

POČÍTAČOVÉ MODELOVÁNÍ A SIMULACE – NOVÉ TECHNOLOGIE PŘI VÝVOJI PROSTŘEDKŮ PROTI CHEMICKÝM BOJOVÝM LÁTKÁM

¹Mgr. Jiří WIESNER, ¹Mgr. Zdeněk KŘÍŽ, Ph.D., ²Ing. Kamil KUČA, ²npor. Mgr. Daniel JUN,
¹prof. RNDr. Jaroslav KOČA, DrSc.

¹Masarykova univerzita, Národní centrum pro výzkum biomolekul Přírodovědecké fakulty, Brno

²Univerzita obrany, katedra toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové

Souhrn

Reaktivace jako chemická reakce, při níž je inhibovaná serinové proteáze navracena její katalytická účinnost, je známa již poměrně dlouho. Nicméně stále ještě nebyl nalezen reaktivátor, jež by byl schopen uspokojivě reaktivovat acetylcholinesterázu inhibovanou jakoukoli nervově paralytickou látkou (NPL), například sarinem, cyklosarinem, somanem, tabunem a VX. Pokusy nalézt takovou látku spočívaly do této chvíle jen v experimentálních metodách a strukturální aspekty reaktivace sledované počítačovými metodami doposud objasněny nebyly. V tomto případě se jedná o chemickou reakci, a to už samo o sobě vyžaduje použití pestré palety metod výpočetní chemie, aby mohly být vyřešeny jak strukturální, tak i energetické aspekty celého procesu.

Klíčová slova: Acetylcholinesteráza; Reaktivace; Oximy; Molekulová dynamika; Docking; Kvantová chemie.

Computer Modeling and Simulation – New Technologies in Development of Means against Combat Chemical Substances

Summary

Reactivation process, when catalytical potency to the inhibited serine protease is returned, has been known for a long time. Unfortunately, no single acetylcholinesterase (AChE) reactivator able to reactivate sufficiently AChE inhibited by all nerve agents (sarin, cyclosarin, soman, tabun or VX) has been used. Attempts to find such a compound were based on experimental methods only. However, structural aspects of reactivation examined by computer methods have not been explained till now. In this article, chemical reaction (reactivation) is described using the broad range of computer chemistry methods that is necessary for solving structural and energetical aspects of the whole process.

Key words: Acetylcholinesterase; Reactivation; Oximes; Molecular dynamics; Docking; Quantum chemistry.

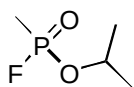
Úvod

Zástupci organofosforových sloučenin, nervově paralytické látky a pesticidy (obr. 1), mají schopnost působit toxicky na člověka. Tento efekt spočívá v ireverzibilní inhibici enzymu acetylcholinesterázy (AChE; EC 3.1.1.7), která je nezbytná pro správnou funkci cholinergního nervového systému člověka (1).

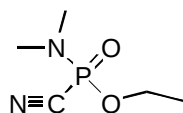
Tyto látky fosforylují či fosfonylují hydroxyskupinu serinu v esteratické části enzymu. Stabilní kovalentní konjugáty vzniklé inhibicí mohou být následně hydrolyzovány (spontánní reaktivace) nebo dealkylovány (stárnutí enzymu; aging) (obr. 2). Protože spontánní reaktivace inhibovaného enzymu je pomalá a v případě stárnutí k ní dokonce prakticky nedochází, hovoříme o těchto látkách jako o ireverzibilních inhibitorech AChE (2).

V současné době se užívají při intoxikacích organofosforovými sloučeninami jako antidotní terapie anticholinergika (zejména atropin) a reaktivátory AChE, označované podle funkční skupiny jako oximy. Z chemického hlediska se jedná o monokvarterní či biskvarterní pyridiniové sloučeniny s funkční aldoximovou skupinou. Mezi nejznámější zástupce této skupiny látek patří monokvarterní pralidoxim (2-PAM; 2-(hydroxyiminomethyl)-1-methylpyridinium chlorid) nebo biskvarterní obidoxim (Toxogonin®; 1,3-bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-2-oxapropan dichlorid) a HI-6 (1-(4-hydroxyiminomethylpyridinium)-3-(4-karbamoyl-pyridinium)-2-oxapropan dichlorid) (obr. 3) (3).

