

DIFERENCIACE NERVOVĚ PARALYTICKÝCH BOJOVÝCH CHEMICKÝCH LÁTEK POMOCÍ BIOCHEMICKÉ METODY

DIFFERENTIATION OF NERVE AGENTS BY BIOCHEMICAL METHOD

Monika HOSKOVCOVÁ
monika.hoskovcova@unob.cz

Abstract

Biochemical method is appointed for detection of organophosphorus nerve agents presence. It is based on choline esterases inhibition. It is group reaction, so it does not enable selective differentiation of individualities. From chromogenic modifications is usually used Ellman's reaction, which is constituted for detection of developed thiol, which is presented by color change. Using of mono or bispyridinium oximes can be the way how to differentiate members of nerve agents. Their use is limited by application before dealkylation of enzyme-inhibitor complex and afterwards by appropriate mathematical evaluation.

Key words

Acetylcholinesterase reactivation, biochemical method, Ellman's reagent, nerve agents.

ÚVOD

Přítomnost nervově paralytických látek (NPL) je nejčastěji potvrzována na základě biochemické reakce. Reakce využívá cílového účinku těchto látek v lidském organismu, tedy schopnosti snižovat aktivitu cholinových esteráz. Jedná se o metodu specifickou, která nebyla svojí citlivostí zatím překonána. Umožňuje stanovení řádově $1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-7}$ mg.cm⁻³ vzorku v roztoku, popř. 1 l vzduchu v závislosti na druhu nervově paralytické látky. Tato citlivost je až o pět řádů vyšší ve srovnání s metodami založenými na chemickém principu. [1]

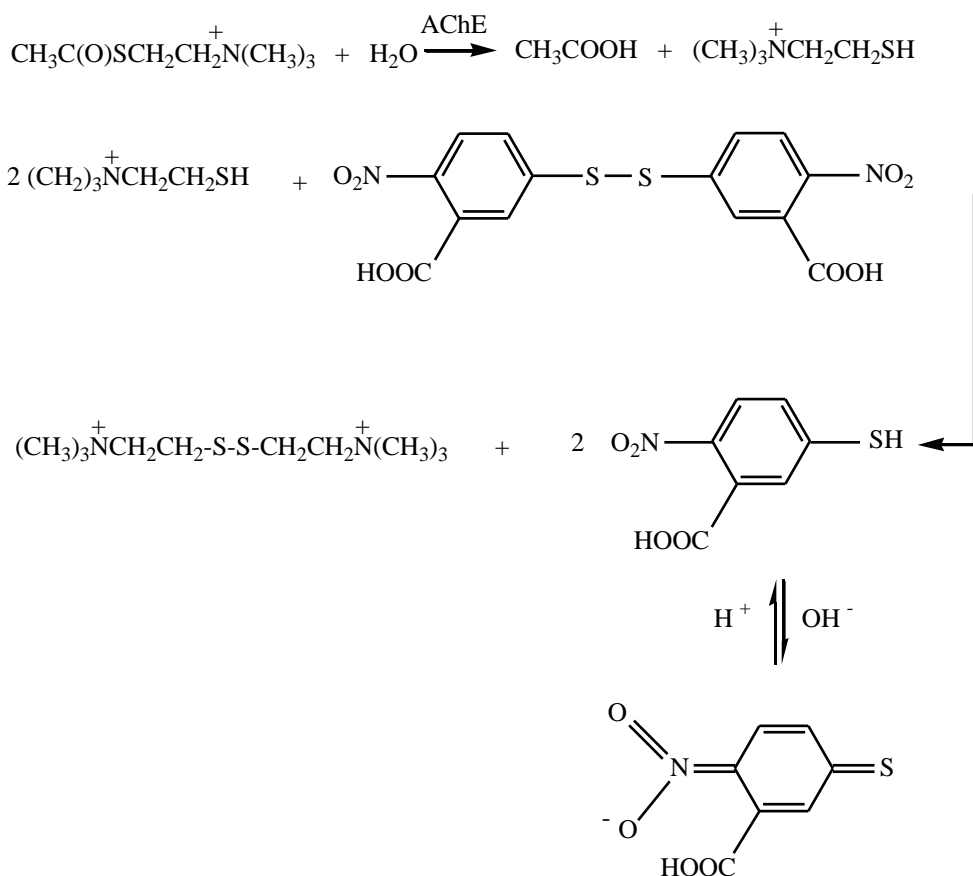
Po dobu svého využívání se dočkala řady modifikací s různým způsobem vyhodnocování. Stanovován je průběh enzymatické hydrolýzy substrátu acetylcholinu, popř. butyrylcholinu v přítomnosti katalyzátoru acetylcholinesterázy, nebo butyrylcholinesterázy. Široké zastoupení měly pH-metrické metody založené na měření koncentrace vznikající kyseliny v kombinaci s acidobazickými indikátory a pufrů nebo zakončené alkalimetrickou titrací. [2] Vypracované byly způsoby manometrického, fluorometrického, kolorimetrického a spektrofotometrického vyhodnocení nebo elektrochemické metody jako potenciometrie, amperometrie, coulometrie nebo voltametrická indikace. [3] Časté je využívání tzv. chromogenních substrátů. Ty jsou běžně používány u fotometrických metod, které sledují změny zabarvení vznikající jako důsledek reakcí produktů hydrolýzy s chromogenními činidly. [4]

