvencí aminokyselin (1D) a výsledky porovnává vůči dobrým strukturám. Tímto jsme dané modely validovali a určili, že jsou vhodné k molekulovému dokování a molekulové dynamice. [45, 46]



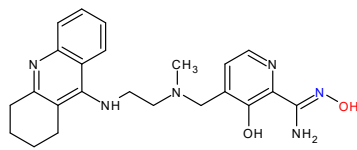
Obrázek 2.1: Vybrané struktury potenciálních reaktivátorů AChE (1. část)



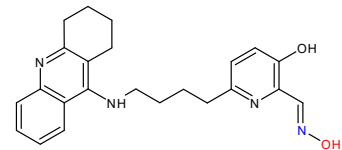
Obrázek 2.2: Vybrané struktury potenciálních reaktivátorů AChE (2. část)



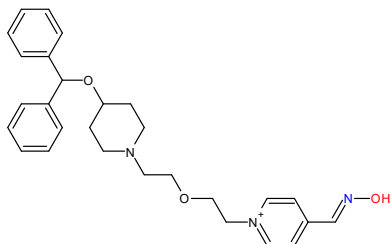
Z43



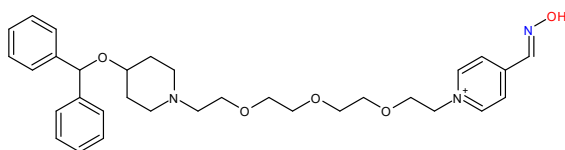
Z44



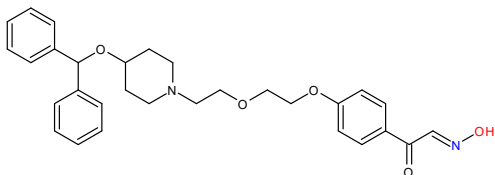
Z45



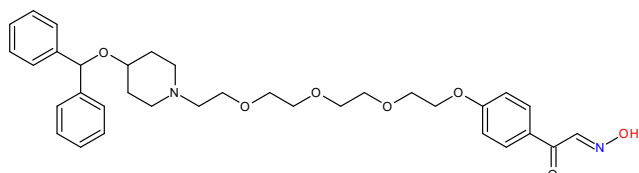
Z46



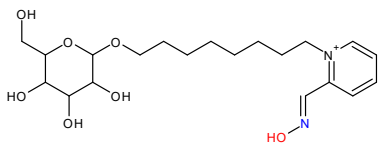
Z47



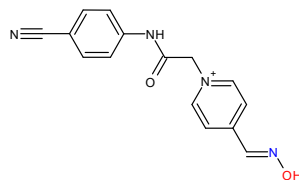
Z48



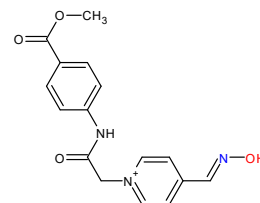
Z49



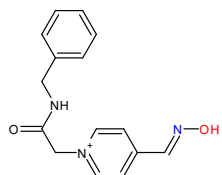
Z50



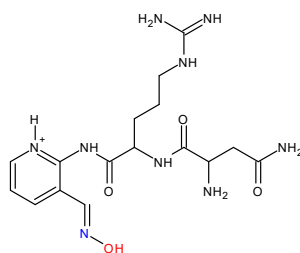
Z51



Z52



Z53



Z54

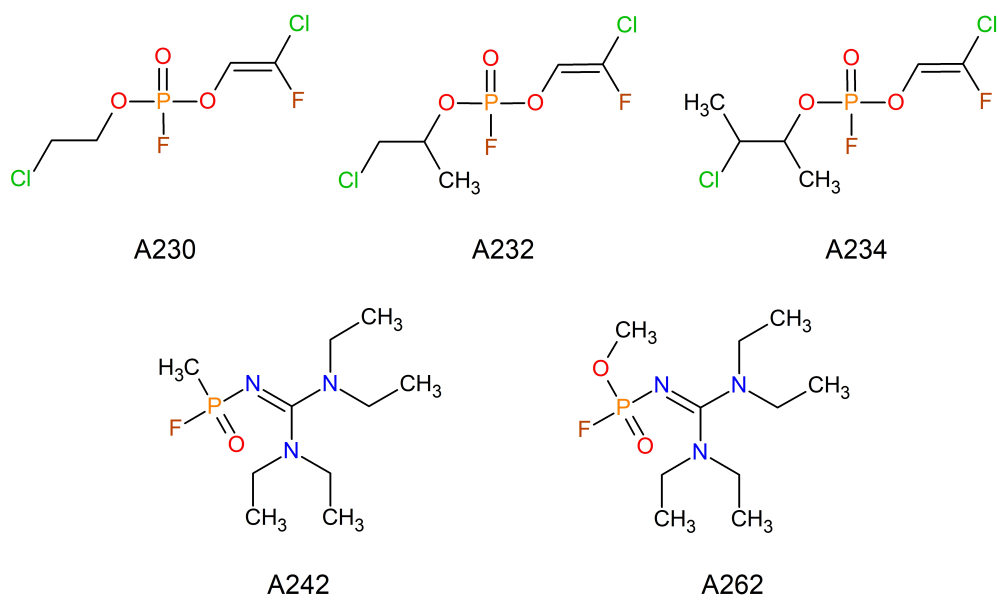
Obrázek 2.3: Vybrané struktury potenciálních reaktivátorů AChE (3. část)

2.3 Parametrizace

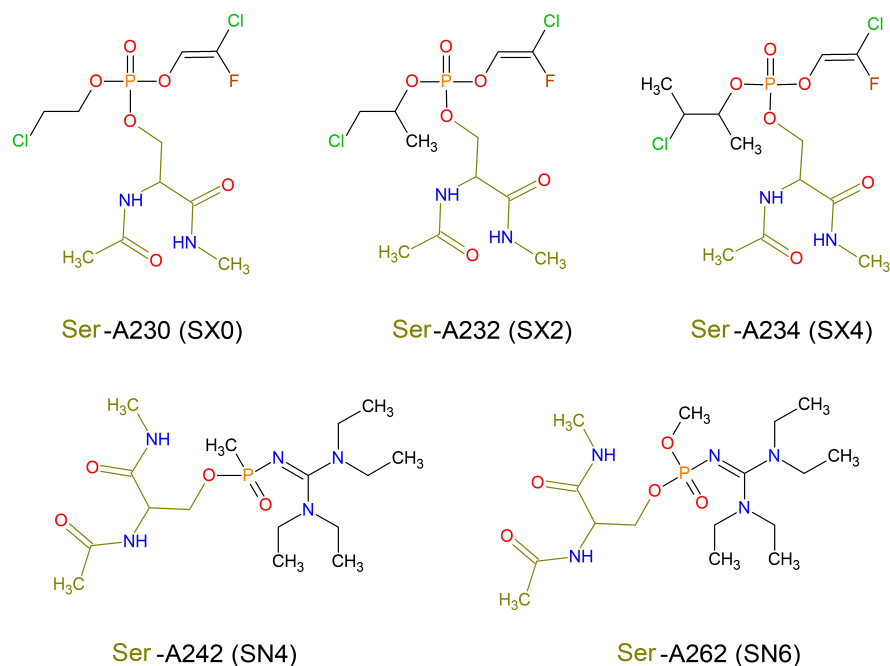
Ke spuštění molekulové dynamiky na modelech AChE inhibované novičky bylo nejdříve nutné popsat chemické parametry (vypočítat délky vazeb mezi jednotlivými atomy, vazebné úhly, dihedrální úhly a silové konstanty) aduktů noviček na aminokyselinu serin. Dané struktury byly označeny SX0 (pro adukt Serin-A230), SX2 (Ser-A232), SX4 (Ser-A234), SN4 (Ser-A242) a SN6 (Ser-A262). Jejich struktury, názvy atomů a atomové typy jsou znázorněny na obr. 2.5, 2.6 a 2.7.

Vytvoření 2D struktury, 3D struktury aduktů a jejich optimalizace byly provedeny obdobně jako při přípravě modelů ligandů za přispění softwarů Chem-Sketch, Avogadro a AutoDock Tools. [39–41] Internetové stránky R.E.D. Server Development [47, 48], které slouží ke generování silových polí s využitím softwarového balíku Gaussian16 (revision B.01) [49], byly využity na výpočet parametrů modelů aduktů serinu s novičkou *ab initio* metodou HF/6-31G*. Poté bylo manuálně upravené a doplněné silové pole Amber14SB novými parametry a dané pole bylo využito při molekulové dynamice.

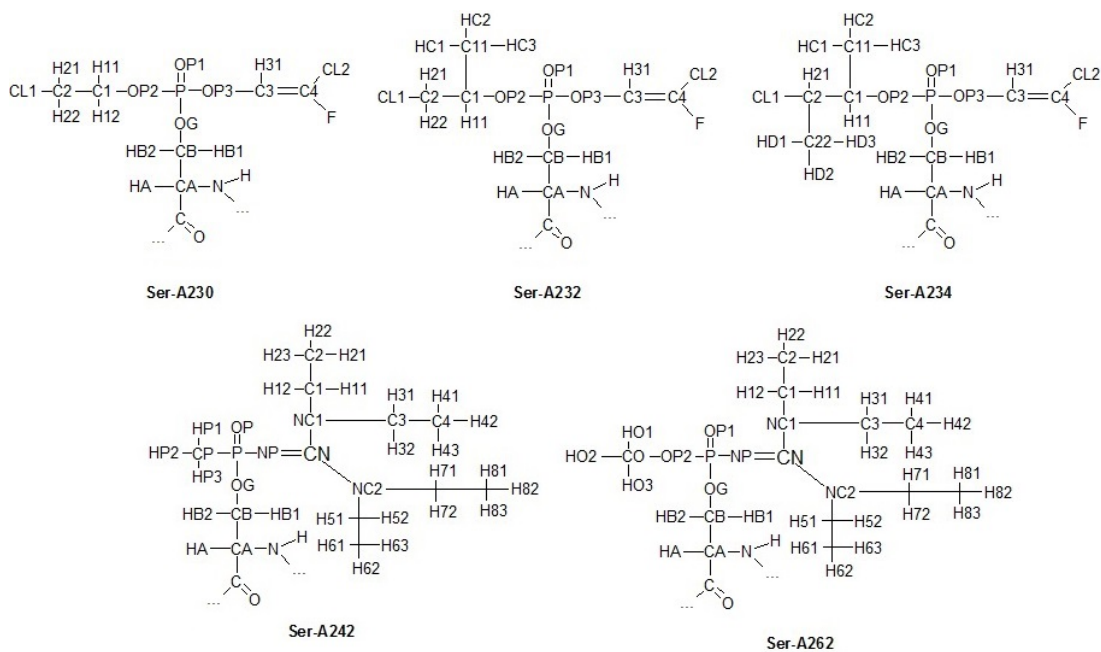
Všeobecné silové pole Amber druhé generace (GAFF2) nám poskytlo parametry malých molekul (ligandů). [50] K parametrizaci ligandů byl využit software Antechamber (v. 19.0). [51]



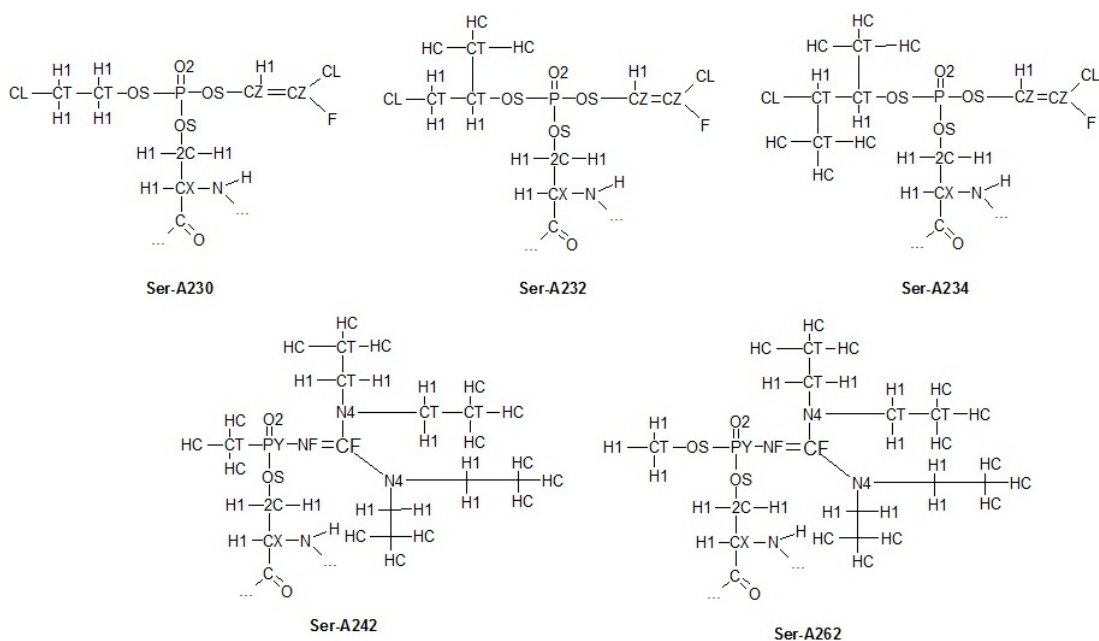
Obrázek 2.4: Struktury noviček



Obrázek 2.5: Aduky serinu s novičky



Obrázek 2.6: Názvy atomů novičků navázaných na zbytek AMK



Obrázek 2.7: Typy atomů novičoků navázaných na zbytek AMK (jejich popis viz tabulka 2.1)

typ	popis
C	sp2 uhlík karbonylové skupiny
CT	sp3 alifatický uhlík
CX	alfa-uhlík v aminokyselině
2C	beta-uhlík v aminokyselině
CF	sp2 alifatický uhlík v konjugovaném systému
CZ	sp2 alifatický uhlík
H	vodík vázaný na dusíkový atom
HC	vodík vázaný na alifatický uhlík bez elektronegativních atomů
H1	vodík vázaný na uhlík s jedním elektronegativním atomem
N	sp2 dusík v amidové skupině
NF	sp2 alifatický dusík v konjugovaném systému
N4	nenabitý dusík se třemi připojenými atomy
O	kyslík amidové skupiny
OS	kyslík esterové nebo etherové skupiny
O2	kyslík karbonylové nebo fosfátové skupiny
P	fosfor ve fosfátové skupině
PY	fosfor se čtyřmi připojenými atomy v konjugovaném systému
Cl	chlor kovalentně vázaný
F	fluor kovalentně vázaný

Tabulka 2.1: Popis atomových typů

2.4 Molekulové dokování

Připravené modely ligandů a proteinů v *pdbqt* formátu byly využity k provedení dokovací studie. Nejdříve byl v softwaru AutoDock Tools definován tzv. grid box (souřadnice místa v receptoru, kam chceme dané ligandy nadokovat). [41] Samotné semiflexibilní dokování (protein rigidní, ligandy flexibilní – volná rotovatelnost vazeb) bylo provedeno softwarem AutoDock Vina (v. 1.1.2) s hodnotou úplnosti hledání (exhaustiveness) 8. [52] Každý ligand (60) byl nadokován do všech modelů proteinů (5), celkem tedy bylo provedeno 300 výpočtů, poté byl vybrán nejlepší výsledek. K vizualizaci výsledků byl využit software PyMOL (v. 2.3.2). [53]

2.5 Příprava komplexů

Nejvhodnější pózy nejlepších ligandů, vybrané pomocí molekulového dokování, byly použity jako startovací pózy pro spuštění simulací molekulové dynamiky. K tomu bylo potřeba připravit komplex receptoru (AChE inhibovaná novičokem) společně s ligandem. Ze 60 ligandů bylo vybráno 32 molekul pro MD, tedy bylo připraveno celkem 160 komplexů.

Nejdříve softwarem PyMOL byla vizuální inspekci vybrána nejlepší póza každého ligandu [53], uložena ve formátu *pdb* a upravena (přidány atomy vodíku) softwarem Avogadro. [40] Dále proběhla parametrizace ligandů (popsáno v odstavci 2.3). Poté mohl být připraven topologický soubor, který obsahuje parametrické údaje daného ligandu.

K přípravě topologie receptorů a převedení jejich modelů do formátu *gro* (formát nutný pro MD) byl využit software Gromacs. [44]

Jakmile jsme měli připravené topologie ligandů a receptorů, tak jsme nadefinovali topologii jednotlivých komplexů (dané soubory odkazovaly na topologii ligandů a receptorů) a vytvořili jsme dané komplexy (celkem 160) ve formátu *gro*.

2.6 Molekulová dynamika

K optimalizaci systému a samotné simulaci MD jsme využili software Gromacs. [44] Komplexy byly vycentrovány a umístěny do „boxu“ o objemu 966 nm^3 obsahující okolo 29 000 TIP3P molekul vody jako solventu. Poté jsme nabitý systém neutralizovali záměnou některých molekul rozpouštědla za proti-ionty (Na^+ a Cl^-), abychom dosáhli elektroneutralního systému a následně jsme celý systém minimalizovali. Teplota a tlak systému byly poté ekvilibrovány na referenčních 310 K a 1 bar.

Po přípravě systému jsme spustili 160 simulací, každá o délce 50 ns. Výpočty probíhaly na grafických procesorech NVIDIA Tesla V100 32GB. Výsledky byly analyzované softwarem Visual Molecular Dynamics (VMD, v. 1.9.3). [54]

3. Výsledky

3.1 Parametrizace

Pro studii bylo nutné definovat nový atomový typ CZ (popis tab. 3.1).

typ	Mr	popis
CZ	12,01	alifatický uhlík, sp ²

Tabulka 3.1: Nově definovaný atomový typ

Nové vypočtené parametry vazeb, vazebných úhlů a dihedralních úhlů mezi jednotlivými atomy jsou zobrazeny v tabulkách 3.2, 3.3 a 3.4.