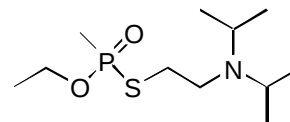
Reaktivací efekt těchto látek spočívá ve štěpení vazby vzniklé mezi inhibitorem (organofosforová sloučenina) a enzymem (AChE). Funkční oxi-



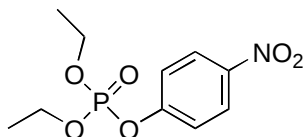
Sarin (NPL)



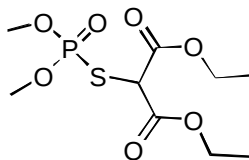
Tabun (NPL)



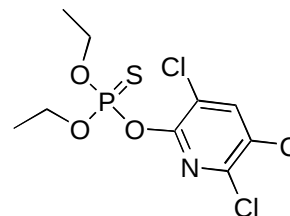
VX (NPL)



Paraoxon (Pesticid)

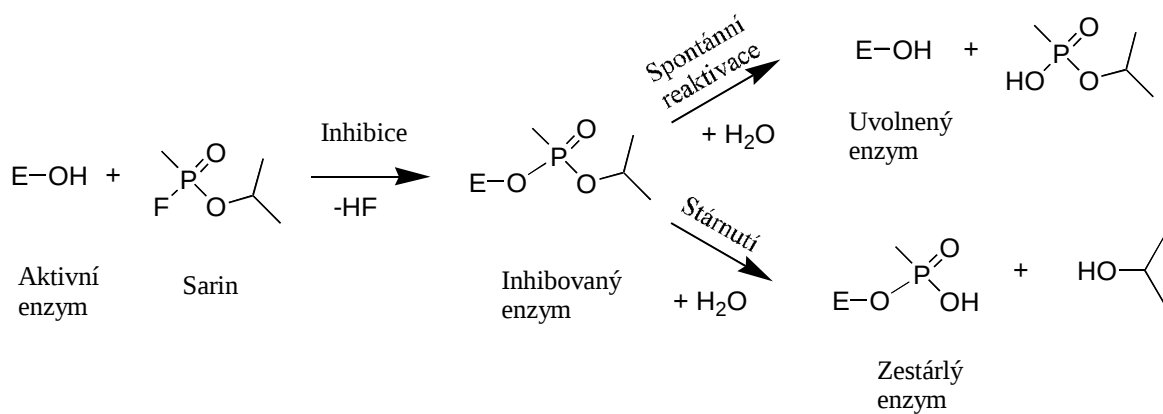


Malaoxon (Pesticid)

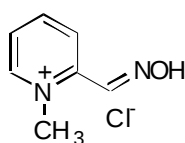


Chlorpyrifos (Pesticid)

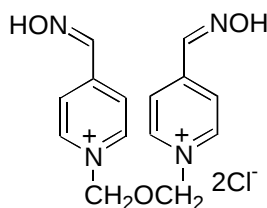
Obr. 1: Zástupci nervově paralytických látek a pesticidů



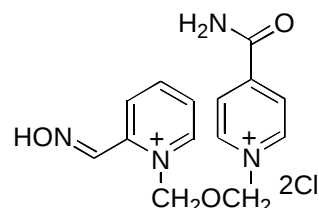
Obr. 2: Inhibice, spontánní reaktivace a stárnutí acetylcholinesterázy