Jak již bylo poznamenáno, výhodou enzymatických metod pro stanovení organofosforových sloučenin je jejich značná citlivost a také specifčnost. Nároky na provedení analýzy jsou ve srovnání s běžnými analytickými metodami nižší a jejich cena také. Z těchto důvodů se uplatňují čím dál častěji např. při kontrole kontaminace prostředí.

Vedle těchto metod jsou ale využívány i další, ve kterých je jako substrát využíván samotný organofosfát. V tomto případě jde o neinhibiční způsob stanovení. Za tímto účelem jsou používány některé hydrolázy, jako organofosforová hydroláza nebo organofosforová

kyselá anhydroláza, které hydrolyzují sloučeniny obsahující vazby P-S, P-F, P-O nebo P-CN. [5, 6]

V tomto příspěvku nemám v úmyslu vyjmenovat veškeré aplikace biochemické metody, ale seznámit zájemce s další modifikací, v klinické biochemii asi historicky nejužívanější biochemické metody, využívající tzv. Ellmanova činidla. Tato metoda byla původně vypracována pro detekci thiolů. Proto byl upraven i původní substrát acetylcholin, popř. butyrylcholin tak, aby ve své struktuře obsahoval vázanou síru, tedy na acetylthiocholin nebo butyrylthiocholin. [7, 8] Principem metody je tudíž hydrolýza thiocholinu za uvolnění příslušné kyseliny a thiocholinu. Vzniklý thiocholin lze detekovat pomocí kyseliny 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoové), nazývané Ellmanovým činidlem. Štěpení substrátu je indikováno žlutým zabarvením jako důsledek vzniku redukované formy tohoto činidla. Tím je umožněna spektrofotometrická detekce při 412 nm. Pravděpodobné schéma reakce je znázorněno na Obr. 1.



Obr. 1

Reakční mechanismus štěpení acetylthiocholinu enzymem acetylcholinesterázou s následnou detekcí pomocí Ellmanova činidla

Na této metodě je založena celá řada prostředků chemického průzkumu a kontroly využívaných v AČR. Jedná se např. o detekční průkazníkovou trubičku PT 44/2 nebo detektor nervově paralytických látek Detehit. [9, 10] Právě Detehit byl námi využit pro rozšíření možností v detekci nervově paralytických látek. Jedná se o strip skládající se ze zóny s bavlněnou textilií s imobilizovanou a stabilizovanou acetylcholinesterázou a detekčního papíru s acetylthiocholin jodidem a kyselinou 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoovou). Acetylcholinesteráza je imobilizována jako stabilní enzymová chiméra s polysacharidem celulózou. Enzym zůstává v tuhé fázi a jeho použití je tedy polyvalentní. Výhodou je možnost odstranění přebytku činidel, která působí na enzym prostým vymytím textilie vodou. [10] Nevýhodou se může jevit časová náročnost použité metody ve srovnání s instrumentálními metodami.