V tabulkách 3.5, 3.6, 3.7, 3.8 a 3.9 jsou zobrazeny adukty serinu s novičoky – jejich uspořádání atomů (atoms), atomové typy (types), částečné náboje (charges), vaznost (bonds) a nepravé dihedralní úhly (impropers).

i	j	func	b0 [nm]	kb [kJ·mol ⁻¹ ·nm ⁻²]
OS	CZ	1	0,13600	310703,8
CZ	CZ	1	0,13340	403170,2
CZ	Cl	1	0,17310	161251,4
CZ	F	1	0,13390	308026,1
CZ	H1	1	0.10870	329866.6

Tabulka 3.2: Nově definované parametry vazeb [bondtypes]

i, j – atomy; func – označení funkce; b0 – optimální délka; kb – silová konstanta

i	j	k	func	th0 [°]	cth [kJ·mol ⁻¹ ·rad ⁻²]
OS	CZ	CZ	1	121,870	742,242
CZ	CZ	Cl	1	123,110	605,006
CZ	CZ	F	1	122,870	755,630
Cl	CZ	F	1	114,340	694,544
2C	CT	Cl	1	110,410	598,312
OS	CZ	H1	1	113,730	535,552
H1	CZ	CZ	1	122,670	417,563
2C	CT	H1	1	109,560	392,459
CT	2C	CT	1	111,510	543,083
2C	CT	CT	1	111,510	543,083
N4	CF	N4	1	119,710	908,765
P	OS	CZ	1	126,370	688,686
P	OS	2C	1	119,540	697,054

Tabulka 3.3: Nově definované parametry vazeb [angletypes]

i, j, k – atomy; func – označení funkce; th0 – optimální úhel; cth – silová konstanta

i	j	k	l	func	ph	kd [kJ·mol ⁻¹]	mult
OS	P	OS	2C	9	0,0	10,92024	2
OS	P	OS	2C	9	0,0	0,00000	3
OS	CZ	CZ	Cl	9	180,0	27,82360	2
OS	CZ	CZ	F	9	180,0	27,82360	2
P	OS	CZ	CZ	9	180,0	4,39320	2
P	OS	2C	CT	9	180,0	16,52680	1
P	OS	2C	CT	9	0,0	1,60247	3
CZ	OS	P	O2	9	180,0	3,34720	2
O2	P	OS	2C	9	0,0	3,34720	2
O2	P	OS	2C	9	0,0	2,30120	3
CZ	OS	P	OS	9	0,0	3,34720	2
OS	2C	CT	Cl	9	0,0	0,65084	3
P	OS	CZ	H1	9	180,0	4,39320	2
P	OS	2C	H1	9	0,0	0,90793	3
OS	2C	CT	H1	9	0,0	1,04600	1
OS	2C	CT	H1	9	0,0	0,00000	3
H1	CZ	CZ	Cl	9	180,0	27,82360	2
H1	CZ	CZ	F	9	180,0	27,82360	2
H1	2C	CT	H1	9	0,0	0,65084	3
H1	2C	CT	Cl	9	0,0	1,04600	1
H1	2C	CT	Cl	9	0,0	0,00000	3
P	OS	2C	CX	9	180,0	16,52680	1
P	OS	2C	CX	9	0,0	1,60247	3
Cl	CT	2C	CT	9	0,0	0,65084	3
OS	2C	CT	HC	9	0,0	1,04600	1
OS	2C	CT	HC	9	0,0	0,00000	3
H1	2C	CT	HC	9	0,0	0,65084	3
CT	2C	CT	HC	9	0,0	0,33472	3
H1	CT	2C	CT	9	0,0	0,65084	3
OS	2C	CT	CT	9	0,0	0,65084	3
CT	2C	CT	CT	9	0,0	0,46024	1
CT	2C	CT	CT	9	180,0	1,21336	2
CT	2C	CT	CT	9	0,0	0,54392	3
2C	CT	CT	HC	9	0,0	0,33472	3
H1	2C	CT	CT	9	0,0	0,65084	3
H1	CT	CT	HC	9	0,0	0,65084	3
CT	PY	NF	CF	9	0,0	6,02496	1
CT	PY	NF	CF	9	0,0	2,55224	3
N4	CF	N4	CT	9	180,0	1,25520	2
N4	CT	CT	HC	9	0,0	0,41840	3
CZ	Cl	CZ	F	4	180,0	4,60240	2
OS	CZ	H1	CZ	4	180,0	4,60240	2
OS	CZ	CZ	H1	4	180,0	4,60240	2
Cl	F	CZ	CZ	4	180,0	4,60240	2
N4	N4	CF	NF	4	180,0	4,60240	2

Tabulka 3.4: Nově definované parametry vazeb [dihedraltypes]

i, j, k, l – atomy; func – ozn. fce; ph – fáze; kd – sil. konst.; mult – násobnost fce

[SX0]; Ser-A230

<u>ATOMS</u>	<u>TYPES</u>	<u>CHARGES</u>		<u>BONDS</u>	<u>IMPROPERS</u>				
N	N	-0.621888	1	N	H	-C	CA	N	H
H	H	0.295486	2	N	CA	CA	+N	C	O
CA	CX	0.091010	3	CA	HA	OP3	H31	C3	C4
HA	H1	0.153343	4	CA	CB	CL2	F	C4	C3
C	C	0.505495	5	CA	C				
O	O	-0.555338	6	CB	HB1				
CB	2C	-0.086937	7	CB	HB2				
HB1	H1	0.143858	8	CB	OG				
HB2	H1	0.143858	9	OG	P				
OG	OS	-0.276236	10	P	OP1				
P	P	0.823670	11	P	OP2				
OP1	O2	-0.563697	12	OP2	C1				
OP2	OS	-0.359143	13	C1	H11				
C1	CT	0.310692	14	C1	H12				
H11	H1	0.017294	15	C1	C2				
H12	H1	0.017294	16	C2	H21				
C2	CT	-0.100994	17	C2	H22				
H21	H1	0.121344	18	C2	CL1				
H22	H1	0.121344	19	P	OP3				
CL1	Cl	-0.192977	20	OP3	C3				
OP3	OS	-0.309091	21	C3	H31				
C3	CZ	0.055662	22	C3	C4				
H31	H1	0.139835	23	C4	CL2				
C4	CZ	0.103890	24	C4	F				
CL2	Cl	-0.047324	25	C	O				
F	F	-0.087659	26	-C	N				

Tabulka 3.5: Struktura aduktu serinu a A230

[SX2]; Ser-A232

<u>ATOMS</u>	<u>TYPES</u>	<u>CHARGES</u>		<u>BONDS</u>	<u>IMPROPERS</u>				
N	N	-0.313047	1	N	H	-C	CA	N	H
H	H	0.263077	2	N	CA	CA	+N	C	O
CA	CX	0.091383	3	CA	HA	OP3	H31	C3	C4
HA	H1	0.108091	4	CA	CB	CL2	F	C4	C3
C	C	0.358766	5	CA	C				
O	O	-0.520847	6	CB	HB1				
CB	2C	-0.144048	7	CB	HB2				
HB1	H1	0.166079	8	CB	OG				
HB2	H1	0.166079	9	OG	P				
OG	OS	-0.304228	10	P	OP1				
P	P	0.935816	11	P	OP2				
OP1	O2	-0.613050	12	OP2	C1				
OP2	OS	-0.349164	13	C1	H11				
C1	CT	0.160460	14	C1	C11				
H11	H1	0.125128	15	C11	HC1				
C11	CT	-0.163343	16	C11	HC2				
HC1	HC	0.074618	17	C11	HC3				
HC2	HC	0.074618	18	C1	C2				
HC3	HC	0.074618	19	C2	H21				
C2	CT	-0.306806	20	C2	H22				
H21	H1	0.182247	21	C2	CL1				
H22	H1	0.182247	22	P	OP3				
CL1	Cl	-0.147834	23	OP3	C3				
OP3	OS	-0.329907	24	C3	H31				
C3	CZ	0.047774	25	C3	C4				
H31	H1	0.168267	26	C4	CL2				
C4	CZ	0.125645	27	C4	F				
CL2	Cl	-0.032192	28	C	O				
F	F	-0.133512	29	-C	N				

Tabulka 3.6: Struktura aduktu serinu a A232

[SX4]; Ser-A234

<u>ATOMS</u>	<u>TYPES</u>	<u>CHARGES</u>		<u>BONDS</u>	<u>IMPROPERS</u>				
N	N	-0.510081	1	N	H	-C	CA	N	H
H	H	0.309891	2	N	CA	CA	+N	C	O
CA	CX	0.082009	3	CA	HA	OP3	H31	C3	C4
HA	H1	0.067923	4	CA	CB	CL2	F	C4	C3
C	C	0.533206	5	CA	C				
O	O	-0.511090	6	CB	HB1				
CB	2C	-0.009201	7	CB	HB2				
HB1	H1	0.108480	8	CB	OG				
HB2	H1	0.108480	9	OG	P				
OG	OS	-0.341509	10	P	OP1				
P	P	0.966890	11	P	OP2				
OP1	O2	-0.614173	12	OP2	C1				
OP2	OS	-0.345470	13	C1	H11				
C1	CT	0.122122	14	C1	C11				
H11	H1	0.082920	15	C11	HC1				
C11	CT	-0.175170	16	C11	HC2				
HC1	HC	0.077484	17	C11	HC3				
HC2	HC	0.077484	18	C1	C2				
HC3	HC	0.077484	19	C2	H21				
C2	CT	-0.026673	20	C2	CL1				
H21	H1	0.142861	21	C2	C22				
CL1	Cl	-0.198490	22	C22	HD1				
C22	CT	-0.111475	23	C22	HD2				
HD1	HC	0.055828	24	C22	HD3				
HD2	HC	0.055828	25	P	OP3				
HD3	HC	0.055828	26	OP3	C3				
OP3	OS	-0.275050	27	C3	H31				
C3	CZ	0.000912	28	C3	C4				
H31	H1	0.153117	29	C4	CL2				
C4	CZ	0.123042	30	C4	F				
CL2	Cl	-0.053567	31	C	O				
F	F	-0.109621	32	-C	N				

Tabulka 3.7: Struktura aduktu serinu a A234

[SN4]; Ser-A242

<u>ATOMS</u>				<u>TYPES</u>		<u>CHARGES</u>		<u>BONDS</u>		<u>IMPROPERS</u>			
N	N	-0.480733	1	N	H	-C	CA	N	H				
H	H	0.263435	2	N	CA	CA	+N	C	O				
CA	CX	-0.013098	3	CA	HA	NC1	NC2	CN	NP				
HA	H1	0.153075	4	CA	CB	P	NP	CN	NC1				
C	C	0.493438	5	CA	C								
O	O	-0.532849	6	CB	HB1								
CB	2C	-0.172077	7	CB	HB2								
HB1	H1	0.177760	8	CB	OG								
HB2	H1	0.177760	9	OG	P								
OG	OS	-0.377665	10	P	OP								
P	PY	0.788218	11	P	CP								
OP	O2	-0.696416	12	CP	HP1								
CP	CT	-0.073882	13	CP	HP2								
HP1	HC	0.018192	14	CP	HP3								
HP2	HC	0.018192	15	P	NP								
HP3	HC	0.018192	16	NP	CN								
NP	NF	-0.469774	17	CN	NC1								
CN	CF	0.172827	18	NC1	C1								
NC1	N4	-0.055018	19	C1	H11								
C1	CT	-0.073227	20	C1	H12								
H11	H1	0.072881	21	C1	C2								
H12	H1	0.072881	22	C2	H21								
C2	CT	-0.051155	23	C2	H22								
H21	HC	0.024743	24	C2	H23								
H22	HC	0.024743	25	NC1	C3								
H23	HC	0.024743	26	C3	H31								
C3	CT	-0.073227	27	C3	H32								
H31	H1	0.072881	28	C3	C4								
H32	H1	0.072881	29	C4	H41								
C4	CT	-0.051155	30	C4	H42								
H41	HC	0.024743	31	C4	H43								
H42	HC	0.024743	32	CN	NC2								
H43	HC	0.024743	33	NC2	C5								
NC2	N4	-0.055018	34	C5	H51								
C5	CT	-0.073227	35	C5	H52								
H51	H1	0.072881	36	C5	C6								
H52	H1	0.072881	37	C6	C61								
C6	CT	-0.051155	38	C6	C62								
H61	HC	0.024743	39	C6	C63								
H62	HC	0.024743	40	NC2	C7								
H63	HC	0.024743	41	C7	H71								
C7	CT	-0.073227	42	C7	H72								
H71	H1	0.072881	43	C7	C8								
H72	H1	0.072881	44	C8	H81								
C8	CT	-0.051155	45	C8	H82								
H81	HC	0.024743	46	C8	H83								
H82	HC	0.024743	47	C	O								
H83	HC	0.024743	48	-C	N								

Tabulka 3.8: Struktura aduktu serinu a A242

[SN6]; Ser-A262

ATOMS	TYPES	CHARGES		BONDS		IMPROPERS			
N	N	-0.422298	1	N	H	-C	CA	N	H
H	H	0.240928	2	N	CA	CA	+N	C	O
CA	CX	-0.027936	3	CA	HA	NC1	NC2	CN	NP
HA	H1	0.162109	4	CA	CB	P	NP	CN	NC1
C	C	0.430998	5	CA	C				
O	O	-0.534170	6	CB	HB1				
CB	2C	0.169532	7	CB	HB2				
HB1	H1	0.014185	8	CB	OG				
HB2	H1	0.014185	9	OG	P				
OG	OS	-0.229975	10	P	OP1				
P	PY	0.755287	11	P	OP2				
OP1	O2	-0.633472	12	OP2	CO				
OP2	OS	-0.330481	13	CO	HO1				
CO	CT	-0.009154	14	CO	HO2				
HO1	H1	0.084927	15	CO	HO2				
HO2	H1	0.084927	16	P	NP				
HO3	H1	0.084927	17	NP	CN				
NP	NF	-0.519998	18	CN	NC1				
CN	CF	0.322346	19	NC1	C1				
NC1	N4	-0.067340	20	C1	H11				
C1	CT	-0.029622	21	C1	H12				
H11	H1	0.061405	22	C1	C2				
H12	H1	0.061405	23	C2	H21				
C2	CT	-0.039652	24	C2	H22				
H21	HC	0.013476	25	C2	H23				
H22	HC	0.013476	26	NC1	C3				
H23	HC	0.013476	27	C3	H31				
C3	CT	-0.029622	28	C3	H32				
H31	H1	0.061405	29	C3	C4				
H32	H1	0.061405	30	C4	H41				
C4	CT	-0.039652	31	C4	H42				
H41	HC	0.013476	32	C4	H43				
H42	HC	0.013476	33	CN	NC2				
H43	HC	0.013476	34	NC2	C5				
NC2	N4	-0.067340	35	C5	H51				
C5	CT	-0.029622	36	C5	H52				
H51	H1	0.061405	37	C5	C6				
H52	H1	0.061405	38	C6	C61				
C6	CT	-0.039652	39	C6	C62				
H61	HC	0.013476	40	C6	C63				
H62	HC	0.013476	41	NC2	C7				
H63	HC	0.013476	42	C7	H71				
C7	CT	-0.029622	43	C7	H72				
H71	H1	0.061405	44	C7	C8				
H72	H1	0.061405	45	C8	H81				
C8	CT	-0.039652	46	C8	H82				
H81	HC	0.013476	47	C8	H83				
H82	HC	0.013476	48	C	O				
H83	HC	0.013476	49	-C	N				

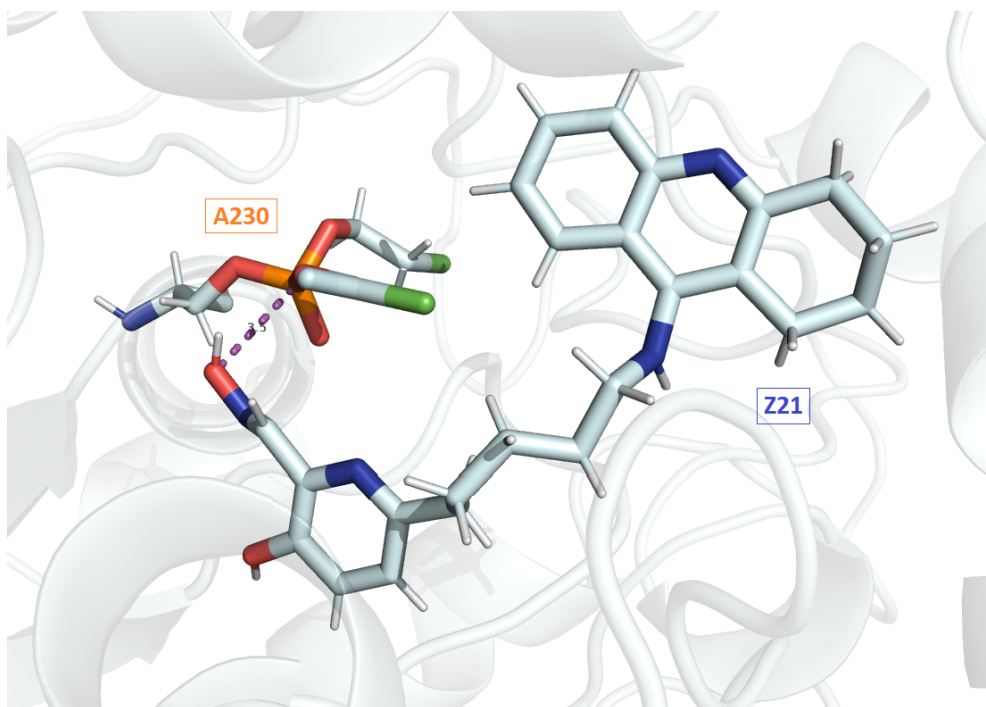
Tabulka 3.9: Struktura aduktu serinu a A262

3.2 Molekulové dokování

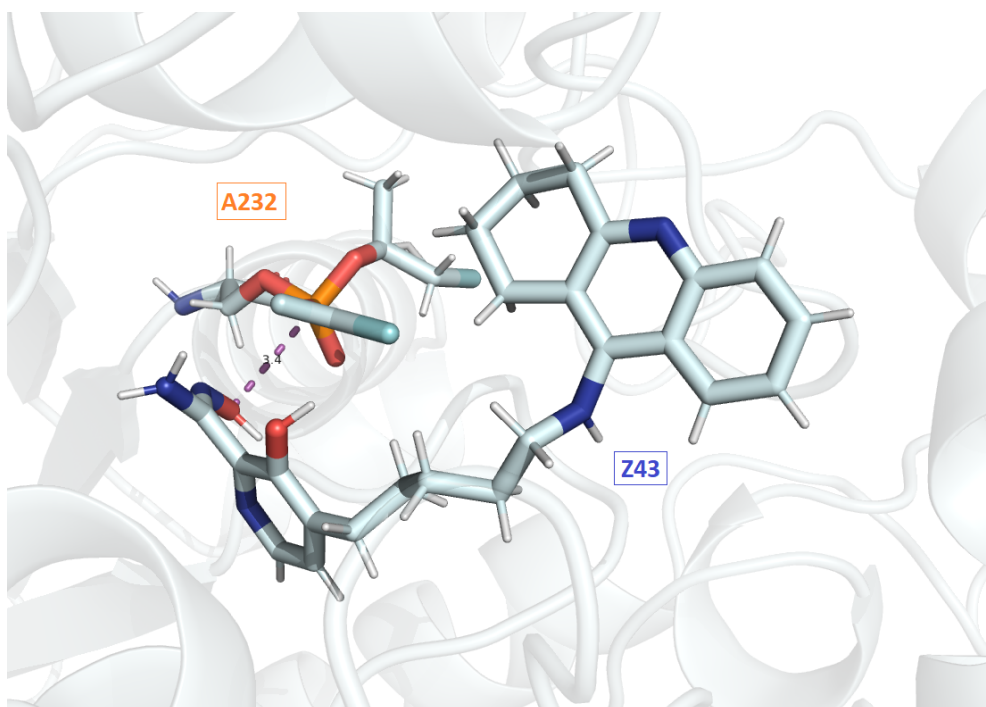
V tabulce 3.10 je zobrazeno 32 vybraných ligandů vč. vzdáleností oximové skupiny ligandu k novičoku (resp. kyslíku oximové skupiny k fosforu novičoku) jejich nejlepších póz. Dokované pózy jsou znázorněné na obr. 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 a 3.5.