Pralidoxim

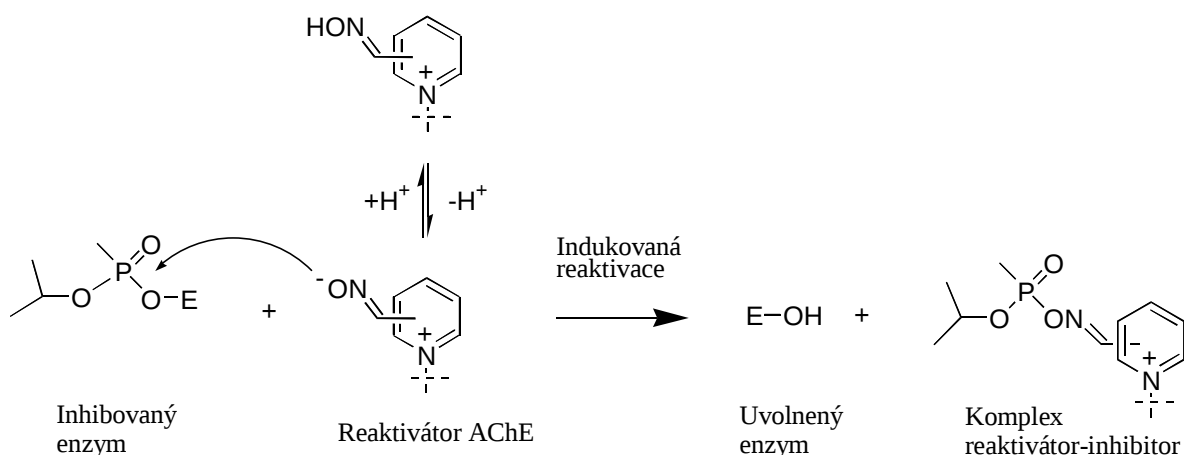


Obidoxim



HI-6

Obr. 3: Zástupci reaktivátorů acetylcholinesterázy



Obr. 4: Reaktivace acetylcholinesterázy inhibované sarinem

mová skupina při pH lidské krve disociuje a vzniklý oximátový anion je vlastním nukleofilem napadajícím vazbu O-P (obr. 4) (4).

Výsledkem reaktivčního procesu je uvolnění aktivního enzymu, který může opět plnit svou fyziologickou funkci, a komplexu reaktivátor AChE–inhibitor následně detoxikovaného organismem.

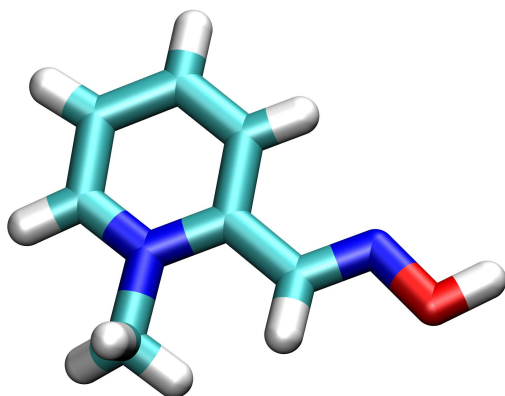
Protože pro zavedení nové látky do terapie je zapotřebí otestovat několik tisíc sloučenin, jsou intenzivně hledány způsoby jak tento proces zkrátit, zkvalitnit a snížit jeho ekonomickou náročnost. Mezi vědecké přístupy, které toto umožňují, patří počítačové modelování.

Trojrozměrná struktura molekul – nezbytný základ pro efektivní aplikaci počítačových metod

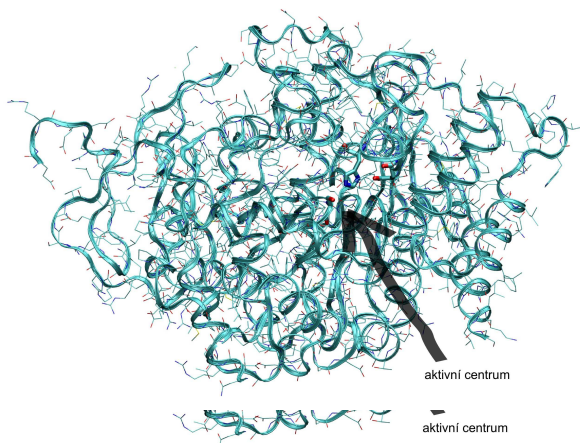
K tomu, abychom mohli použít pro řešení tak komplikovaného problému, jako je reaktivace, počítačové metody, potřebujeme mít hned na počátku co nejpřesnější informaci o rozložení atomů studovaného systému v prostoru, tedy trojrozměrnou (3-D) strukturu tohoto systému. Ideální je, když nám takovou informaci poskytne nějaká experimentální metoda. Existují v podstatě dvě metody, které nám mohou taková data nabídnout – rentgenová difrakce