Biochemická metoda je ve své podstatě metodou skupinovou, při které nelze odlišit jednotlivé inhibitory esteráz. Případné využití bavlněné textilie s imobilizovaným enzymem ukazuje možnosti v selektivním rozlišení jednotlivých nervově paralytických látek, a to ještě před vznikem tzv. nereaktivovatelné formy fosforylovaného enzymu. Za tímto účelem je inhibovaný enzym vystaven působení nukleofilních činidel. Tato činidla obnovují funkci enzymu vyvázáním inhibitoru z jeho aktivního centra. V klinické praxi jsou využívány sloučeniny na bázi mono nebo bispyridiniových aldoximů. [11] Jejich účinnost při reaktivaci inhibovaného enzymu je různá a závisí na mnoha faktorech, jako jsou struktura, počet a umístění funkčních skupin a kationických míst, počet pyridiniových jader atd., ale hlavně druh inhibitoru. [12–14] Díky těmto vlivům neexistuje širokospektrální reaktivátor, který by byl schopen účinně působit na enzym inhibovaný kteroukoli nervově paralytickou látkou. Co působí v antidotní terapii značné obtíže, lze využít pro stanovení daného organofosfátu. Právě rozdílná účinnost těchto nukleofilních látek vůči charakteristickým enzym-inhibitorovým komplexům může být určující pro rozlišení inhibitorů. Toto rozlišení bylo provedeno pomocí Umělých neuronových sítí (ANN, Artificial Neural Networks). Základ v této oblasti byl položen již v roce 1943, velký rozvoj byl však zaznamenán v 80. letech minulého století a pokračuje dodnes. [15]

ANN se využívají v případech, kdy při řešení daného problému není možné matematicky popsat všechny vztahy a souvislosti, které ovlivňují sledovaný proces. Síť jsou také využívány v případě, že se matematický model podaří sestavit, ale je tak složitý, že případná algoritmizace úlohy je téměř nemožná. Jedná se zejména o složité a silně nelineární systémy. ANN jsou uplatňovány ve stále větším počtu rozmanitých oborů např. u rekonstrukcí poškozených vzorů, klasifikačních úloh, predikcí, aproximací, extrapolací, rozpoznávání obrazců a dalších oblastech. Jsou využívány v různých průmyslových a vědeckých oblastech, svoje místo mají například právě v biochemii. [16–19]

Mezi velké výhody ANN patří schopnost učit se. To znamená získávat znalosti učením pomocí předkládaných vzorů bez nutnosti znalosti algoritmu řešení. U biologických neuronových sítí je proces učení procesem, při kterém má organismus schopnost zhodnotit výsledky opakované adaptace a při změně prostředí se obrací ke své paměti. Jak vyplývá z předchozího, vzorem pro ANN byla tedy stavba funkčních buněk nervového systému živých organismů – neuronů. Ten je také základní stavební jednotkou těchto sítí. [15]

Neuron plní funkci výpočetní jednotky, která má vstupy, výstupy, vnitřní stavy, zpracovává vstupní data a vytváří odpovídající výstup. Každý vstup je ohodnocen vahou. Právě hodnoty vah určují správné chování neuronu a tedy i celé sítě a jejich nastavení je úkolem učení. Kvalita nastavení vah tak ovlivňuje chování sítě. Metody, které jsou při nastavování využívány, jsou iterační a liší se podle typu sítě. Funkce jednoho neuronu je natolik jednoduchá, že nedokáže sama o sobě řešit složitější úlohy a proto se vytváří celá síť neuronů, které jsou mezi sebou propojeny. Takto vzniklá síť má již schopnost řešit náročné úlohy. Mezi základní typy ANN patří vícevrstvé perceptronové sítě (MLP), síť Radial Basic Function (RBF),

Kohenova síť, lineární síť a Bayesovské síť. Výběr sítě závisí na typu řešené úlohy a na charakteru dat. [20] Je mnohdy obtížný, vyžaduje zkušenost a často je třeba experimentovat s několika druhy sítí.

METODA

Za účelem odlišení vybraných organofosforových inhibitorů byly proměřeny změny v intenzitě zabarvení detekční textilie s imobilizovaným a stabilizovaným enzymem po expozici nervově paralytickým látkám a následném působení mono nebo bispyridiniových aldoximů. Výběr reaktivátorů byl omezen na ty, které jsou v praxi nejužívanější. Jednalo se o pralidoxim (2-hydroxyiminomethyl-1-methylpyridinium jodid, 2-PAM), methoxim (*N,N'*-monomethylenebis(4-pyridiniumaldoxim) dibromid, MMB-4) a jejich strukturální homology – *N,N'*-dimethylenebis(4-pyridiniumaldoxim) dibromid, *N,N'*-trimethylenebis(4-pyridiniumaldoxim) dibromid (TMB-4), *N,N'*-tetramethylenebis(4-pyridiniumaldoxim) dibromid, *N,N'*-pentamethylenebis(4-pyridiniumaldoxim) dibromid a HI-6 (1-(2-hydroxyaminomethylpyridinium)-3-(4-karbamoylpyridinium)-2-oxapropán dichlorid). Získány byly od firmy Kroupa-Balex, s.r.o., Pardubice, Česká republika.