Ligandy	A230	A232	A234	A242	A262
HI6	6,7	6,5	6,6	9,7	9,8
PRA	3,8	3,6	6,1	7,1	7,2
OBI	7,8	7,3	5,7	8,7	7,8
TRI	4,3	3,9	5,7	7,5	8,8
MET	3,7	3,7	7,5	8,8	7,9
K203	4,0	4,1	5,5	7,7	8,7
Z03	5,8	3,6	6,0	7,4	8,8
Z05	5,8	6,3	6,1	7,0	7,3
Z07	6,9	4,4	5,8	7,0	7,1
Z12	8,2	8,3	7,3	10,2	8,3
Z14	5,6	7,3	5,8	7,1	7,3
Z15	9,3	9,4	5,9	7,2	8,4
Z16	7,7	3,6	7,4	8,0	8,6
Z18	3,4	5,8	7,2	10,2	8,5
Z19	3,7	3,7	6,6	9,5	9,4
Z20	5,5	6,7	6,6	7,1	7,1
Z21	3,5	3,7	7,3	9,5	8,0
Z22	3,6	4,4	7,5	7,3	7,2
Z23	3,6	5,9	6,1	7,0	7,2
Z24	8,5	3,7	5,4	8,6	7,1
Z25	3,5	3,5	12,3	7,5	10,7
Z27	7,7	5,9	5,7	8,2	8,5
Z30	6,4	6,1	12,5	7,4	10,7
Z31	3,7	3,8	7,1	6,9	7,1
Z32	8,7	8,1	7,0	8,7	7,3
Z37	6,3	6,0	10,0	7,3	9,4
Z38	8,5	5,0	7,9	7,2	8,2
Z39	3,5	4,3	7,0	7,4	7,2
Z43	4,2	3,4	7,5	7,4	7,9
Z46	8,9	7,5	9,5	7,1	7,2
Z52	4,0	3,9	5,5	7,5	8,2
Z53	4,0	3,9	5,4	7,7	7,9

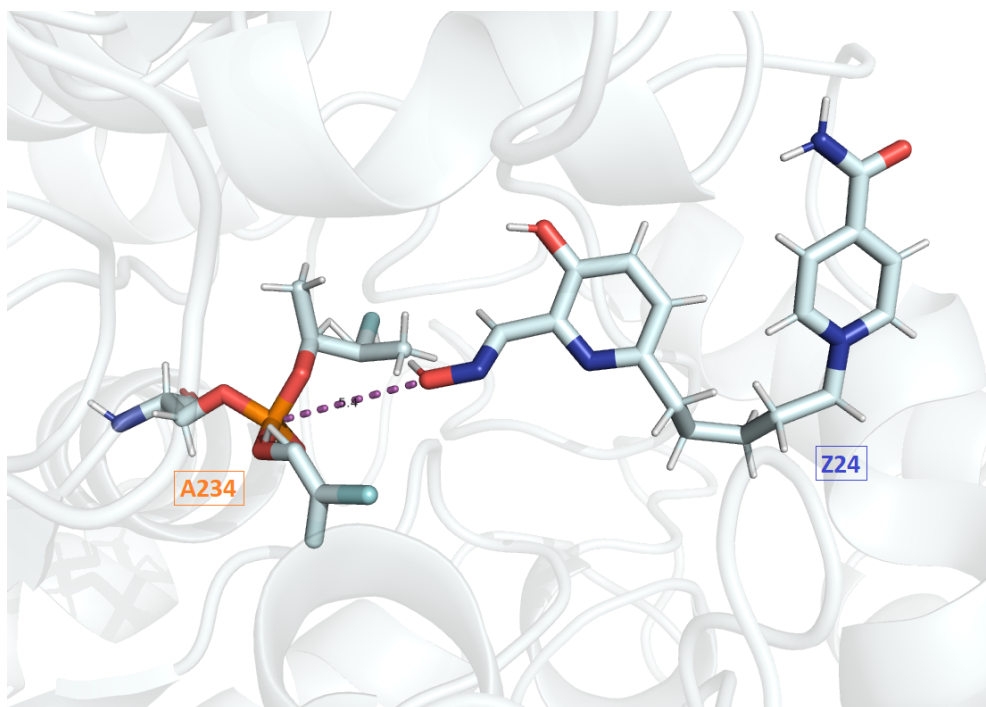
Tabulka 3.10: Výsledky dokování; hodnoty zobrazují vzdálenost [Å] kyslíku oximové skupiny ligandu k fosforu novičoku; nejkratší vzdálenosti zvýrazněné **tučně**; struktury ligandů viz obr. 2.1, 2.2 a 2.3



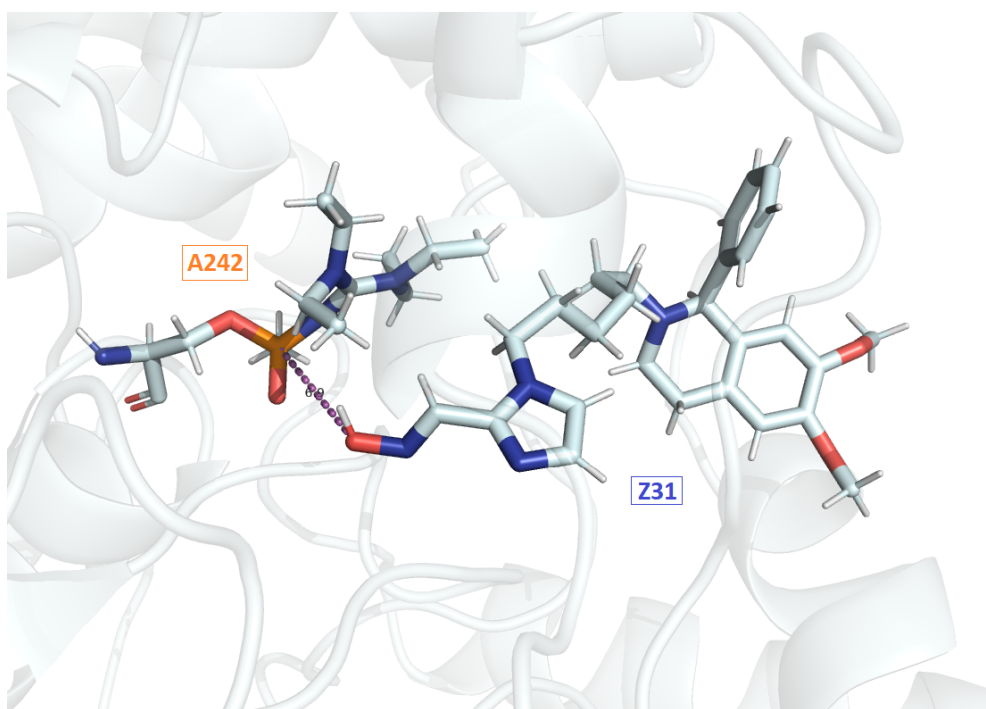
Obrázek 3.1: AChE-A230-Z21; nejlepší póza ligandu **Z21**; vzdálenost 3,5 Å – znázorněna fialovou čárkovanou čarou



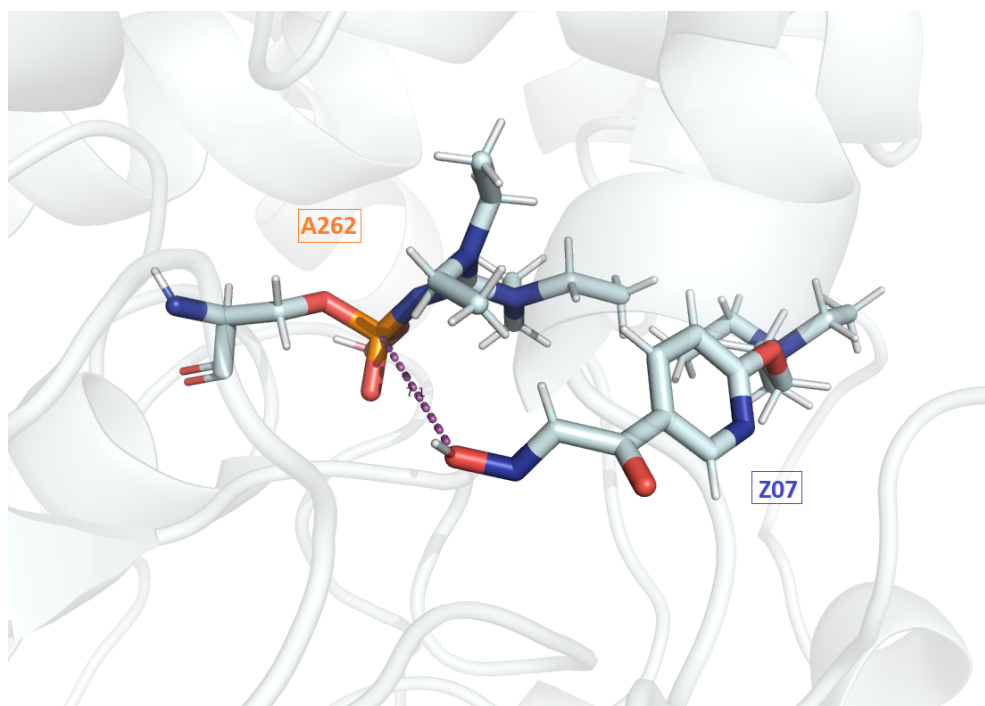
Obrázek 3.2: AChE-A232-Z43; nejlepší póza ligandu **Z43**; vzdálenost 3,4 Å – znázorněna fialovou čárkovanou čarou



Obrázek 3.3: AChE-A234-Z24; nejlepší póza ligandu **Z24**; vzdálenost 5,4 Å – znázorněna fialovou čárkovanou čarou



Obrázek 3.4: AChE-A242-Z31; nejlepší póza ligandu **Z31**; vzdálenost 6,9 Å – znázorněna fialovou čárkovanou čarou

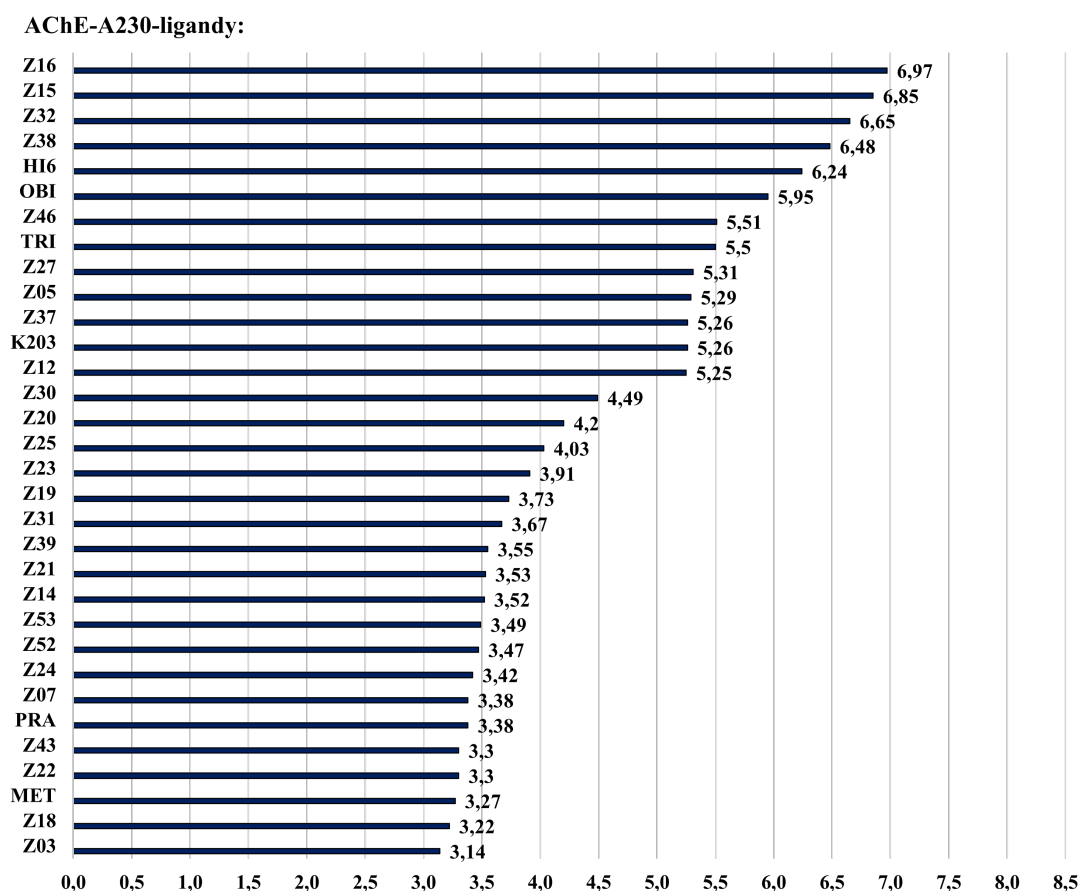


Obrázek 3.5: AChE-A262-Z07; nejlepší póza ligandu **Z07**; vzdálenost 7,1 Å – znázorněna fialovou čárkovanou čarou

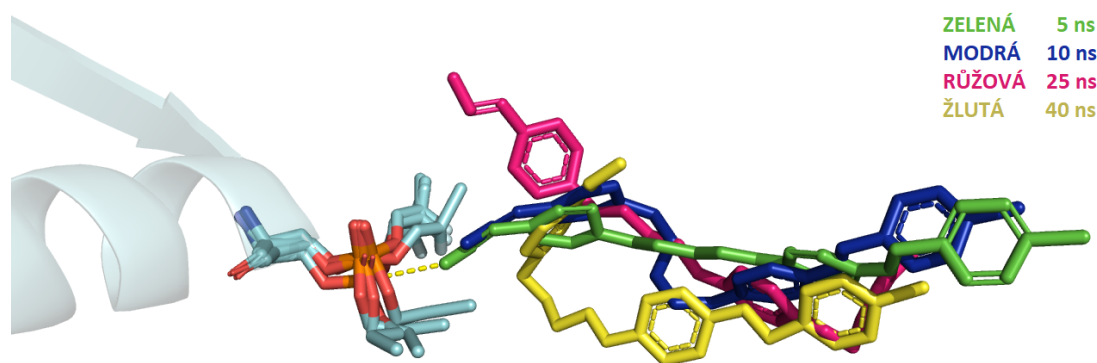
3.3 Molekulová dynamika

Výsledky molekulové dynamiky jsou zobrazeny na grafech (obr. 3.6, 3.8, 3.10, 3.12 a 3.14), které zobrazují vzdálenost (kyslíku oximové skupiny ligandu k fosforu novičku) takové konformace, při které se ligand v průběhu simulace dostal nejbližší k novičku. Na obr. 3.7, 3.9, 3.11, 3.13 a 3.15 je zobrazena změna konformace vybraných ligandů v receptorech v průběhu simulace.