a nukleární magnetická rezonance. Protože obě mají svá úskalí, může se stát, že 3-D strukturu musíme získat aplikací metod počítačových. Problém, s kterým se takto setkáváme, se dá charakterizovat jako převod molekuly ze dvou dimenzí (vzorec na papíře) do reálného světa tří dimenzí. Dnes je tato úloha vcelku uspokojivě vyřešena pro malé molekuly, v našem případě pro inhibitory a reaktivátory samotné. Postup vychází z rentgenostrukturních, ev. vysoce přesných teoretických *ab-initio* kvantověchemických dat o geometrii malých molekul. Tato data se průměrují pro každý atomový typ (jako je např. sp^2 uhlík) nebo pro větší fragmenty (např. karboxyl, aminoskupinu apod.). Při generování 3-D souřadnic se pak celková geometrie skládá z geometrií menších fragmentů získaných výše uvedeným způsobem (obr. 5a). Takto získané 3-D souřadnice nemusí vůbec být definitivní (postup je velmi necitlivý, např. ke konformačním stavům), a tak při generování 3-D souřadnic je třeba značné obezřetnosti zejména u konformačně bohatých molekul.

Podstatně komplikovanější je situace u velkých biopolymérů, v našem případě u AChE. Tam je nutné používat speciální metody daleko více závislé na experimentálních strukturních datech a na hledání analogie s nimi (homology modeling) (5–9). Příklad výsledné struktury AChE získané z dat rentgenové difrakce uvádí obrázek 5b.



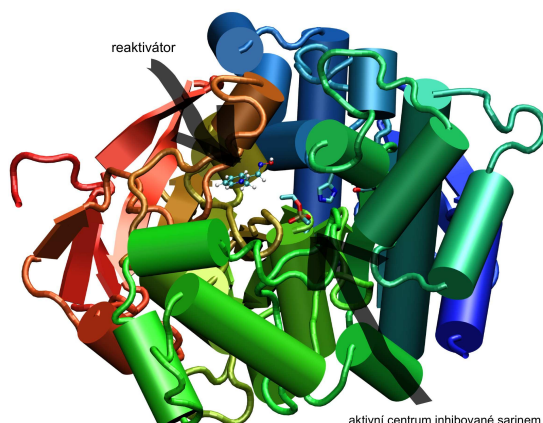
Obr. 5a): 3-D struktura reaktivátoru pralidoximu (2-PAM) z rentgenové krystalografie v trubičkové reprezentaci, kde je trubička umístěna do každé vazby.



Obr. 5b): 3-D struktura enzymu AChE z rentgenové krystalografie v téže reprezentaci se zviditelněnými aminokyselinami v aktivním místě; průběh proteinové páteře je zvýrazněn stužkou. Atomy uhlíku jsou značeny světle modře, dusík je tmavě modrý, kyslík červený a vodík šedý.

„Posazení“ substrátu či inhibitoru do aktivního místa enzymu

I když máme k dispozici 3-D strukturu enzymu a reaktivátoru, neznamená to ještě, že dokážeme jednoznačně určit strukturu jejich komplexu (obr. 6). Také tady je situace ideální v případě, že strukturu komplexu známe z aplikace NMR spektroskopie či rentgenové difrakce. Často tomu ale tak není a pak musíme k předpovědi struktury komplexu použít počítačové metody. Nejširší třídou jsou metody obecně označované jako „docking“. Ovšem tyto me-



Obr. 6: Struktura komplexu sarinem inhibované AChE spralidoximem – výsledek „dokování“ programem AutoDock (11). Z enzymu je vidět jen proteinová páteř (šroubovice jsou znázorněny válci, skládané listy širší stuhou a zbytek páteře trubičkou; průběh páteře je zvýrazněn postupným zbarvováním reprezentace barvami duhy) a aminokyseliny aktivního místa. Reaktivátor je znázorněn pro změnu tak, že každý atom je nahrazen kulíčkou a ty jsou spojeny trubičkami umístěnými do vazeb. Barevná konvence je stejná jako v předchozím obrázku, fosfor sarinu je hnědozelený.

tody jsou obvykle schopné generovat značné množství ne vždy relevantních řešení, jejichž spolehlivost se pak musí testovat dalšími omezujícími podmínkami. Prohledání stavového prostoru, kdy 2 molekuly tvoří komplex, představuje poměrně široký problém. Pokud budeme považovat obě molekuly za zcela rigidní, řešíme úlohu se šesti stupni volnosti (tři rotační a tři translační). Zahrneme-li ale ještě možné konformační změny obou molekul, stává se problém neřešitelným bez dalších omezení.