Z původně studovaných koncentrací v rozmezí 0,5–0,01 mg.cm⁻³ byla jako nejrepresentativnější vybrána koncentrace 0,1 mg.cm⁻³ a doba působení reaktivátoru 15 minut.

Z inhibitorů byly použity nejvýznamnější nervově paralytické látky sarin (isopropylmethylfosfonofluoridát, GB), soman (1,2,2-trimethylpropylmethylfosfonofluoridát, GD), tabun (ethyl-dimethylfosforamidokyanidát, GA), cyklosarin (*O*-cyklohexylmethylfosfonofluoridát, GF), látka VX (*S*-[2-(diisopropylamino)ethyl]-*O*-ethylmethylfosfonothioát) a její ruský analog R-33 (*S*-[2-(diethylamino)ethyl]-*O*-isobutylmethylfosfonothioát). Bojové chemické látky byly získány ve VOZ 072, Zemianské Kostolany, Slovenská republika a VVÚ Brno, Česká republika.

Textilie s imobilizovanou acetylcholinesterázou AChE [EC 3.1.1.7] a indikační papír s acetylthiocholin jodidem a kyselinou 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoovou) byly zakoupeny od firmy ORITEST s.r.o., Praha, Česká republika.

Intenzita zabarvení bavlněné textilie odpovídající aktivitě enzymu byla proměřována na spektrometru Ultra Scan XE, Hunter Lab Reston VA, USA, v rozsahu vlnových délek 380–750 nm.

VÝSLEDKY A DISKUZE

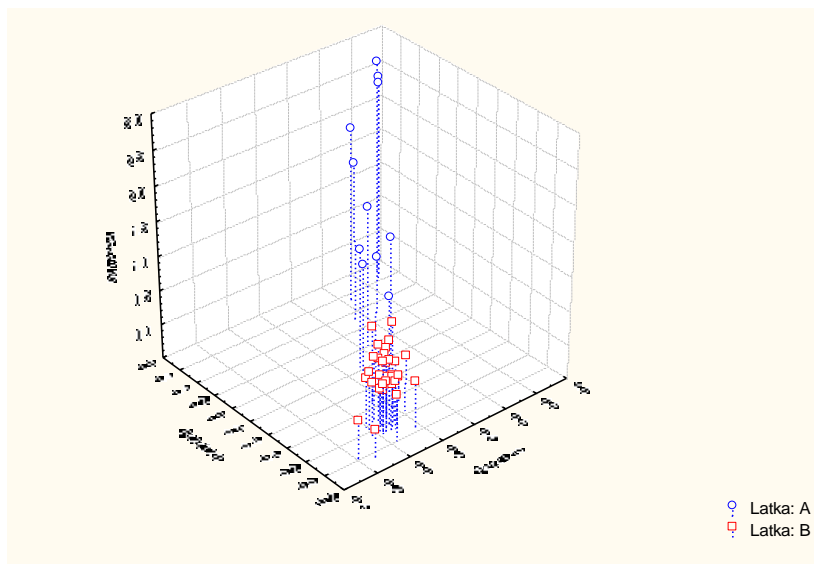
Proměřeny byly změny zabarvení textilie s imobilizovaným enzymem v celém spektru vlnových délek ve viditelné oblasti elektromagnetického záření, tzn. od 380 nm do 750 nm. Původně byla prováděna měření s dobou působení reaktivátoru 10, 15 nebo 20 minut. Jako nejvýhodnější byla vybrána délka reaktivace 15 minut, při níž byly hodnoty reaktivace nejvýznamnější. Měření bylo prováděno po celou dobu průběhu biochemické reakce minimálně do dvou minut. To umožnilo kvalitativně postihnout veškeré změny v intenzitě vybarvení reakční zóny textilie. Tyto změny se na základě neuronové analýzy zdají být charakteristické pro daný typ inhibitoru a markantní jsou do první minuty průběhu Ellmanovy reakce.