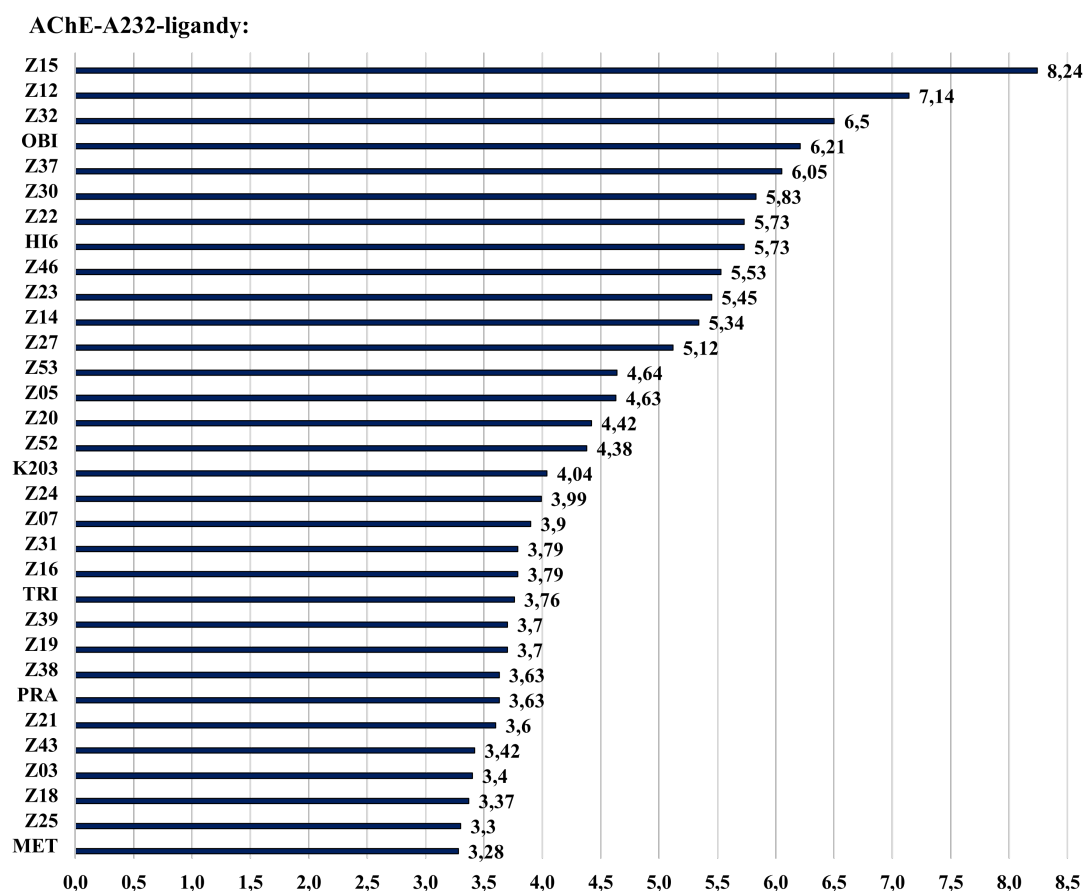
Dalším výstupem je predikce afinity ligandu v proteinu, která se rovná součtu průměrů coulombických sil všech konformací v čase a Lennard-Jonesova potenciálu všech konformací v čase. Výsledné hodnoty jsou v tabulkách 3.11, 3.12 a 3.13.



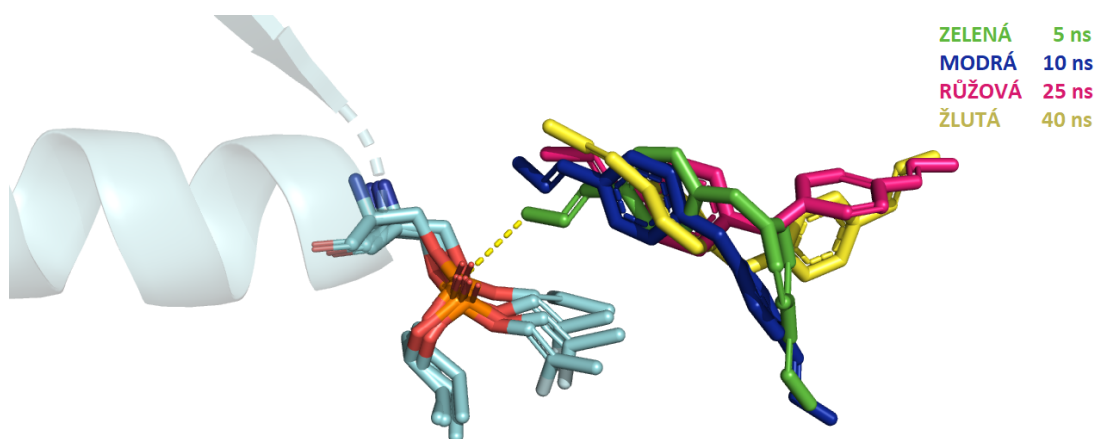
Obrázek 3.6: Výsledek MD; nejkratší možné vzdálenosti [Å] mezi oximovou skupinou ligandů a novičkem **A230**; struktury ligandů viz obr. 2.1, 2.2 a 2.3



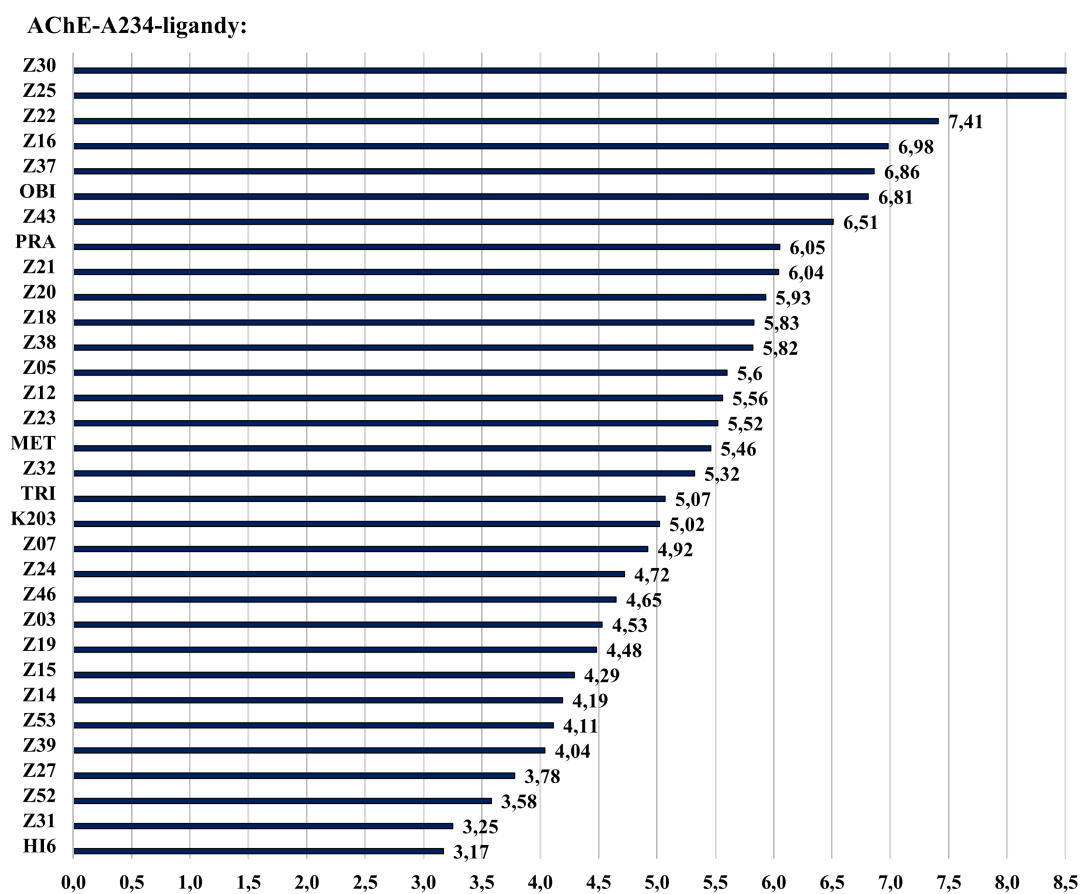
Obrázek 3.7: Snímky z MD simulace: AChE-A230-Z03; konformační změny ligandu **Z03**, v průběhu simulace (přibližně od 25 ns) se oximová skupina vzdaluje od fosforu novičku



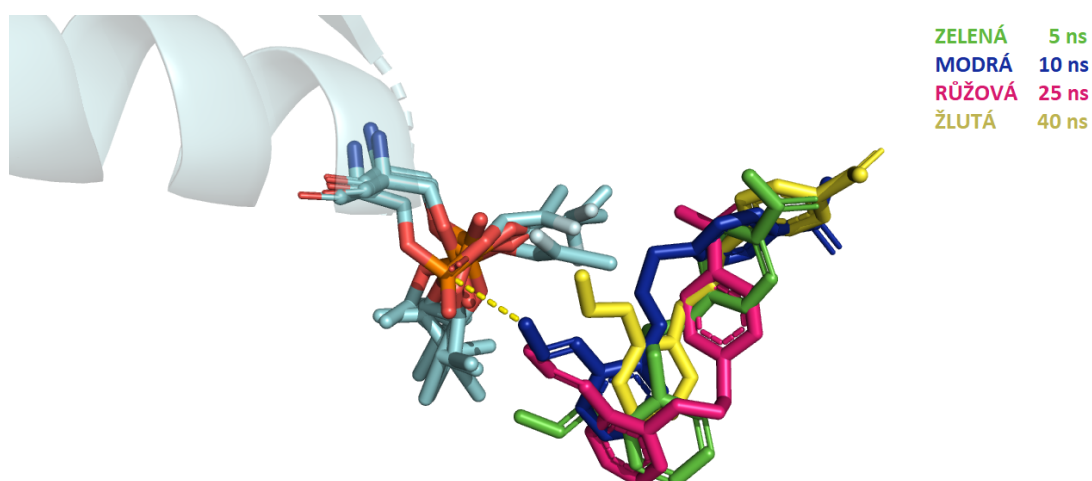
Obrázek 3.8: Výsledek MD; nejkratší možné vzdálenosti [Å] mezi oximovou skupinou ligandů a novičkem **A232**; struktury ligandů viz obr. 2.1, 2.2 a 2.3



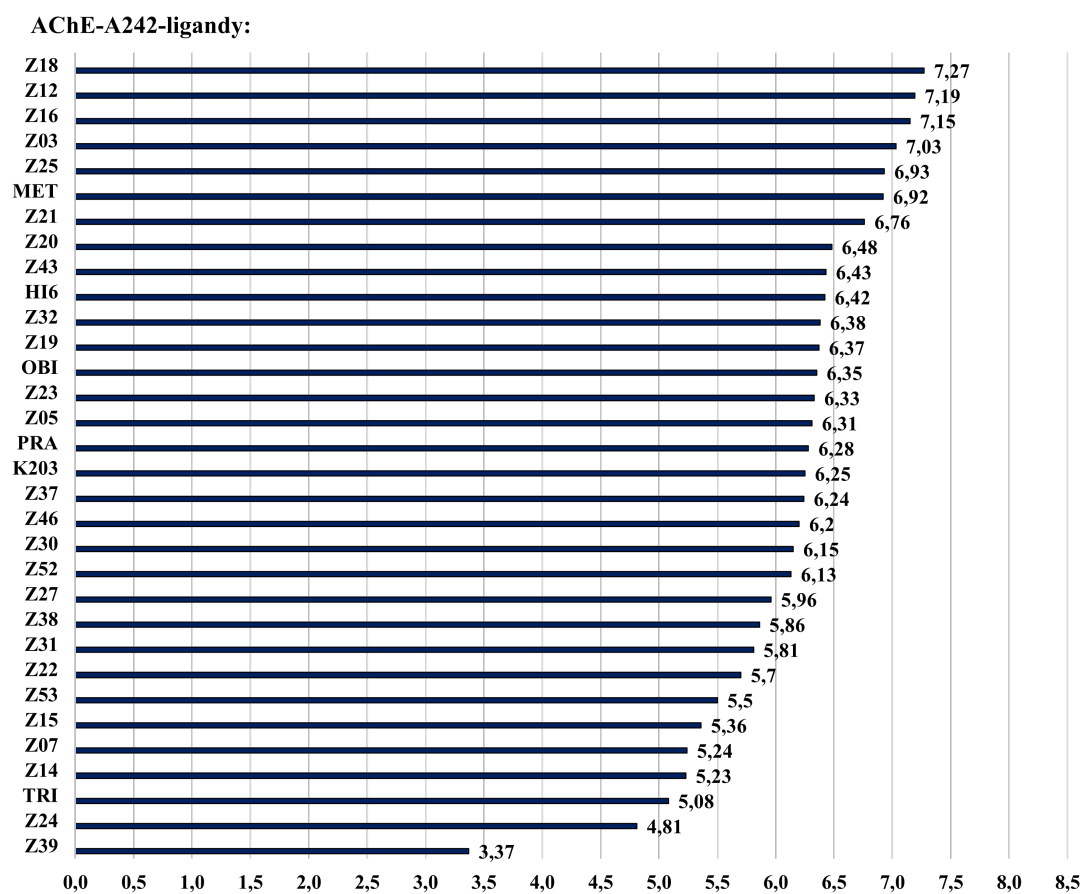
Obrázek 3.9: Snímky z MD simulace: AChE-A232-MET; konformační změny ligandu **MET**, v průběhu simulace se oximová skupina nikterak významně nevzdaluje od fosforu novičku



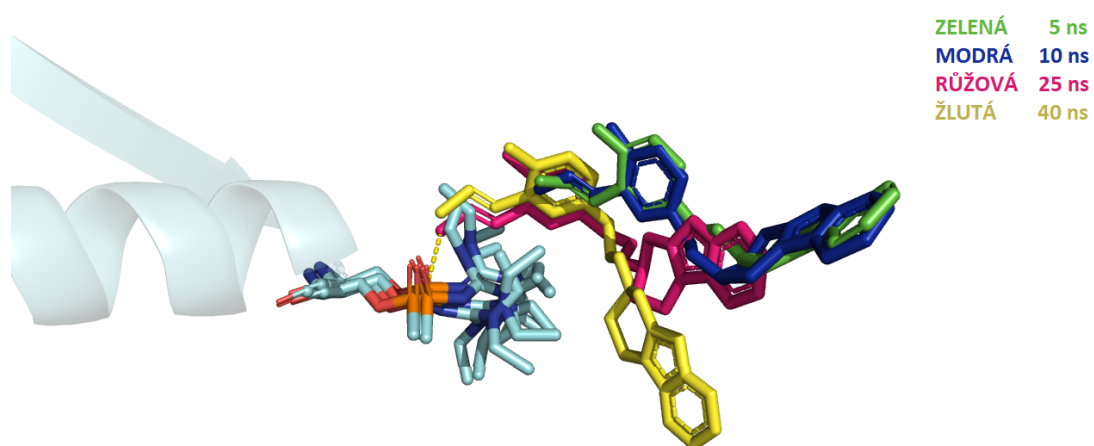
Obrázek 3.10: Výsledek MD; nejkratší možné vzdálenosti [Å] mezi oximovou skupinou ligandů a novičkem **A234**; struktury ligandů viz obr. 2.1, 2.2 a 2.3



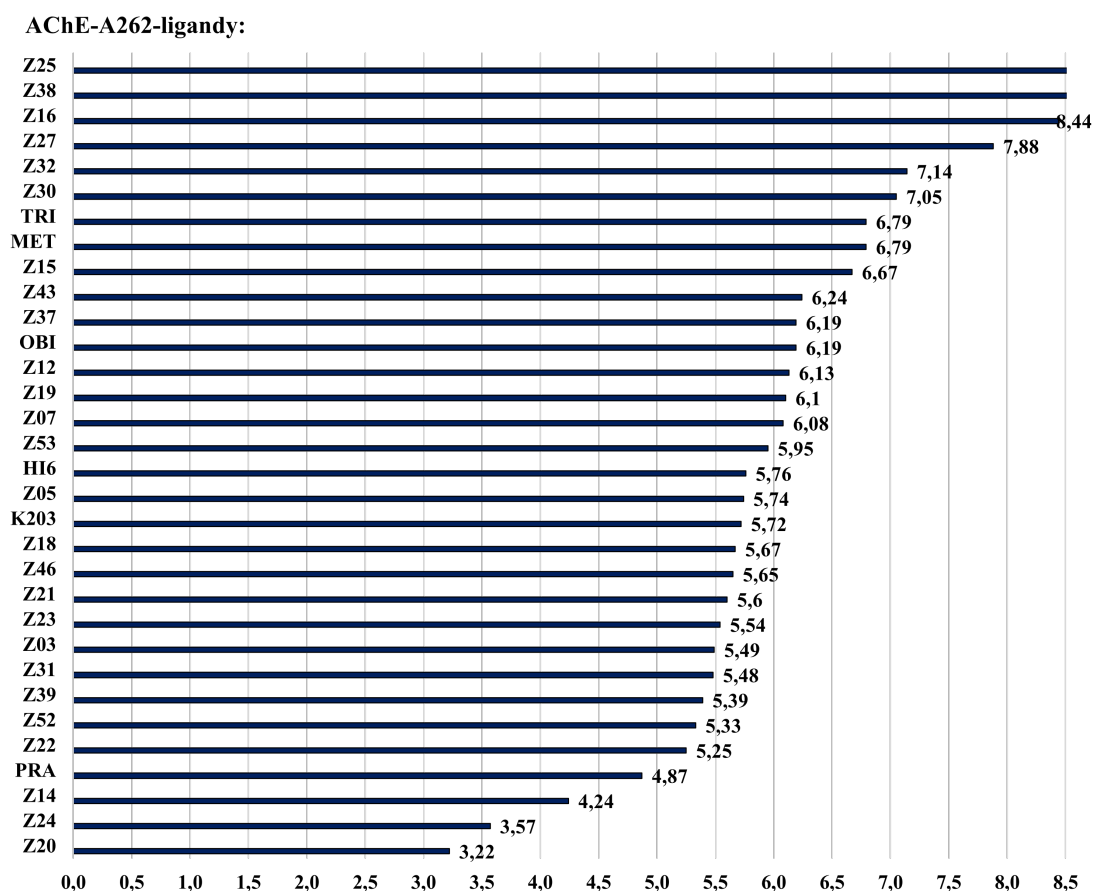
Obrázek 3.11: Snímky z MD simulace: AChE-A234-HI6; konformační změny ligandu **HI6**, v průběhu simulace se oximová skupina nikterak významně nevzdaluje od fosforu novičoku