Algoritmy používané v současné době se v drtivé většině omezují pouze na zahrnutí konformačních změn malých ligandů (v našem případě reaktivátorů a inhibitorů) a hostitelské molekuly berou jako zcela rigidní. Při dokování je v hostitelské molekule vytvořen „negativní“ obraz aktivního místa (10) nebo je toto aktivní místo rozděleno pomocí mřížky (11). Dokovaná molekula je rozdělena na fragmenty zahrnující důležité funkční skupiny. Jednotlivé fragmenty jsou potom vkládány do obrazu aktivního místa a pomocí empirických silových polí (rovnice (2)) je počítána interakční energie vzniklého komplexu. Energeticky vhodné komplexy jsou dále vyhodnocovány. Molekulové dokování využívá pro generování vhodných komplexů známé metody

používané v molekulovém modelování i pro jiné účely. Mezi nejpoužívanější metody patří genetické algoritmy (12), Monte Carlo metody, simulované žíhání a distanční geometrie (6). Existují však také metody schopné předpovídat strukturu komplexů biopolymerů. Například pro hledání vhodných komplexů dvou nebo více proteinů se v současné době používá komplementarity tvarů těchto molekul se zahrnutím elektrostatických sil (13).

Simulační metody jako nástroj pro sledování molekulárního systému v čase

Metody molekulárního „docking“ uvedené v předchozím oddíle jsou statické, tj. neumožňují nám pohlížet na vývoj systému v čase, na chování molekul solventu, iontů, na jemné usazování reaktivá-

toru v aktivním místě a podobně. K tomu účelu byly vyvinuty počítačové simulační metody, z nichž nejdůležitější je molekulová dynamika (MD). Ta se snaží popsat reálné pohyby molekuly či molekulárního systému v čase. Na výpočet pozic a rychlostí jednotlivých atomů v čase jsou aplikovány Newtonovy pohybové rovnice klasické mechaniky (rovnice (1)) a pomocí nich se získá vždy další pozice a rychlost každého atomu na základě předchozí. Tak je produkována posloupnost jednotlivých stavů, která se nazývá trajektorie. U MD je trajektorie posloupnost stavů v čase.

Aby mohly být použity Newtonovy pohybové rovnice, je třeba znát síly působící na jednotlivé atomy v systému. Tyto síly se vypočítají jako derivace energie (rovnice (1)), která se získá výpočtem, např. pomocí empirického vztahu (rovnice (2)).

$$F_i(t) = m_i a_i(t) = m_i \frac{\partial^2 r_i(t)}{\partial t^2} = -\frac{\partial E}{\partial t^2} \quad (1),$$

$$E = \sum_{\text{vazby}} E_{\text{vazeb}} + \sum_{\text{vazebné úhly}} E_{\text{vaz.úhlů}} + \sum_{\text{torse}} E_{\text{tors.úhlů}} + \sum_{\text{nevazebné interakce}} E_{\text{nevaz.int. erakcí}} \quad (2)$$

kde:

$$E_{\text{vazeb}} = K_b (b - b_0)^2 \quad K_b \text{ je silová konstanta charakterizující sílu vazby, } b \text{ je vzdálenost mezi atomy a } b_0 \text{ je ideální vzdálenost mezi atomy}$$

$$E_{\text{vaz.úhlů}} = K_\Theta (\Theta - \Theta_0)^2 \quad K_\Theta \text{ je silová konstanta charakterizující vazebný úhel, } \Theta \text{ je hodnota vazebného úhlu a } \Theta_0 \text{ je ideální hodnota vazebného úhlu}$$

$$E_{\text{tors.úhlů}} = K_\chi (1 + \cos(n\chi - \delta)) \quad K_\chi \text{ je silová konstanta charakterizující torzní úhel, } n \text{ je četnost rotace torzního úhlu } \chi \text{ a } \delta \text{ je odchylka od ideální hodnoty}$$

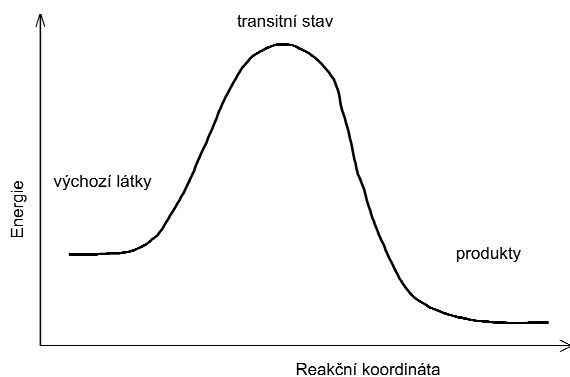
$$E_{\text{nevaz.int. erakcí}} = \varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{R_{\min ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{\min ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{\varepsilon_{ij}}$$