Bylo zjištěno, že na základě účinnosti reaktivace je možné ze skupiny nervově paralytických látek bez problémů rozlišit pouze sarin, jak je zdokumentováno na Obr. 2. Zde jsou hodnoty výrazně odlišné od ostatních výsledků. Obnovení enzymu inhibovaného dalšími studovanými inhibitory je již obtížnější. To naprosto koresponduje i s dalšími studiemi. Je to způsobeno nižší účinností těchto reaktivátorů vůči enzym-inhibitorovým komplexům. Tento jev byl pozorován zejména u acetylcholinesterázy inhibované somanem, tabunem, látkou VX a

látkou R-33, kde byly, vedle nízké účinnosti reaktivátorů, zjištěny jen málo významné rozdíly. V případě somanu je pravděpodobný rychlý vznik dealkylované formy fosforylovaného enzymu. Zde se již neprojevuje vliv nukleofilních činidel. Enzym inhibovaný tabunem je podle studie Jokanovic et al. [21] obtížné reaktivovat díky existenci volného elektronového páru na amidickém dusíku, který znesnadňuje nukleofilní působení reaktivátorů, a podle krystalografické studie Ekström et al. [22] je tento komplex ovlivněn dalšími residui v aktivním centru enzymu, které způsobují strukturní změny vedoucí ke zmenšení rozměrů této dutiny. Tento fakt může vést k neschopnosti objemnějších molekul proniknout k místu vazby inhibitoru v esteratickém centru.

Z výše popsaných důvodů není možné odlišit jednotlivé inhibitory na základě účinnosti jednotlivých reaktivátorů, ale je nutné využít vhodný matematický model; tím jsou ANN. Mezi nejnámější a nejpoužívanější neuronové sítě patří MLP. Je to síť s učitelem, tj. trénovací vzory musí kromě vstupních hodnot obsahovat i hodnoty příslušných odpovídajících výstupů. Cílem tohoto učení je nastavení sítě takovým způsobem, aby byly výsledky přesné. Síť se skládá z několika vrstev perceptronů – vstupní vrstvy, výstupní vrstvy a může obsahovat i několik skrytých vrstev. Perceptrony jednotlivých sousedících vrstev jsou mezi sebou vzájemně propojeny, tj. výstup jednoho neuronu je distribuován do vstupů všech perceptronů následující vrstvy. K tomu aby síť správně fungovala, musí být vhodně nastaveny váhy sítě. Váhou je vyjádřena zkušenost. Způsob, jak nastavit tyto váhy, je předmětem učení sítě. Pro MLP existuje řada propracovaných metod učení. K základní patří metoda zpětného šíření chyby, tzv. backpropagation. Po naučení je síť schopna vybavovat si vzory, odhadovat další vývoj a v našem případě správně klasifikovat výstupní proměnnou. [23] Tato síť byla použita i v tomto případě.

Pro analýzu byl vybrán zástupce oximů – HI-6. Hodnocen je vždy jeden použitý inhibitor ze souboru tří látek. Výsledky ANN jsou pro vybraný reaktivátor uvedeny v tabulce 1.



Obr. 2

Rozlišení nervově paralytických látek na základě schopnosti oximových reaktivátorů obnovit enzym-inhibitorové komplexy Latka A – sarin, Latka B – soman, tabun, cyklosarin, VX, R-33

Struktura ANN je v tabulce charakterizována ve druhém sloupci. Jednotlivé hodnoty značí vrstvy a jsou odděleny dvojtečkami. Tato síť obsahuje vstupní, skryté a výstupní vrstvy perceptronů. Skrytých vrstev bylo v této síti vytvořeno více (zde tři). Počet případů vstupujících do analýzy je pro jednotlivé vrstvy znázorněn ve čtvrtém sloupci. Z uvedené tabulky je patrná vysoká přesnost a vhodnost vybrané ANN pro tento analytický model. Počet správně určených případů je uveden v %. Hodnoty správně určené NPL ze souboru zde dosahují hodnot nejméně 98 %.

Tabulka 1

Výsledky neuronové analýzy pro trojice inhibitorů a reaktivátor HI-6
Koncentrace HI-6 0,1 mg.cm⁻³, doba reaktivace enzym-inhibitorového komplexu 15 min.