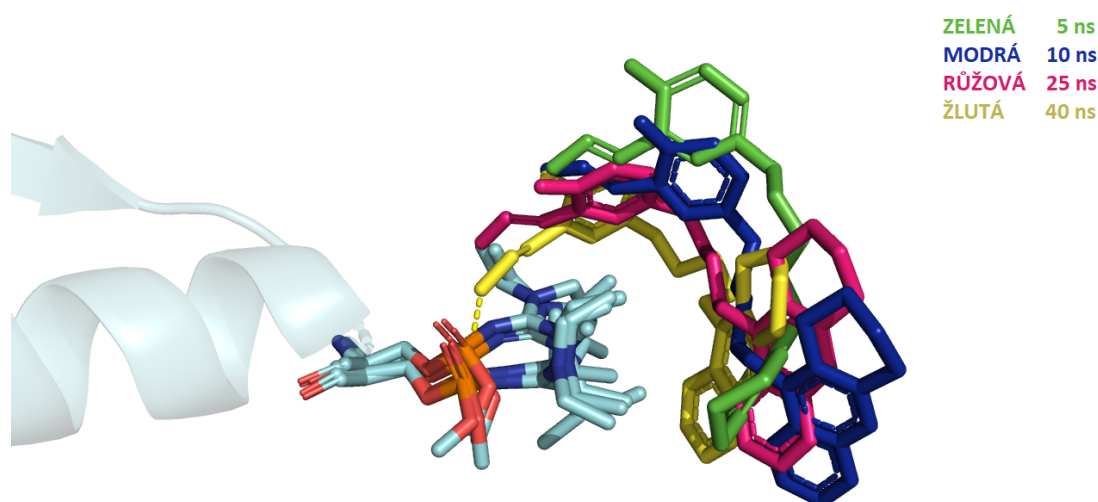
Obrázek 3.12: Výsledek MD; nejkratší možné vzdálenosti [Å] mezi oximovou skupinou ligandů a novičkem **A242**; struktury ligandů viz obr. 2.1, 2.2 a 2.3



Obrázek 3.13: Snímky z MD simulace: AChE-A242-Z39; konformační změny ligandu **Z39**, v průběhu simulace (přibližně od 25 ns) se oximová skupina přibližuje k fosforu novičku



Obrázek 3.14: Výsledek MD; nejkratší možné vzdálenosti [Å] mezi oximovou skupinou ligandů a novičkem **A262**; struktury ligandů viz obr. 2.1, 2.2 a 2.3



Obrázek 3.15: Snímky z MD simulace: AChE-A262-Z20; konformační změny ligandu **Z20**, v průběhu simulace (přibližně od 25 ns) se oximová skupina přibližuje k fosforu novičku

Ligandy	Afinita	A230	A232	A234	A242	A262
HI6	∅ Coul-SR	-113,76	-114,07	-47,67	-73,22	-35,34
	∅ LJ-SR	-144,43	-130,07	-125,48	-148,07	-145,73
	Total	-258,19	-244,14	-173,15	-221,29	-181,07
PRA	∅ Coul-SR	-4,24	-7,46	-6,19	-8,32	-6,88
	∅ LJ-SR	-46,60	-52,96	-72,83	-60,79	-79,25
	Total	-50,84	-60,42	-79,02	-69,11	-86,13
OBI	∅ Coul-SR	-44,76	-102,38	-38,62	-104,44	-91,79
	∅ LJ-SR	-109,22	-135,55	-99,17	-117,46	-136,81
	Total	-153,98	-237,93	-137,79	-221,90	-228,60
TRI	∅ Coul-SR	-100,99	-134,90	-43,06	-50,06	-107,56
	∅ LJ-SR	-126,62	-126,20	-116,19	-149,42	-139,25
	Total	-227,61	-261,10	-159,25	-199,48	-246,81
MET	∅ Coul-SR	-108,58	-104,82	-100,68	-111,33	-54,01
	∅ LJ-SR	-105,79	-116,83	-124,15	-106,32	-137,69
	Total	-214,37	-221,65	-224,83	-217,65	-191,70
K203	∅ Coul-SR	-44,82	-104,07	-34,73	-52,68	-41,70
	∅ LJ-SR	-144,73	-131,86	-100,04	-160,26	-145,76
	Total	-189,55	-235,93	-134,77	-212,94	-187,46
Z03	∅ Coul-SR	-10,49	-26,29	-22,42	-28,24	-19,25
	∅ LJ-SR	-163,94	-208,60	-170,63	-241,73	-210,77
	Total	-174,43	-234,89	-193,05	-269,97	-230,02
Z05	∅ Coul-SR	-49,21	-50,07	-50,04	-32,38	-32,51
	∅ LJ-SR	-170,88	-157,26	-122,48	-153,11	-177,24
	Total	-220,09	-207,33	-172,52	-185,49	-209,75
Z07	∅ Coul-SR	-138,73	-136,21	-76,49	-49,36	-59,20
	∅ LJ-SR	-126,96	-120,91	-120,24	-145,24	-154,07
	Total	-265,69	-257,12	-196,73	-194,60	-213,27
Z12	∅ Coul-SR	-86,44	-76,88	-28,57	-44,22	-45,65
	∅ LJ-SR	-136,92	-123,40	-139,32	-157,13	-159,15
	Total	-223,36	-200,28	-167,89	-201,35	-204,80
Z14	∅ Coul-SR	-85,22	-40,86	-44,19	-33,29	-25,33
	∅ LJ-SR	-171,09	-142,77	-146,07	-155,24	-182,04
	Total	-256,31	-183,63	-190,26	-188,53	-207,37
Z15	∅ Coul-SR	-28,62	-72,47	-40,87	-26,24	-69,41
	∅ LJ-SR	-121,42	-106,93	-116,86	-152,65	-110,24
	Total	-150,04	-179,40	-157,73	-178,89	-179,65

Tabulka 3.11: Výsledná afinita ligandů v receptorech (1. část)

Coul-SR – Coulombic short-range [$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$]; LJ-SR – Lennard-Jones short-range [$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$]; Total [$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$] – suma Coul-SR a LJ-SR; struktury ligandů viz obr. 2.1, 2.2 a 2.3

Ligandy	Afinita	A230	A232	A234	A242	A262
Z16	∅ Coul-SR	-59,06	-122,94	-112,23	-125,31	-76,91
	∅ LJ-SR	-121,48	-153,86	-97,98	-83,85	-108,81
	Total	-180,54	-276,80	-210,21	-209,16	-185,72
Z18	∅ Coul-SR	-138,17	-82,08	-15,86	-11,83	-23,03
	∅ LJ-SR	-102,58	-115,38	-96,88	-104,45	-82,24
	Total	-240,75	-197,46	-112,74	-116,28	-107,27
Z19	∅ Coul-SR	-47,84	-27,96	-51,91	-38,07	-78,64
	∅ LJ-SR	-196,39	-199,63	-157,73	-130,89	-191,46
	Total	-244,23	-227,59	-209,64	-168,96	-270,10
Z20	∅ Coul-SR	-55,53	-56,40	-30,12	-95,46	-29,71
	∅ LJ-SR	-189,60	-190,53	-183,30	-197,99	-187,75
	Total	-245,13	-246,93	-213,42	-293,45	-217,46
Z21	∅ Coul-SR	-90,68	-102,70	-86,85	-38,91	-64,49
	∅ LJ-SR	-201,12	-192,78	-116,50	-155,20	-177,10
	Total	-291,80	-295,48	-203,35	-194,11	-241,59
Z22	∅ Coul-SR	-18,49	-23,50	-12,13	-20,59	-16,43
	∅ LJ-SR	-181,14	-217,21	-183,92	-194,82	-217,80
	Total	-199,63	-240,71	-196,05	-215,41	-234,23
Z23	∅ Coul-SR	-13,25	-14,69	-13,76	-18,80	-22,10
	∅ LJ-SR	-182,75	-199,76	-159,75	-193,75	-195,29
	Total	-196,00	-214,45	-173,51	-212,55	-217,39
Z24	∅ Coul-SR	-11,59	-10,20	-12,39	-35,36	-33,26
	∅ LJ-SR	-171,34	-171,33	-141,92	-152,33	-187,32
	Total	-182,93	-181,53	-154,31	-187,69	-220,58
Z25	∅ Coul-SR	-138,17	-122,73	-90,42	-48,07	-88,01
	∅ LJ-SR	-172,63	-179,21	-140,10	-179,90	-157,09
	Total	-310,80	-301,94	-230,52	-227,97	-245,10
Z27	∅ Coul-SR	-40,54	-46,03	-26,67	-31,50	-44,90
	∅ LJ-SR	-105,29	-132,14	-119,20	-119,63	-125,05
	Total	-145,83	-178,17	-145,87	-151,13	-169,95
Z30	∅ Coul-SR	-44,96	-35,82	-91,55	-39,65	-52,23
	∅ LJ-SR	-205,94	-217,44	-171,80	-136,08	-162,60
	Total	-250,90	-253,26	-263,35	-175,73	-214,83
Z31	∅ Coul-SR	-28,95	-32,59	-35,98	-47,85	-36,49
	∅ LJ-SR	-191,13	-182,41	-209,88	-229,91	-195,39
	Total	-220,08	-215,00	-245,86	-277,76	-231,88

Tabulka 3.12: Výsledná afinita ligandů v receptorech (2. část)

Coul-SR – Coulombic short-range [$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$]; LJ-SR – Lennard-Jones short-range [$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$]; Total [$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$] – suma Coul-SR a LJ-SR; struktury ligandů viz obr. 2.1, 2.2 a 2.3

Ligandy	Afinita	A230	A232	A234	A242	A262
Z32	∅ Coul-SR	-35,76	-81,19	-86,75	-45,88	-74,60
	∅ LJ-SR	-158,37	-166,87	-166,68	-206,79	-172,44
	Total	-194,13	-248,06	-253,43	-252,67	-247,04
Z37	∅ Coul-SR	-72,58	-51,26	-68,26	-61,03	-56,68
	∅ LJ-SR	-183,53	-214,57	-117,53	-226,50	-133,45
	Total	-256,11	-265,83	-185,79	-287,53	-190,13
Z38	∅ Coul-SR	-46,80	-57,43	-81,70	-71,50	-35,74
	∅ LJ-SR	-186,56	-209,49	-219,74	-190,45	-157,98
	Total	-233,36	-266,92	-301,44	-261,95	-193,72
Z39	∅ Coul-SR	-121,38	-126,47	-52,03	-68,73	-43,22
	∅ LJ-SR	-164,14	-185,96	-127,73	-150,40	-143,21
	Total	-285,52	-312,43	-179,76	-219,13	-186,43
Z43	∅ Coul-SR	-98,83	-67,34	-50,34	-40,83	-32,44
	∅ LJ-SR	-197,76	-200,97	-183,56	-183,01	-219,19
	Total	-269,59	-268,31	-233,90	-223,84	-251,63
Z46	∅ Coul-SR	-19,85	-39,59	-15,01	-24,36	-29,38
	∅ LJ-SR	-228,46	-227,51	-202,51	-225,23	-243,25
	Total	-248,31	-267,10	-217,52	-249,59	-272,63
Z52	∅ Coul-SR	-36,12	-26,64	-18,11	-25,25	-12,05
	∅ LJ-SR	-159,39	-158,29	-127,10	-164,02	-106,50
	Total	-195,51	-184,93	-145,21	-189,27	-118,55
Z53	∅ Coul-SR	-25,96	-28,54	-10,22	-18,19	-20,19
	∅ LJ-SR	-138,90	-147,60	-134,98	-139,73	-145,64
	Total	-164,86	-176,14	-145,20	-157,92	-165,83

Tabulka 3.13: Výsledná afinita ligandů v receptorech (3. část)

Coul-SR – Coulombic short-range [$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$]; LJ-SR – Lennard-Jones short-range [$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$]; Total [$\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$] – suma Coul-SR a LJ-SR; struktury ligandů viz obr. 2.1, 2.2 a 2.3

4. Diskuze

4.1 Výběr a příprava reaktivátorů a proteinů

Tento oddíl popisuje metodiku uvedenou v oddílech 2.1 a 2.2.

Při běžném návrhu nových látek pomocí výpočetních metod se v prvním kroku využívají databáze, které obsahují velké množství různých struktur (příkladem je databáze ZINC LeadLike obsahující přes 6 milionů molekul) [55], kdy substrát musí přesně zapadnout do aktivního místa enzymu (na základě teorie zámku a klíče) a na jeho vazbě se podílejí neovazebné interakce. V našem případě je nezbytné, nikoli jen prostorové uspořádání (s vysokou afinitou) reaktivátoru v daném místě enzymu, ale i dostatečná nukleofilita molekuly, díky níž reaktivátor vytvoří vazbu s novičokem. Proto jsme nevybírali látky virtuálním screeningem databází, ale výběr byl zúžen na látky, které prokázaly určitou aktivitu vůči enzymům (AChE) inhibovaných staršími NPL.

Do této studie byly vybrány komerčně známé reaktivátory, které jsou již zavedené v praxi, ale také nové reaktivátory velmi rozdílných struktur, které jsou předmětem zájmu posledních let. V práci jsou zahrnuty bis-kvartérní, mono-kvartérní, ale i ne-kvartérní struktury. Všechny struktury obsahují oximovou skupinu s výjimkou struktur Z35 a Z36, které zde reprezentují novou třídu ne-oximových reaktivátorů. [56] Struktury reaktivátorů jsou zobrazeny na obr. 2.1, 2.2 a 2.3.

V době zahájení experimentální části práce (říjen 2019) nebyly dostupné téměř žádné studie, které by udávaly strukturu novičoku použitou při otravě S. Skripala a jeho dcery (otrava A. Navalného proběhla téměř až po roce zahájení studie). Proto bylo určeno pět různých nejvíce pravděpodobných struktur, které mohly být využity. Z vybraných molekul jsou tři struktury halogenované (A230, A232 a A234) a dvě struktury dusíkaté (A242 a A262), které jsou stericky náročnější. Struktury novičoků jsou zobrazeny na obr. 2.4.

Z RCSB-PDB jsme vybrali krystalickou strukturu lidské acetylcholinesterázy inhibovanou paraoxonem (jak již bylo zmíněno, v době studie nebyla žádná dostupná krystalická struktura AChE inhibované novičokem) v komplexu s HI6. Rozlišení struktury je 2,20 Å, R-value = 0,201, R-free = 0,240 a Ramachandran outliers = 0,1 %, tedy strukturu jsme ohodnotili jako kvalitní a vhodnou pro naše použití. Po modifikacích (popsané v metodice v oddíle 2.2) jsme měli připravené modely proteinů inhibovaných vybranými strukturami novičoků, a tím jsme splnili první z dílčích cílů.

4.2 Parametrizace

Tento oddíl popisuje metodiku uvedenou v oddíle 2.3 a výsledky uvedené v oddíle 3.1.

Software pro molekulovou dynamiku Gromacs využívá pro své výpočty různá silová pole. [44] My jsme se rozhodli pro využití silového pole ze sady AMBER (konkrétně Amber14SB), které je vhodné pro popis chování aminokyselin a proteinů. Je však jasné, že žádné silové pole nemůže obsahovat informace o parametrech všech látek. Proto jsme dané silové pole upravili pro naše potřeby.

Toto silové pole jsme doplnili o parametrizované hodnoty aduktů novičoků na serin. Tyto hodnoty byly vypočítané *ab initio* kvantově chemickou Hartreeho–Fockovou metodou (HF/6-31G*), kdy získané výsledky jsou vhodné k využití pro molekulovou dynamiku Gromacs.

Každému atomu aduktu byl přiřazen název a byl určen atomový typ (viz obr. 2.6 a obr. 2.7). Také bylo potřeba definovat nový atomový typ, který v silovém poli Amber14SB chyběl (nový typ v tabulce 3.1). (Pozn.: V tabulce 2.1 jsou uvedené některé atomové typy (konkrétně CF, NF, N4 a PY), které se nenachází v Amber14SB, přesto nejsou v této práci uvedené vypočtené parametry. Je to z toho důvodu, že tyto hodnoty byly do silového pole doplněny v dizertační práci [58] dr. Kučery a dané údaje nelze z důvodu ochrany duševního vlastnictví zveřejnit.)

Pro popis biomolekul je vhodné silové pole Amber14SB, naopak GAFF2 (Všeobecné silové pole Amber druhé generace) popisuje chování malých molekul a je s Amber14SB kompatibilní. Proto GAFF2 byl využit k parametrizaci ligandů.

V tomto momentě jsme měli definované parametry proteinů i ligandů a mohli jsme je využít k popisu chování reaktivátorů v inhibovaných enzymech pomocí molekulové dynamiky.

4.3 Molekulové dokování

Tento oddíl popisuje metodiku uvedenou v oddíle 2.4 a výsledky uvedené v oddíle 3.2.

Molekulové dokování je asi nejčastější metodou využívanou při molekulovém modelování léčiv, pomocí které získáme 2 výstupy. Prvním výstupem dokování jsou predikované pózy ligandu v receptoru a druhým výstupem je skórovací funkce (predikce vazebné energie). Ve většině případů studií je to přijatelná metoda pro konstatování závěrů. V našem případě, kdy potřebujeme vyzorovat, do jaké vzdálenosti se dokáže oximová skupina ligandu přiblížit k novičoku, se jedná o nedostačující metodu pro to, abychom mohli potvrdit či vyvrátit hypotézu a dosáhli cíle této práce. Proto jsme molekulové dokování využili pouze jako hrubé síto pro výběr ligandů, při kterém jsme vyřadili ligandy s nejmenší pravděpodobností na úspěch, a jako nástroj pro výběr póz na přípravu komplexů pro molekulovou dynamiku.