$R_{\min}$ je vzdálenost dvou atomů odpovídající minimální energii, r_{ij} je vzdálenost mezi atomy i a j , ε_{ij} je empirická konstanta silového pole (tato část vyjadřuje tzv. van der Waalovu interakci)
 q_i a q_j jsou elektrostatické náboje atomů i a j , r_{ij} je vzdálenost mezi těmito atomy a ε je dielektrická konstanta, která charakterizuje prostředí (tato část vyjadřuje interakci nábojů na atomech)

MD je metoda přísně deterministická, což znamená, že jakýkoli stav systému v budoucnosti se principiálně dá najít z jeho současného stavu. Naopak asi největší nevýhodou MD je velmi krátký časový krok kolem 1 fs (10^{-15} s), který je vynucen požadavkem dostatečné přesnosti výpočtu. To v praxi znamená, že pro plně solvované biopolymery lze pomocí současných počítačů simulovat časové úseky řádově desítky až stovky ns (10^{-9} s). Při kroku 1 fs znamená simulace trvající 1 ns provést výpočet pro jeden milion kroků, což může trvat v reálném čase i několik týdnů. Přestože simulovaný čas je zdánlivě krátký, lze v jeho průběhu vystopovat řadu významných vlastností molekulárního systému, jako je chování molekul solventu či iontů. Je-li systém na počátku výpočtu v dobře zvolené geometrii, lze za tento krátký časový úsek také „posadit“ reaktivátor do aktivního místa a podrobně analyzovat např. jeho interakce s jednotlivými rezidui enzymu.

Předpověď průběhu chemických reakcí (reaktivace) pomocí kvantové chemie

Chceme-li k předpovědi průběhu chemické reakce, tedy k předpovědi její kinetiky i termodynamiky, použít metody počítačového modelování, vycházíme z původního Fukuiho přístupu, tzv. „vnitřní reakční koordináty“ (Intrinsic Reaction Coordinate) (14). Ta je reprezentována jako sjednocení dvou cest. Jedna vede z tranzitního (přechodového) stavu cestou největšího (energetického) spádu směrem k výchozím látkám, druhá směrem k produktům reakce. Výchozí látky i produkty představují minima na této cestě, tranzitní stav je maximum (obr. 7).



Obr. 7: Schéma reaktivační reakce

Na tomto místě je vhodné podotknout, že zatímco z hlediska experimentátora je zájem většinou soustředěn na výchozí či koncové energetické minimum, zájem počítačového chemika je obrácen do značné míry k tranzitnímu stavu, jehož znalost je pro něho daleko cennější. Je totiž daleko snazší nalézt vhodné cesty z tranzitního stavu do sousedních energetických minim než cesty opačné. Platí to i při studiu reaktivace AChE.

Vypočítáme-li energie obou minim a energii maxima, známe vlastně kinetiku i termodynamiku dané reakce a tím dokážeme z výpočtu odhadnout, která látka bude lepším a která horším reaktivátorem. Problém je v tom, že energii nelze v tomto případě počítat jednoduchým vztahem, jako je např. rovnice (2), ale musíme použít metody kvantověchemické, které jsou podstatně časově náročnější.

Výpočetní chemie používá dvě základní kategorie kvantověchemických metod, *ab-initio* a semiempirické. *Ab-initio* metody jsou schopné reprodukovat experimentální data bez použití empirických parametrů. Kvalita výsledků je závislá na velikosti báze (6), tj. přesnosti aproximativního vystižení vlnové funkce, a na použité úrovni teorie. Obecně platí, že čím větší je počet funkcí báze, tím delší je výpočetní čas. Obecně ale nemusí platit, že čím větší je báze, tím lepší bude shoda výsledků s experimentem (5). Je tomu tak proto, že při použití menší báze může dojít k náhodnému zrušení chyb s opačnými znaménky a „opticky“ pak výsledky vypadají přesnější (15).