NPL ^a	Charakteristika ANN MLP ^b	Celkem případů ^c	Správně určené případy ^d	Chybně určené případy ^e	Správně určené případy, % ^f
GA:GF:R-33	40:58-10-3:1	149:172:99	149:170:98	0:2:1	99.3
GA:GF:VX	40:58-8-3:1	149:173:112	149:172:110	0:1:2	99.3
GA:R-33:VX	40:58-8-3:1	149:100:115	148:98:115	1:2:0	99.2
GA:GB:GF	40:58-8-3:1	152:202:164	151:202:163	1:0:1	99.6
GB:GA:R-33	40:58-18-3:1	149:200:99	147:200:97	2:0:2	99.1
GB:GA:VX	40:58-22-3:1	201:149:112	201:149:110	0:0:2	99.6
GB:GD:GA	40: 58-11-3:1	200:94:154	200:93:154	0:1:0	99.6
GA:GF:R-33	40:58-8-3:1	196:94:172	195:93:171	1:1:1	99.4
GB:GD:R-33	40:58-20-3:1	195:95:102	195:95:101	0:0:1	99.7
GB:GD:VX	40:58-10-3:1	197:94:115	197:94:113	0:0:2	99.5
GB:GF:R-33	40:58-24-3:1	196:172:94	195:172:93	1:0:1	99.6
GB:GF:VX	40:58-14-3:1	195:170:111	195:170:110	0:0:1	99.8
GB:R-33:VX	40:58-8-3:1	197:94:115	197:94:113	0:0:2	99.5
GD:GA:GF	40:58-8-3:1	94:154:172	94:152:172	0:2:0	99.5
GD:GA:R-33	40:58-22-3:1	94:155:101	94:153:97	0:2:4	98.3
GA:GD:VX	40:58-8-3:1	154:96:105	152:96:104	2:0:1	98.2
GD:GF:R-33	40:58-23-3:1	94:169:101	92:169:99	2:0:2	98.9
GD:GF:VX	40:58-9-3:1	95:167:116	95:166:114	0:1:2	99.2
GD:R-33:VX	40:58-23-3:1	95:101:112	94:100:112	1:1:0	99.4

^aNPL = nervově paralytické látky,

^bCharakteristika neuronové sítě MLP = identifikace počtu neuronů v jednotlivých vrstvách – vstup : skryté : výstup.

^cCelkem případů = trénovací soubor experimentálních dat, tzn. hodnoty odrazu povrchu textilie závislé na průběhu Ellmanovy reakce v čase a vlnové délce.

^dSprávně určené případy = počet správně určených případů látek (inhibitor), porovnané s případy trénovací sítě.

^eChybně určené případy = počet nesprávně určených případů látek (inhibitor), porovnané s případy trénovací sítě.

^fSprávně určené případy, % = procentuální vyjádření správně určených případů.

ZÁVĚR

Rozlišení jednotlivých organofosforových nervově paralytických látek je možné provést s využitím kolorimetrického biosenzoru s imobilizovanou acetylcholinesterázou s následnou reakcí s nukleofilními činidly, zde mono nebo bispyridiniovými oximy. Spolehlivého rozlišení bylo dosaženo porovnáním spektrálních dat remise povrchu bavlněného nosiče. Vyhodnocení bylo provedeno klasifikační metodou umělých neuronových sítí. Ukazuje se, že metoda umělých neuronových sítí je pro analýzu spektrálních dat vhodná. Při analýze organofosfátů je tak umožněno s poměrně vysokou pravděpodobností selektovat daný inhibitor ze skupiny nervově paralytických látek.

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Mgr. Pavlu Dubinovi z VVÚ v Brně za pomoc při zpracování matematického modelu analýzy.