Jednalo se o semiflexibilní dokování (volná rotovatelnost vazeb ligandu). Na jeden výstup dokování jsme získali 9 predikovaných póz ligandu. Manuální inspekci všech 300 výstupů (celkem 2700 póz) jsme vybrali 32 nejlepších ligandů

(v jejich nejlepších pózách), které byly využity jako startovací pózy simulací molekulové dynamiky. Nejlepší pózy byly vybrány dle vhodného natočení oximové skupiny ligandu směrem k fosforu novičoku a dle jejich nejkratších vzdáleností (znázornění hodnocení výsledků na obr. 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 a 3.5).

Skóre bylo v tento moment irelevantní (přesnější predikci afinity získáme výstupem molekulové dynamiky), a tedy jsme ho při výběru ligandů nebrali v potaz.

Jelikož molekulové dokování bylo využito jako nástroj pro následující část experimentu, nemá velký smysl nikterak vyhodnocovat výsledky získané touto metodou. I přesto získané hodnoty v tabulce 3.10 naznačují některé možné závěry. Například to, že k novičokům A242 a A262 bude náročnější se přiblížit (což může být zapříčiněno jejich stericky náročnějšími strukturami).

Metodou molekulového dokování jsme zúžili náš výběr ligandů téměř na polovinu a zvolili jsme vhodné startovací pózy pro MD.

4.4 Molekulová dynamika

Tento oddíl popisuje metodiku uvedenou v oddíle 2.6 a výsledky uvedené v oddíle 3.3.

Výstupem molekulové dynamiky je simulace pohybu molekul v čase. Proteiny byly umístěny do vodného prostředí s nastavenou teplotou a tlakem tak, abychom napodobili fyziologické prostředí, a tím dosáhli výsledků blízkých realitě. Jednotlivé simulace byly nastavené na 50 ns a lze je rozdělit na 5000 kroků, při kterých byl proveden zápis energie dané konformace v čase (1 krok = 1 konformační změna každých 10 ps). Samozřejmě čím delší simulace, tím přesnější výsledky, ale také vyšší výpočtová náročnost. Jelikož jsme chtěli otestovat větší množství látek, tak jsme museli zkrátit dobu simulace, abychom zachovali efektivitu. Simulace jsme analyzovali softwarem VMD [54] a pozorovali jsme konformace, při kterých se ligandy nachází nejbliže k novičokům.

Dalším výstupem MD je predikce afinity ligandu v proteinu. Tato afinita je určena na základě nevazebných sil působících mezi atomy. První získanou hodnotou je Lennard-Jonesův potenciál, který udává závislost celkové energie interakce dvou neutrálních atomů na vzdálenosti jejich středů. V tabulkách 3.11, 3.12 a 3.13 je uveden průměr LJ-potenciálů všech 5000 konformací pro každý ligand. Další získanou hodnotou uvedenou v tabulkách je průměr Coulombových sil všech konformací pro každý ligand, které zastupují elektrostatické síly mezi atomy. Součtem těchto dvou hodnot získáme velikost nevazebných sil. Čím nižší je číselná hodnota, tím vyšší je afinita ligandu k danému místu. Bližší popis nevazebných sil viz online skripta [57].

Jak již bylo zmíněno výše, účelem bylo najít konformaci s optimální vzdáleností ligandu k novičoku. Konformace, kdy vzdálenost kyslíku oximové skupiny a fosforu novičoku se blíží jejich van der Waalovu (vdW) poloměru, poskytují lepší podmínky pro nukleofilní atak na inhibovaný serin. [59] Van der Waalsův poloměr pro kyslík a fosfor je 3,3 Å. [60]

Ale i dostatečné přiblížení ligandu k novičoku neznamená, že reaktivátor bude schopen provést nukleofilní atak na fosforylovaný serin. Bohužel ani molekulová dynamika neumí predikovat průběh chemických reakcí (k tomu lze využít kvantovou mechaniku, která pomocí Schrödingerovy rovnice popisuje chování částic na

subatomární úrovni, narozdíl od MD, která popisuje chování částic na atomové úrovni). Podle vypočtených částečných nábojů fosforů v aduktech novičoků na serin můžeme alespoň odhadnout, který z novičoků navázaných na serin bude nejlépe a nejhůře podléhat nukleofilním substitucím. Částečné náboje fosforů jsou shrnuty v tabulce 4.1. Podle hodnot můžeme predikovat, že k reaktivaci AChE inhibované dusíkatými novičkami (adukt SN4 a SN6) bude nutné využít silnější nukleofily z důvodu nižší elektropozitivity fosforu oproti halogenovaným novičkům (adukty SX0, SX2 a SX4).

Adukt novičoku	Atom	Typ	Částečný náboj
SX0 (A230)	P	P	0,823670
SX2 (A232)	P	P	0,935816
SX4 (A234)	P	P	0,966890
SN4 (A242)	P	PY	0,788218
SN6 (A262)	P	PY	0,755287

Tabulka 4.1: Náboje fosforů v aduktech

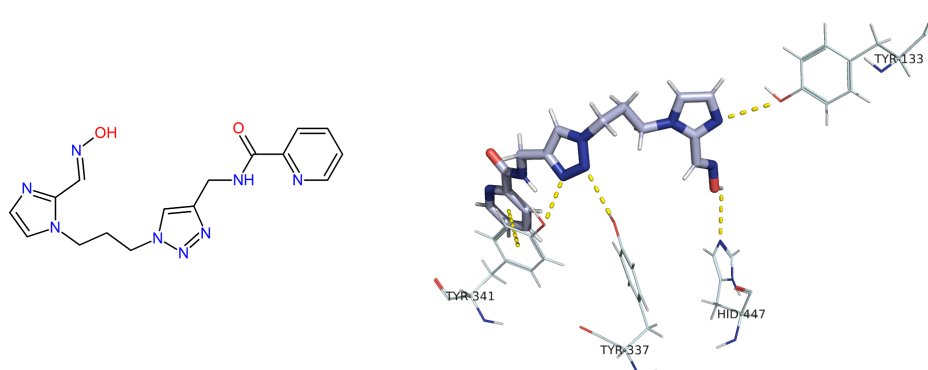
Následující odstavce popisují výsledky MD zvláště pro každý novičok.

AChE-A230-ligandy Při porovnání výsledků dokování a MD lze pozorovat nepřesnost výsledků molekulového dokování z důvodu jeho rigidity. Například u ligandu Z25 se nejkratší měřená vzdálenost zvýšila z 3,5 Å na 4,0 Å. Naopak Z46 se přiblížil z původních 8,9 Å na 5,5 Å.

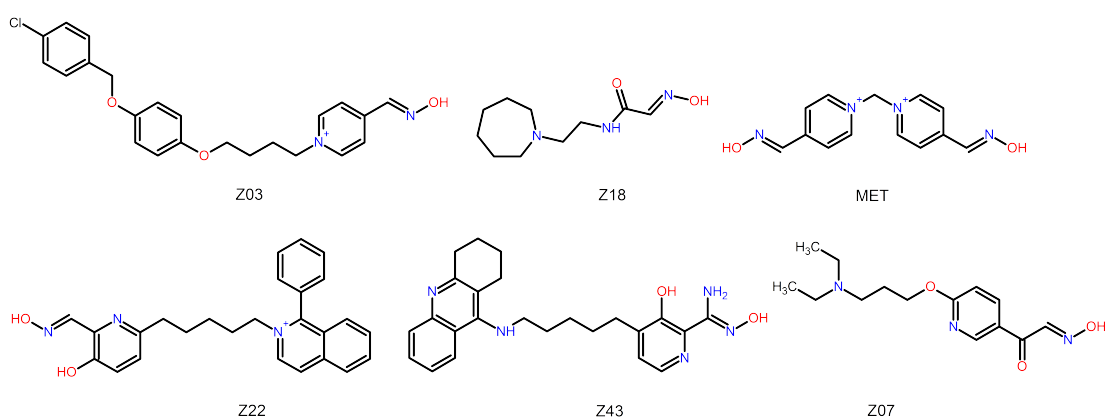
Ve výsledcích (obr. 3.6) můžeme vidět, že tři reaktivátory (Z03, 3,14 Å; Z18, 3,22 Å; MET, 3,27 Å) dokonce překonaly vdW poloměr, dva ligandy Z22 a Z43 dosáhly vdW poloměru a pět molekul (PRA, 3,38 Å; Z07, 3,38 Å; Z24, 3,42 Å; Z52, 3,47 Å; Z53, 3,49 Å) se přiblížilo k hodnotě vdW poloměru.

Nejvyšší afinitu (nejnižší vazebnou energii) k danému místu mají reaktivátory Z25 ($-310,80 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) a Z21 ($-291,80 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Na obr. 4.1 je znázorněn detail interakce Z25 s AChE. Můžeme pozorovat vodíkové vazby mezi ligandem a TYR-133, TYR-337, TYR-341 a HIS-447, a také π - π interakci mezi pyridinovým kruhem ligandu a benzenem TYR-341.

S přihlednutím ke vzdálenostem, afinitám, ale i částečným nábojům kyslíku oximové skupiny jsme doporučili 6 struktur s nejvyšší pravděpodobností na reaktivaci inhibovaného enzymu novičkem A230 k otestování aktivity v *in vitro* podmínkách. Struktury jsou zobrazeny na obr. 4.2. Jejich nejbližší vzdálenost, afinity a částečné náboje (podle kterých můžeme odhadovat nukleofilní sílu) jsou shrnuty v tabulce 4.2.



Obrázek 4.1: Ligand **Z25** – jeho 2D struktura a 3D znázornění interakce s AChE



Obrázek 4.2: Vybrané struktury k dalšímu testování – A230

Ligand	Vzdálenost	Afnita	Částečný náboj
Z03	3,14	-174,43	-0.433797
Z18	3,22	-240,75	-0.453828
MET	3,27	-214,37	-0.397186
Z22	3,30	-199,63	-0.502154
Z43	3,30	-269,59	-0.510444
Z07	3,38	-257,12	-0.460390

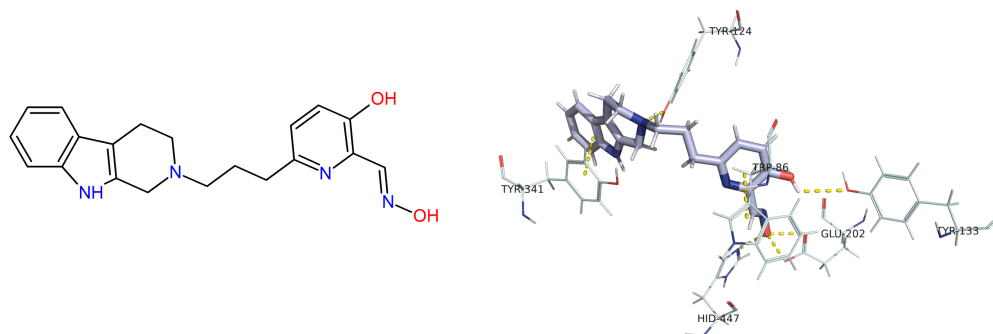
Tabulka 4.2: Vybrané struktury k dalšímu testování; vzdálenost uvedena v [Å], afnita uvedena v [kJ·mol⁻¹], částečný náboj O v -C=N-OH

AChE-A232-ligandy Při porovnání výstupů MD u A230 a A232 můžeme pozorovat velmi podobné výsledky, jelikož A232 se liší pouze jednou methylovou skupinou. Při pohledu na tabulku 4.1 můžeme postřehnout větší náboj fosforu novičoku A232 oproti A230 ($0,9358 \times 0,8237$), a lze tedy vydedukovat, že nukleofilní atak na A232 bude probíhat snáze.

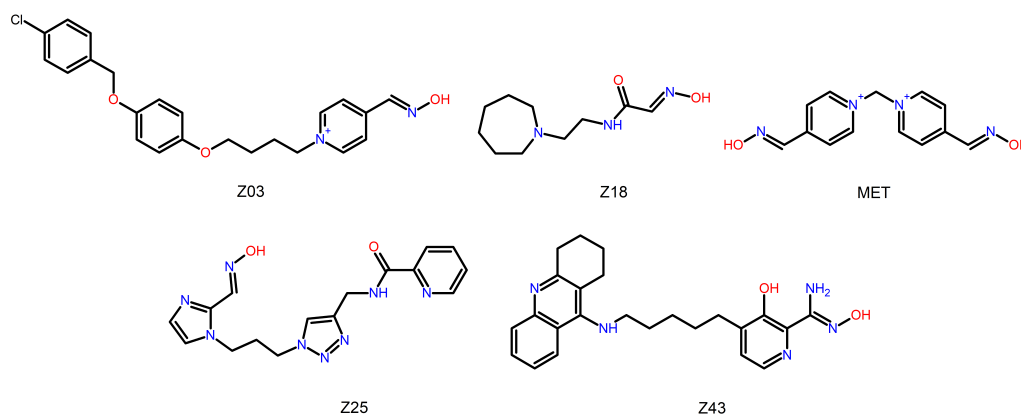
Ve výsledcích (obr. 3.8) můžeme vidět, že dva ligandy MET a Z25 dosáhly nebo překonaly vdW poloměr. Další tři reaktivátory (Z18, 3,37 Å; Z03, 3,4 Å; Z43, 3,42 Å) se přiblížily k hodnotě vdW poloměru.

Nejvyšší afinitu (nejnižší vazebnou energii) k danému místu mají reaktivátory Z39 ($-312,43 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) a Z25 ($-301,94 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Na obr. 4.3 je znázorněn detail interakce Z39 s AChE. Můžeme pozorovat vodíkové vazby mezi ligandem a TYR-124, TYR-133 a HIS-447, a také π - π interakci mezi s TRP-86 a TYR-341.

S přihlednutím ke vzdálenostem, afinitám a částečným nábojům kyslíku oximové skupiny jsme doporučili 5 struktur k otestování aktivity v *in vitro* podmínkách. Struktury jsou zobrazeny na obr. 4.4. Jejich nejbližší vzdálenost, afinity a částečné náboje jsou shrnuty v tabulce 4.3.



Obrázek 4.3: Ligand **Z39** – jeho 2D struktura a 3D znázornění interakce s AChE



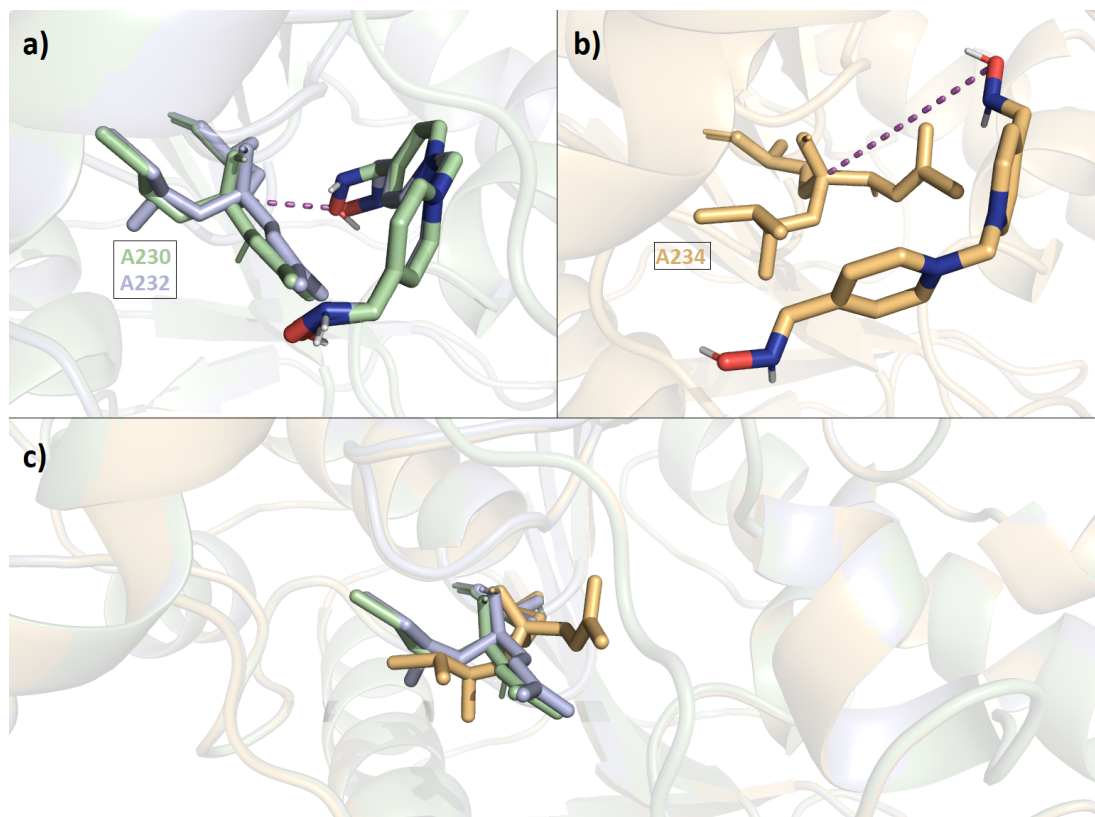
Obrázek 4.4: Vybrané struktury k dalšímu testování – A232

Ligand	Vzdálenost	Afnita	Částečný náboj
MET	3,28	-221,65	-0.397186
Z25	3,30	-301,94	-0.508133
Z18	3,37	-197,46	-0.453828
Z03	3,40	-0.433797	
Z43	3,42	-268,31	-0.510444

Tabulka 4.3: Vybrané struktury k dalšímu testování; vzdálenost uvedena v [Å], afnita uvedena v [kJ·mol⁻¹], částečný náboj O v -C=N-OH

AChE-A234-ligandy Na první pohled překvapivé výsledky jsou u novičoku A234, který se liší od A232 pouze další methylovou skupinou, i přesto jsou výstupy MD oproti předchozím dvěma novičokům rozdílné. Ligandy, které vykazovaly uspokojivé výsledky u předešlých výstupů, se nyní diametrálně lišily (např. MET nejbližší vzdálenost 5,46 Å, Z18 vzdál. 5,83 Å).