Základním omezením *ab-initio* metod, zvláště těch, které používají velké báze a vysokou úroveň teorie, je značná časová náročnost a požadavky na paměť počítače. To v praxi znamená, že tyto metody jsou dnes prakticky aplikovatelné pouze na velmi malé systémy (pouze několik desítek nevodíkových atomů; vodíkové atomy jsou pro kvantověchemické metody „levné“, protože obsahují málo orbitalů). Tento nedostatek částečně odstraňují tzv. semiempirické kvantově chemické metody. Ty explicitně zahrnují pouze valenční elektrony (na rozdíl od *ab-initio*, které zahrnují všechny elektrony). Příspěvek všech dalších elektronů stejně jako hodnoty některých integrálů potřebných při výpočtu finálních molekulových orbitalů jsou substituovány empirickými parametry. Ty jsou získány buď experimentálními hodnotami nebo vysoce přesnými *ab-initio* metodami. Semiempirické metody umožňují v současné době řešit systémy, jejichž velikost přesahuje

1000 atomů. Ovšem při použití těchto metod je potřeba mít na paměti jejich možné závažné nedostatky, zejména při modelování tranzitních stavů chemických reakcí.

Závěr, výhledy do budoucnosti

Postupy molekulárního modelování jsou široce využívány a rozvíjeny dnes už ve všech oblastech kvalifikované chemie, tedy nejen v tradičních doménách, jako je farmacie a chemie materiálů, ale také v biotechnologiích a řadě dalších oblastí. Tyto metody jsou používány farmaceutickými koncerny při vývoji nových léčiv. Provázání počítačových metod s výsledky biologického testování umožňuje racionálnější přístup při návrhu nových účinných terapeutických substancí. Aplikaci těchto metod jsme se snažili přiblížit na jednom příkladu reaktivace acetylcholinesterázy, ale existuje podstatně více aplikací a počítačové modelování a simulace mají svůj zenit jistě ještě před sebou i v oblasti výzkumu bojových látek a ochrany před nimi.

Za účelem zkvalitnění současného vojenského výzkumu v oblasti vývoje antidotů užívaných při otravách nervově paralytickými látkami využívá katedra toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v současnosti technologie počítačového modelování prostřednictvím spolupráce s Národním centrem pro výzkum biomolekul Masarykovy univerzity v Brně.

Literatura

1. BAJGAR, J. Organophosphates/nerve agents poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis and treatment. *Adv. Clin. Chem.*, 2004, vol. 38, p. 151–216.
2. PATOČKA, J. – KUČA, K. – JUN, D. Acetylcholinesterase: crucial enzyme of human body. *Acta Medica* (Hradec Kralove), 2004, vol. 47, p. 215–230.
3. KASSA, J. Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 2002, vol. 40, p. 803–816.
4. KUČA, K., et al. Synthesis of a new reactivator of tabun inhibited acetylcholinesterase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, vol. 13, p. 3545–3547.
5. HOLTJE, HD. – FOLKERS, G. *Molecular Modeling. Basic Principles and Applications*. New York, 1996.
6. LEACH, AR. *Molecular Modelling: Principles and Applications*. 2nd ed. Dorchester, Prentice Hall, 2001.
7. SALI, A. – BLUNDELL, TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, 1993, vol. 234, p. 779–815.
8. MARTI-RENO, MA., et al. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2000, vol. 29, p. 291–325.
9. SCHWEDE, T., et al. An automated protein homology-modeling server. *Nucl. Acids Res.*, 2003, vol. 31, p. 3381–3385.
10. KUNTZ, ID. – MOUSTAKAS, DT. – LANG, PT. *DOCK Version 5.2*. San Francisco, University of California, 2005.
11. MORRIS, GM., et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.*, 1998, vol. 19, p. 1639–1662.
12. JENSEN, F. *Introduction to Computational Chemistry*. Chichester, John Wiley and Sons, 2001.
13. GABB, HA. – JACKSON, RM. – STERNBERG, MJE. Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics, and biochemical information. *J. Mol. Biol.*, 1997, vol. 272, p. 106–120.
14. FUKUI, K. A formulation of the reaction coordinate. *J. Phys. Chem.*, 1970, vol. 74, p. 4161–4163.
15. FORESMAN, JB. *Exploring chemistry with electronic structure methods*. Pittsburgh, Gaussian, 1996.

Korespondence: Mgr. Jiří Wiesner
Přírodovědecká fakulta MU
Národní centrum pro výzkum biomolekul
Kotlářská 2
611 37 Brno
e-mail: jiriwiesner@mail.muni.cz

Do redakce došlo 25. 11. 2005