Vysvětlením je, že další methylová skupina již výrazně změnila konformaci celého novičoku, a tím více prostorově blokuje přístup reaktivátorům. Prostorová odlišnost A234 od A230 a A232 je znázorněna na obr. 4.5. V levé horní části vidíme možné přiblížení methoximu k A230, popř. k A232. V pravé horní části je zobrazena horší dostupnost methoximu k A234. V dolní části jsou znázorněny všechny tři novičoky v prostoru.

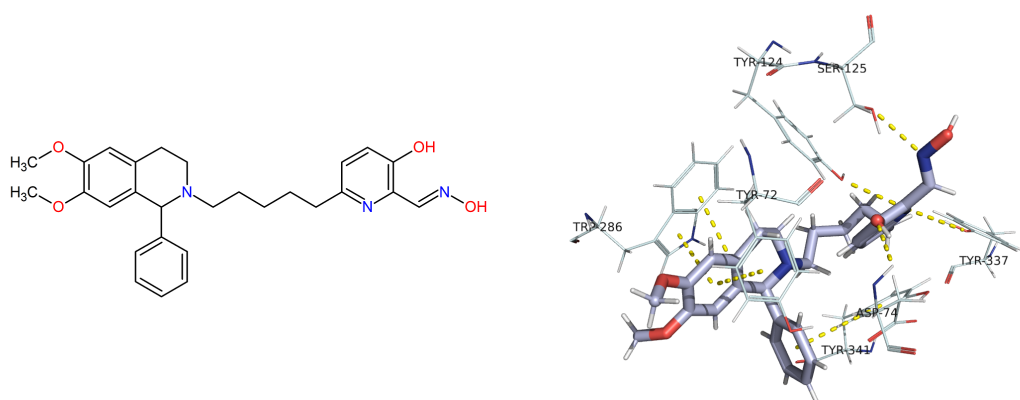


Obrázek 4.5: AChE inhibovaná novičoky A230, A232 a A234; a) AChE inh. A230 a A232 v komplexu s MET; b) AChE inh. A234 v komplexu s MET; c) prostorová konformace A230, A232 a A234

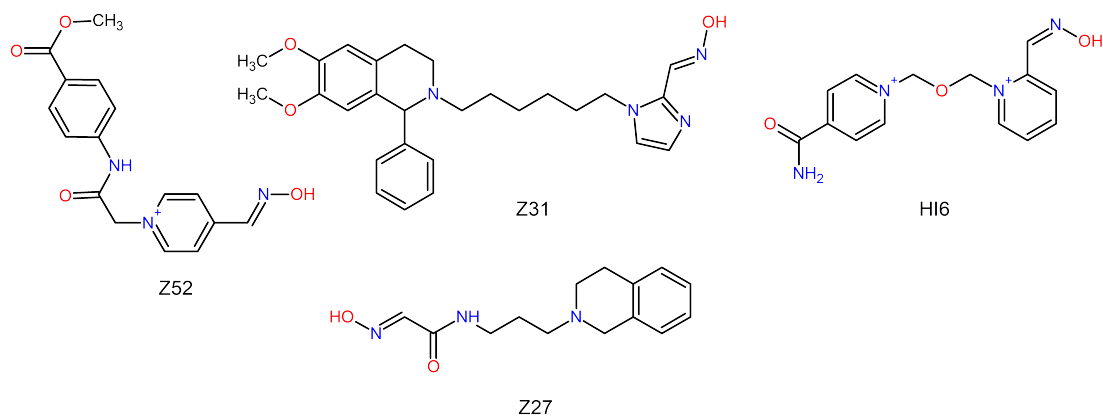
Ve výsledcích (obr. 3.10) můžeme vidět, že dva reaktivátory HI6 a Z31 překonaly vdW poloměr a ligand Z52 (3,58 Å) se přiblížil k hodnotě vdW poloměru.

Nejvyšší afinitu (nejnižší vazebnou energii) k danému místu mají reaktivátory Z38 ($-301,44 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) a Z30 ($-263,35 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Na obr. 4.6 je znázorněn detail interakce Z38 s AChE. Můžeme pozorovat vodíkové vazby mezi ligandem a ASP-74, TYR-124, SER-125 a TYR-337, a také π - π interakce mezi benzenovými jádry ligandu a TYR-72, TRP-286 a TYR-341.

S přihlednutím ke vzdálenostem, afinitám a částečným nábojům kyslíku oximové skupiny jsme doporučili 4 struktury k otestování aktivity v *in vitro* podmínkách. Struktury jsou zobrazeny na obr. 4.7. Jejich nejbližší vzdálenost, afinity a částečné náboje jsou shrnuty v tabulce 4.4.



Obrázek 4.6: Ligand **Z38** – jeho 2D struktura a 3D znázornění interakce s AChE



Obrázek 4.7: Vybrané struktury k dalšímu testování – A234

Ligand	Vzdálenost	Afinita	Částečný náboj
HI6	3,17	-173,15	-0.382711
Z31	3,25	-245,86	-0.501475
Z52	3,58	-145,21	-0.319699
Z27	3,78	-145,87	-0.452993

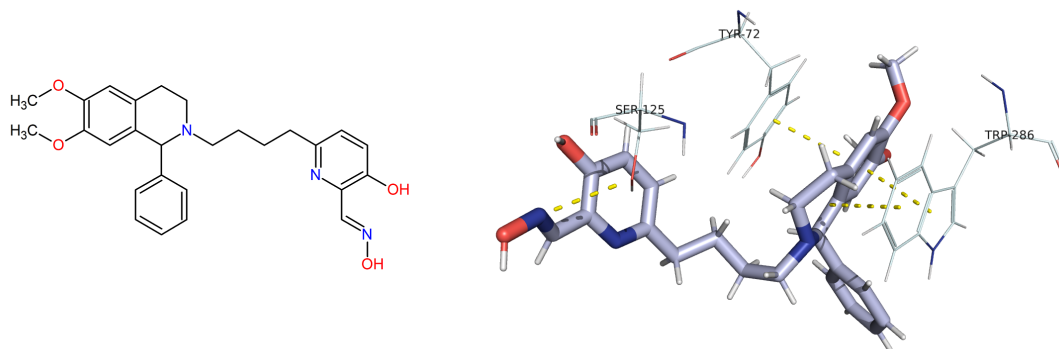
Tabulka 4.4: Vybrané struktury k dalšímu testování; vzdálenost uvedena v [Å], afinita uvedena v [kJ·mol⁻¹], částečný náboj O v -C=N-OH

AChE-A242-ligandy Jak už naznačily výsledky molekulového dokování, přístup k fosforu u látek A242 a A262 je omezenější z důvodu sterického bránění. Zároveň má fosfor nižší hodnotu částečného náboje (jak ukazuje tabulka 4.1), a tudíž bude zapotřebí větší nukleofilní síla ligandu k uskutečnění chemické reakce.

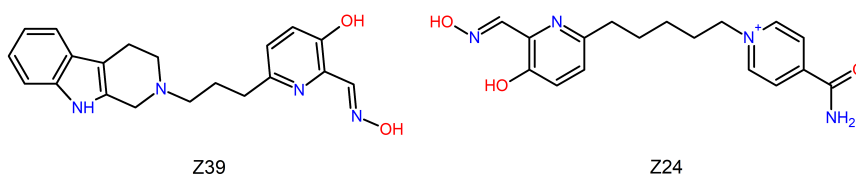
Ve výsledcích (obr. 3.12) můžeme vidět, že pouze jen jeden reaktivátor Z39 (3,37 Å) se významněji přiblížil k hodnotě vdW poloměru.

Nejvyšší afinitu (nejnižší vazebnou energii) k danému místu mají reaktivátory Z37 (-287,53 kJ·mol⁻¹) a Z31 (-277,76 kJ·mol⁻¹). Na obr. 4.8 je znázorněn detail interakce Z37 s AChE. Můžeme pozorovat vodíkovou vazbu mezi ligandem a SER-125, a také π - π interakce mezi benzenovým jádrem ligandu a TYR-72 a TRP-286.

S přihlednutím ke vzdálenostem, afinitám a částečným nábojům kyslíku oximové skupiny jsme doporučili 2 struktury k otestování aktivity v *in vitro* podmínkách. Struktury jsou zobrazeny na obr. 4.9. Jejich nejbližší vzdálenost, afinity a částečné náboje jsou shrnuty v tabulce 4.5.



Obrázek 4.8: Ligand **Z37** – jeho 2D struktura a 3D znázornění interakce s AChE



Obrázek 4.9: Vybrané struktury k dalšímu testování – A242

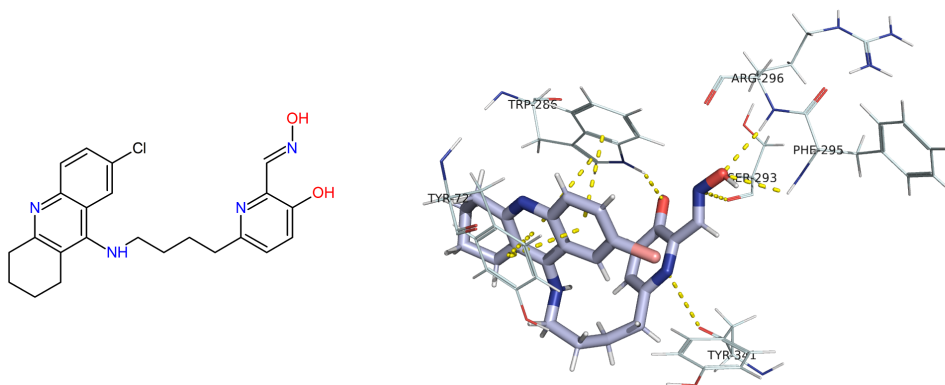
Ligand	Vzdálenost	Afinita	Částečný náboj
Z39	3,37	-219,13	-0.488806
Z24	4,81	-187,69	-0.498414

Tabulka 4.5: Vybrané struktury k dalšímu testování; vzdálenost uvedena v [Å], afinita uvedena v [kJ·mol⁻¹], částečný náboj O v -C=N-OH

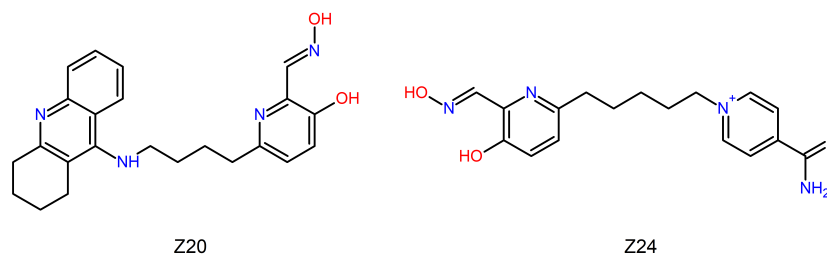
AChE-A262-ligandy Ve výsledcích (obr. 3.14) můžeme vidět, že pouze jeden reaktivátor Z20 (3,22 Å) překonal vdW poloměr a ligand Z24 (3,57 Å) se přiblížil k hodnotě vdW poloměru.

Nejvyšší afinitu (nejnižší vazebnou energii) k danému místu mají reaktivátory Z46 (-272,63 kJ·mol⁻¹) a Z19 (-270,10 kJ·mol⁻¹). Na obr. 4.10 je znázorněn detail interakce Z19 s AChE. Můžeme pozorovat vodíkové vazby mezi ligandem a TRP-286, SER-293, PHE-295, ARG-296 a TYR-341, a také π - π interakce s TYR-72 a TRP-286.

S přihlednutím ke vzdálenostem, afinitám a částečným nábojům kyslíku oximové skupiny jsme doporučili 2 struktury k otestování aktivity v *in vitro* podmínkách. Struktury jsou zobrazeny na obr. 4.11. Jejich nejbližší vzdálenost, afinity a částečné náboje jsou shrnuty v tabulce 4.6.



Obrázek 4.10: Ligand Z19 – jeho 2D struktura a 3D znázornění interakce s AChE



Obrázek 4.11: Vybrané struktury k dalšímu testování – A262

Ligand	Vzdálenost	Afinita	Částečný náboj
Z20	3,22	-217,46	-0.505778
Z24	3,57	-220,58	-0.498414

Tabulka 4.6: Vybrané struktury k dalšímu testování; vzdálenost uvedena v [Å], afinita uvedena v [kJ·mol⁻¹], částečný náboj O v -C=N-OH

Pokud bychom měli shrnout výběr reaktivátorů doporučených k *in vitro* testům aktivity, tak na 5 různých struktur novičoků bylo vybráno celkem 14 různých ligandů, z nichž pouze pět ligandů je vybráno k otestování zároveň u dvou novičoků (methoxim, Z03, Z18 a Z43 doporučeny k otestování u A230 a A232, Z24 doporučen k otestování u A242 a A262). Z komerčně dostupných reaktivátorů se ve výčtu vybraných ligandů vyskytuje pouze methoxim a HI6 (A234).

Závěr

Novičoky jsou na poli vojenské toxikologie zatím velkou neznámou a proti intoxikaci těmito látkami neexistuje žádná kauzální léčba. Cílem této práce bylo za pomoci výpočetních metod zjistit možnosti reaktivace AChE inhibované látkami ze skupiny novičoků a zároveň potvrdit nebo vyvrátit hypotézu, která uvádí, že není možné reaktivovat AChE inhibovanou novičoky ze sterických důvodů (jelikož novičoky jsou prostorově náročné látky).

Součástí práce bylo vyvinutí metody pro popis chemických parametrů aduktů pěti vybraných novičoků na serin. Pomocí parametrizace jsme mohli popsat strukturně-chemické rozdíly mezi jednotlivými novičoky a odhadnout obtížnost jejich reaktivace. Dále jsme připravili modely proteinů. Z odborných článků jsme vybrali potenciální reaktivátory, jejichž výběr byl pomocí molekulového dokování zúžen na polovinu. Daný výběr ligandů byl testován přesněji, ale výpočetně náročnější metodou – molekulovou dynamikou. Za přispění MD jsme pozorovali a popsali chování ligandů v receptorech. Cíle práce byly splněny.

Pomocí MD jsme znázornili dostatečné přiblížení ligandů k fosforům novičoků, které je podmínkou pro reaktivaci enzymu. Ze získaných dat můžeme konstatovat vyvrácení původní hypotézy o nemožnosti reaktivace inhibovaného enzymu, a tedy jsme na racionálním podkladě určili, že existuje teoretická možnost reaktivace AChE inhibované novičoky, byť u A242 a A262 je škála možných reaktivátorů užší.

Zvláště pro každý novičok jsme doporučili reaktivátory, které mají největší pravděpodobnost na reaktivaci inhibovaného enzymu. Aktivita těchto doporučených reaktivátorů bude dále testována *in vitro*. Jelikož ani na ostatní starší NPL neexistuje univerzální reaktivátor, tak ani skupina novičoků z důvodu strukturní rozdílnosti není výjimkou. Jak jsme ukázali, tak rozdíl jedné methylové skupiny mezi A232 a A234 přináší rozdílné výsledky. Ještě větší rozdíl je mezi chlorovanými a dusíkatými novičoky.

Zároveň jsme touto prací ukázali důležitost a efektivitu výpočetních metod při návrhu nových léčiv. Z velkého množství potenciálních látek jsme racionálním způsobem vybrali ligandy s větší pravděpodobností úspěchu. Tím jsme ušetřili čas, snížili finanční náročnost a v našem případě i zvýšili bezpečnost, jelikož jsme minimalizovali čas, při kterém by se manipulovalo s novičoky v laboratoři při testování aktivity látek, které nemusí ani fungovat.

Tato studie je teprve prvním krokem k možnému objevení fungujícího reaktivátoru proti novičokům. Pomocí této metody můžeme nyní testovat nové potenciální reaktivátory v poměrně krátkém čase a pomůže nám celý proces zefektivnit a racionalizovat.

Seznam použité literatury

- [1] Chai, Peter R., Bryan D. Hayes, Timothy B. Erickson, and Edward W. Boyer. ‘Novichok Agents: A Historical, Current, and Toxicological Perspective’. *Toxicology Communications* 2, no. 1 (2018): 45–48. <https://doi.org/10.1080/24734306.2018.1475151>.
- [2] *Review of Acute Human-Toxicity Estimates for Selected Chemical-Warfare Agents*. Washington, D.C.: National Academies Press, 1997. <https://doi.org/10.17226/5825>.
- [3] Patočka, Jiří. *Vojenská toxikologie*. Praha: Grada, 2004.
- [4] Mercey, Guillaume, Tristan Verdelet, Julien Renou, Maria Kliachyna, Rachid Baati, Florian Nachon, Ludovic Jean, and Pierre-Yves Renard. ‘Reactivators of Acetylcholinesterase Inhibited by Organophosphorus Nerve Agents’. *Accounts of Chemical Research* 45, no. 5 (15 May 2012): 756–66. <https://doi.org/10.1021/ar2002864>.
- [5] Everts, Sarah. ‘The Nazi Origins of Deadly Nerve Gases’. *CEN* 94, no. 41 (17 October 2016). <https://cen.acs.org/content/cen/articles/94/i41/Nazi-origins-deadly-nerve-gases.html>.
- [6] Gorecki, Lukas, Jan Korabecny, Kamil Musilek, David Malinak, Eugenie Nepovimova, Rafael Dolezal, Daniel Jun, Ondrej Soukup, and Kamil Kuca. ‘SAR Study to Find Optimal Cholinesterase Reactivator against Organophosphorous Nerve Agents and Pesticides.’ *Archives of Toxicology* 90, no. 12 (2016): 2831–59. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1827-3>.
- [7] Macilwain, Colin. ‘Study Proves Iraq Used Nerve Gas’. *Nature* 363, no. 6424 (1993): 3–3. <https://doi.org/10.1038/363003b0>.
- [8] Okudera, Hiroshi, Hiroshi Morita, Tomomi Iwashita, Tatsuhiko Shibata, Tetsumaro Otagiri, Shigeaki Kobayashi, and Nobuo Yanagisawa. ‘Unexpected Nerve Gas Exposure in the City of Matsumoto: Report of Rescue Activity in the First Sarin Gas Terrorism’. *The American Journal of Emergency Medicine* 15, no. 5 (1997): 527–28. [https://doi.org/10.1016/S0735-6757\(97\)90201-1](https://doi.org/10.1016/S0735-6757(97)90201-1).
- [9] Hongo, Jun. ‘Sarin Gas Attack in Matsumoto Marks 20th Anniversary’. *The Wall Street Journal*, 27 June 2014. <https://www.wsj.com/articles/BL-JRTB-17275>.
- [10] ‘Terorismus chemickou zbraní. Před 25 lety sekta Óm šinrikjó zaútočila v tokijském metru’. *Česká Televize*, 20 March 2020. <https://ct24.ceskatelevize.cz/svet/3063928-terorismus-chemickou-zbrani>.
- [11] Chai, Peter R., Edward W. Boyer, Houssam Al-Nahas, and Timothy B. Erickson. ‘Toxic Chemical Weapons of Assassination and Warfare: Nerve Agents VX and Sarin’. *Toxicology Communications* 1, no. 1 (2017): 21–23. <https://doi.org/10.1080/24734306.2017.1373503>.

- [12] ‘Timeline of Syrian Chemical Weapons Activity, 2012-2022’. *Arms Control Association*, 2021. <https://www.armscontrol.org/factsheets/Timeline-of-Syrian-Chemical-Weapons-Activity>.
- [13] Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons. <https://www.opcw.org/>
- [14] Státní úřad pro jadernou bezpečnost. <https://www.sujb.cz/>
- [15] Informační centrum OSN v Praze. <http://www.osn.cz/>
- [16] Tucker, Jonathan B. *War of Nerves: Chemical Warfare from World War I to al-Qaeda*. First Anchor Books ed. New York, NY: Anchor Books, 2007.
- [17] Halámek, Emil; Koblíha, Zdeněk. Potenciální bojové chemické látky. *Chemické listy*, 2011-06-15. <http://www.chemicke-listy.cz/ojs3/index.php/chemicke-listy/article/view/1136/1136>
- [18] Mirzayanov, Vil S. *State Secrets. An Insider’s Chronicle of the Russian Chemical Weapons Program*. Outskirts Press, 2008.
- [19] Ellison, D. Hank. *Handbook of Chemical and Biological Warfare Agents*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2008.
- [20] Hoenig, Steven L. *Compendium of Chemical Warfare Agents*. New York, NY: Springer, 2007.
- [21] ‘Ex-Spy Sergei Skripal Discharged after Poisoning’. *BBC News*, 18 May 2018. <https://www.bbc.com/news/uk-44165718>.
- [22] ‘Novichok Victim Found Substance Disguised as Perfume in Sealed Box’. *The Guardian*, 27 July 2018. <https://www.theguardian.com/uk-news/2018/jul/24/novichok-victim-ill-within-15-minutes>.
- [23] ‘ITV News Exclusive: Where Did Charlie Rowley Find the “Packaged Bottle of Novichok Perfume”?’ *ITV News*, 26 July 2018. <https://www.itv.com/news/2018-07-26/novichok-charlie-rowley-amesbury-nerve-agent-exclusive>.
- [24] OPCW. ‘Annex on Chemicals, Schedule 1’, <https://www.opcw.org/chemical-weapons-convention/annexes/annex-chemicals/schedule-1>.
- [25] Lee, Jin Young, Kyoung Chan Lim, and Hyun Suk Kim. ‘Characterization and Study on Fragmentation Pathways of a Novel Nerve Agent, “Novichok (A234)”, in Aqueous Solution by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry’. *Molecules* 26, no. 4 (18 February 2021): 1059. <https://doi.org/10.3390/molecules26041059>.
- [26] Bolt, Hermann M., and Jan G. Hengstler. ‘Recent Research on Novichok’. *Archives of Toxicology* 96, no. 5 (2022): 1137–40. <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03273-7>.

- [27] Alieva, Iuliia, J. D. Moffitt, and Kathleen M. Carley. ‘How Disinformation Operations against Russian Opposition Leader Alexei Navalny Influence the International Audience on Twitter’. *Social Network Analysis and Mining* 12, no. 1 (2022): 80. <https://doi.org/10.1007/s13278-022-00908-6>.
- [28] ‘OPCW Issues Report on Technical Assistance Requested by Germany’. *Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons*, 10 June 2020. <https://www.opcw.org/media-centre/news/2020/10/opcw-issues-report-technical-assistance-requested-germany>.
- [29] Trang, Amy, and Paras B. Khandhar. ‘Physiology, Acetylcholinesterase’. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539735/>.
- [30] Sam, Christian, and Bruno Bordoni. ‘Physiology, Acetylcholine’. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557825/>.
- [31] Čolović, Mirjana B., Danijela Z. Krstić, Tamara D. L Lazarević-Pašti, Aleksandra M. Bondžić, and Vesna M. Vasić. ‘Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology’. *Current Neuropharmacology* 11, no. 3 (2013): 315–35. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>.
- [32] Dvir, Hay, Israel Silman, Michal Harel, Terrone L. Rosenberry, and Joel L. Sussman. ‘Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function’. *Chemico-Biological Interactions* 187, no. 1–3 (2010): 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.01.042>.
- [33] Carletti, Eugenie, Jacques-Philippe Colletier, Florine Dupeux, Marie Trovaslet, Patrick Masson, and Florian Nachon. ‘Structural Evidence That Human Acetylcholinesterase Inhibited by Tabun Ages through O-Dealkylation’. *Journal of Medicinal Chemistry* 53, no. 10 (27 May 2010): 4002–8. <https://doi.org/10.1021/jm901853b>.
- [34] Moshiri, Mohamm, Emadodin Darchini-Maragheh, and Mahdi Balali-Mood. ‘Advances in Toxicology and Medical Treatment of Chemical Warfare Nerve Agents’. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 20, no. 1 (2012): 81. <https://doi.org/10.1186/2008-2231-20-81>.
- [35] Kassa, Jiří. ‘Prezentace - Nervově Paralytické Látky’. Katedra Toxicologie a Vojenské Farmacie, https://www.unob.cz/fvz/struktura/k304/Documents/nervove_paralyticke_latky.pdf.
- [36] McGuire, Jack R., Stephanie M. Bester, Mark A. Guelta, Jonah Cheung, Caroline Langley, Mark D. Winemiller, Sue Y. Bae, et al. ‘Structural and Biochemical Insights into the Inhibition of Human Acetylcholinesterase by G-Series Nerve Agents and Subsequent Reactivation by HI-6’. *Chemical Research in Toxicology* 34, no. 3 (15 March 2021): 804–16. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00406>.

- [37] Gorecki, Lukas, Jan Korabecny, Kamil Musilek, Eugenie Nepovimova, David Malinak, Tomas Kucera, Rafael Dolezal, Daniel Jun, Ondrej Soukup, and Kamil Kuca. “Progress in Acetylcholinesterase Reactivators and in the Treatment of Organophosphorus Intoxication: A Patent Review (2006–2016).” *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 27, no. 9 (September 2, 2017): 971–85. <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1338275>.
- [38] Bi, Huanglei, Qin Ouyang, Zhao Wei, and Zhibing Zheng. “Design, Synthesis and Evaluation of Novel Nonquaternary and 3 Non-Oxime Reactivators for Acetylcholinesterase Inhibited by Organophosphates.” *Bioorganic Chemistry* 100 (2020): 103902. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103902>.
- [39] Advanced Chemistry Development, Inc. Chems sketch.
- [40] Hanwell, Marcus D, Donald E Curtis, David C Lonie, Tim Vandermeersch, Eva Zurek, and Geoffrey R Hutchison. “Avogadro: An Advanced Semantic Chemical Editor, Visualization, and Analysis Platform.” *Journal of Cheminformatics* 4, no. 1 (2012): 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.
- [41] Morris, Garrett M., Ruth Huey, William Lindstrom, Michel F. Sanner, Richard K. Belew, David S. Goodsell, and Arthur J. Olson. “AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility.” *Journal of Computational Chemistry* 30, no. 16 (2009): 2785–91. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- [42] Franklin, Matthew C., Michael J. Rudolph, Christopher Ginter, Michael S. Cassidy, and Jonah Cheung. “Structures of Paraoxon-Inhibited Human Acetylcholinesterase Reveal Perturbations of the Acyl Loop and the Dimer Interface: Paraoxon-Inhibited Human Acetylcholinesterase.” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 84, no. 9 (2016): 1246–56. <https://doi.org/10.1002/prot.25073>.
- [43] Pettersen, Eric F., Thomas D. Goddard, Conrad C. Huang, Gregory S. Couch, Daniel M. Greenblatt, Elaine C. Meng, and Thomas E. Ferrin. “UCSF Chimera?A Visualization System for Exploratory Research and Analysis.” *Journal of Computational Chemistry* 25, no. 13 (2004): 1605–12. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- [44] M.J. Abraham, D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, and the GROMACS development team, *GROMACS User Manual version 2018*, www.gromacs.org (2018)
- [45] Bowie, James U., Roland L  thy, and David Eisenberg. “A Method to Identify Protein Sequences That Fold into a Known Three-Dimensional Structure.” *Science* 253, no. 5016 (July 12, 1991): 164–70. <https://doi.org/10.1126/science.1853201>.
- [46] L  thy, Roland, James U. Bowie, and David Eisenberg. “Assessment of Protein Models with Three-Dimensional Profiles.” *Nature* 356, no. 6364 (1992): 83–85. <https://doi.org/10.1038/356083a0>.

- [47] R.E.D. Server Development.
<https://upjv.q4md-forcefieldtools.org/>
- [48] Vanquelef, Enguerran, Sabrina Simon, Gaelle Marquant, Elodie Garcia, Geoffroy Klimerak, Jean Charles Delepine, Piotr Cieplak, and François-Yves Dupradeau. "R.E.D. Server: A Web Service for Deriving RESP and ESP Charges and Building Force Field Libraries for New Molecules and Molecular Fragments." *Nucleic Acids Research* 39, no. suppl-2 (July 1, 2011): W511–17. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr288>.
- [49] Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., et al. Gaussian16 Revision B.01. Gaussian Inc. Wallingford CT 2016.
- [50] Wang, Junmei, Romain M. Wolf, James W. Caldwell, Peter A. Kollman, and David A. Case. "Development and Testing of a General Amber Force Field." *Journal of Computational Chemistry* 25, no. 9 (July 15, 2004): 1157–74. <https://doi.org/10.1002/jcc.20035>.
- [51] Wang, Junmei, Wei Wang, Peter A. Kollman, and David A. Case. "Automatic Atom Type and Bond Type Perception in Molecular Mechanical Calculations." *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 25, no. 2 (2006): 247–60. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2005.12.005>.
- [52] Trott, Oleg, and Arthur J. Olson. "AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading." *Journal of Computational Chemistry*, 2009, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- [53] Schrodinger, LLC. The PyMOL molecular graphics system, version 1.7.4. 2015.
- [54] Humphrey, W., Dalke, A. and Schulten, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics", *J. Molec. Graphics*, 1996, vol. 14, pp. 33-38.
- [55] Meanwell, Nicholas A. "Improving Drug Candidates by Design: A Focus on Physicochemical Properties As a Means of Improving Compound Disposition and Safety." *Chemical Research in Toxicology* 24, no. 9 (September 19, 2011): 1420–56. <https://doi.org/10.1021/tx200211v>.
- [56] Katz, Francine S., Stevan Pecic, Timothy H. Tran, Ilya Trakht, Laura Schneider, Zhengxiang Zhu, Long Ton-That, et al. "Discovery of New Classes of Compounds That Reactivate Acetylcholinesterase Inhibited by Organophosphates." *ChemBioChem* 16, no. 15 (2015): 2205–15. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500348>.
- [57] Kolafa, Jiří. 'Molekulové Modelování a Simulace', 24 August 2018. <https://ufch.vscht.cz/files/uzel/0014046/y83PKc7MBQA.pdf?redirected>.
- [58] Kučera, Tomáš. 'Interakce malých molekul s proteiny *in silico*'. Dizertační práce, Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, 2019.

- [59] Santos, Marcelo C., Fernanda D. Botelho, Arlan S. Gonçalves, Kamil Kuca, Eugenie Nepovimova, Samir F.A. Cavalcante, Antonio L.S. Lima, and Tanos C.C. França. ‘Theoretical Assessment of the Performances of Commercial Oximes on the Reactivation of Acetylcholinesterase Inhibited by the Nerve Agent A-242 (Novichok)’. *Food and Chemical Toxicology* 165 (2022): 113084. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113084>.
- [60] Johnson, Luke A., Angus J. Robertson, Nicola J. Baxter, Clare R. Trevitt, Claudine Bisson, Yi Jin, Henry P. Wood, et al. ‘Van Der Waals Contact between Nucleophile and Transferring Phosphorus Is Insufficient To Achieve Enzyme Transition-State Architecture’. *ACS Catalysis* 8, no. 9 (7 September 2018): 8140–53. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b01612>.

Seznam obrázků

1	AChE s navázanými NPL na serin-203	3
1.1	Struktury NPL	5
1.2	Novičoky	6
1.3	Acetylcholin	8
1.4	Mechanismus hydrolyzy ACh	8
1.5	Model AChE	9
1.6	Mechanismus inhibice AChE	9
1.7	Model AChE inhibované tabunem	10
1.8	Struktury léčiv využívaných při symptomatické léčbě intoxikací NPL	11
1.9	Mechanismus reaktivace inhibované AChE	12
1.10	Komerčně dostupné reaktivátory AChE	13
1.11	Model AChE inhibované tabunem s HI-6	13
2.1	Vybrané struktury potenciálních reaktivátorů AChE (1. část)	15
2.2	Vybrané struktury potenciálních reaktivátorů AChE (2. část)	16
2.3	Vybrané struktury potenciálních reaktivátorů AChE (3. část)	17
2.4	Struktury novičoků	18
2.5	Adukty serinu s novičoky	19
2.6	Názvy atomů novičoků navázaných na zbytek AMK	19
2.7	Typy atomů novičoků navázaných na zbytek AMK	20
3.1	Výsledek dokování; AChE-A230-Z21; nejlepší póza ligandu Z21	30
3.2	Výsledek dokování; AChE-A232-Z43; nejlepší póza ligandu Z43	30
3.3	Výsledek dokování; AChE-A234-Z24; nejlepší póza ligandu Z24	31
3.4	Výsledek dokování; AChE-A242-Z31; nejlepší póza ligandu Z31	31
3.5	Výsledek dokování; AChE-A262-Z07; nejlepší póza ligandu Z07	32
3.6	Výsledek MD; vzdálenosti mezi oxim. sk. ligandů a A230	33
3.7	Výsledek MD; AChE-A230-Z03	33
3.8	Výsledek MD; vzdálenosti mezi oxim. sk. ligandů a A232	34
3.9	Výsledek MD; AChE-A232-MET	34
3.10	Výsledek MD; vzdálenosti mezi oxim. sk. ligandů a A234	35
3.11	Výsledek MD; AChE-A234-HI6	35
3.12	Výsledek MD; vzdálenosti mezi oxim. sk. ligandů a A242	36
3.13	Výsledek MD; AChE-A242-Z39	36
3.14	Výsledek MD; mezi oxim. sk. ligandů a A262	37
3.15	Výsledek MD; AChE-A262-Z20	37
4.1	Interakce Z25 s AChE	45
4.2	Vybrané struktury k dalšímu testování – A230	45
4.3	Interakce Z39 s AChE	46
4.4	Vybrané struktury k dalšímu testování – A232	46
4.5	Prostorová konformace A230, A232 a A234	47
4.6	Interakce Z38 s AChE	48
4.7	Vybrané struktury k dalšímu testování – A234	48
4.8	Interakce Z37 s AChE	49
4.9	Vybrané struktury k dalšímu testování – A242	49

4.10 Interakce Z19 s AChE	50
4.11 Vybrané struktury k dalšímu testování – A262	50

Seznam tabulek

1.1	Nové látky přidané na Úmluvu o zákazu použití chemických zbraní	7
2.1	Popis atomových typů	20
3.1	Nově definovaný atomový typ	22
3.2	Nově definované parametry vazeb – bondtypes	22
3.3	Nově definované parametry vazeb – angletypes	22
3.4	Nově definované parametry vazeb – dihedraltypes	23
3.5	Struktura aduktu serinu a A230	24
3.6	Struktura aduktu serinu a A232	25
3.7	Struktura aduktu serinu a A234	26
3.8	Struktura aduktu serinu a A242	27
3.9	Struktura aduktu serinu a A262	28
3.10	Výsledky dokování	29
3.11	Výsledná afinita ligandů v receptorech (1. část)	38
3.12	Výsledná afinita ligandů v receptorech (2. část)	39
3.13	Výsledná afinita ligandů v receptorech (3. část)	40
4.1	Náboje fosforů v aduktech	44
4.2	Vybrané struktury k dalšímu testování – A230	45
4.3	Vybrané struktury k dalšímu testování – A232	47
4.4	Vybrané struktury k dalšímu testování – A234	49
4.5	Vybrané struktury k dalšímu testování – A242	50
4.6	Vybrané struktury k dalšímu testování – A262	51