LITERATURA

- [1] HALÁMEK, E., Z. KOBLIHA a V. PITSCHMANN. Organophosphorus chemical warfare agents. In: HALÁMEK, E., Z. KOBLIHA a V. PITSCHMANN. *Analysis of chemical warfare agents*. University of Defence, Institute of NBC Defence, 2009, s. 63–69. ISBN 978-80-7231-658-8.
- [2] TOMEČEK, I. a J. MATOUŠEK. *Analýza bojových otravných látek*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1961, s. 121–135.
- [3] ARDUINI, F., A. AMINE, D. MOSCONE a G. PALLESCHI. Biosensors based on cholinesterase inhibition for insecticides nerve agents and aflatoxin B1 detection (review). *Microchim. Acta*. 2010, 170 (3-4), s. 193–221. ISSN 0026-3672.
- [4] HOSKOVCOVÁ, M. a Z. KOBLIHA. Modified Cholinesterase Technology in the Construction of Biosensors for Organophosphorus Nerve Agents and pesticides Detection, In: SOMERSET, V. *Environmental biosensors*. Intech, Croatia, 2011, s. 65–94. ISBN 978-953-307-486-3.
- [5] WANG, J., R. KRAUSE, K. BLOCK, M. MUSAMEH, A. MULCHANDANI a M. J. SCHÖNING. Flow injection amperometric detection of OP nerve agents based on an organophosphorus-hydrolase biosensor detector. *Biosens. Bioelect.* 2003, 18 (2-3), s. 255–260. ISSN 0956-5663.
- [6] JOSHI, K. A., M. PROUZA, M. KUM, J. WANG, J. TANG, R. HADDON, W. CHEN a A. MULCHANDANI. V-type nerve agent detection using a carbon nanotube-based amperometric enzyme electrode. *Anal. l. Chem.* 2006, 78 (1), s. 331–336. ISSN 0003-2700.
- [7] ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Bioph.* 1959, 82, s. 70–77.
- [8] ELLMAN, G. L., K. D. COURTNEY, V. ANDRES jr. a R. M. FEATHERSTONE. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharm.* 1961, 7, s. 88–95.
- [9] TUŠAROVÁ, I., E. HALÁMEK a J. OREL. Detekční trubička inhibitorů cholinesteráz ve vzduchu a vodě. Patent CZ 285242, 1999.
- [10] TUŠAROVÁ, I. a E. HALÁMEK. Biosenzor pro detekci a rozlišení inhibitorů cholinesteráz, způsob přípravy zóny biosenzoru s imobilizovanou cholinesterázou, způsob detekce cholinesteráz a způsob rozlišení inhibitorů esteráz. Patent CZ 288576, 2001.

- [11] MILATOVIĆ, D. a M. JOKANOVIĆ. Pyridinium Oximes as Cholinesterase Reactivators in the Treatment of OP Poisoning. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. Gupta R. C. Elsevier, U. K., 2009, s. 985–996.
- [12] WHITELEY, C. G. a D. S. NGWENYA. Protein ligand interactions 7 halogenated pyridinium salts as inhibitors of acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1995, 36 (5), s. 1107–1116.
- [13] PANG, Y. P., T. M. KOLLMAYER, F. HONG, J. C. LEE, P. I. HAMMOND, S. P. HAUGABOUK a S. BRIMIJOIN. Rational design of alkylene-linked bis-pyridiniumaldoximes as improved acetylcholinesterase reactivators. *Chem. Biol.* 2003, 10 (6), s. 491–502.
- [14] HEATH, D. F. *Organophosphorus compounds; Anticholinesterases and related compounds*. Oxford: Pergamon Press, 1961.
- [15] DRÁBEK, O., P. SEIDL a I. TAUFER. Umělé neuronové sítě – základy teorie a aplikace (1). *Chemagazín*. 2005, 4, s. 32–34.
- [16] WIDROW, B., D. E. RUMELHART a M. A. LEHR. Neural Networks: Applications in industry, business and science. *Commun. ACM*. 1994, 37, s. 93–105.
- [17] NOBLE, P. A., J. S. ALMEIDA a CH. R. LOVELL. Application of neural computing methods for interpreting phospholipid fatty acid profiles of natural microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, s. 694–699.
- [18] GOODACRE, R., A. KARIM, M. A. KADERBHAI a D. B. KELL. Rapid and quantitative analysis of recombinant protein expression using pyrolysis mass spectrometry and artificial neural networks: application to mammalian cytochrome b5 ai *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 1994, 34, s. 185–193.
- [19] MAGNOTTA, V. A., N. C. ANDREASEN, T. CIZADLO, P. WESTMORELAND CORSON, J. C. EHRHARDT a W. T. C. YUH. Measurement of brain structures with artificial neural networks: two and free-dimensional applications. *Radiology*. 1999, 211, s. 781–790.
- [20] NOVÁK, M. a kol. *Umělé neuronové sítě, teorie a aplikace*. Praha: C. H. Beck, 1998.
- [21] JOKANOVIĆ, M., M. MAKSIMOVIC, V. KILIBARDA, D. JOVANOVIĆ a D. SAVIC. Oxime-induced reactivation of acetylcholinesterase inhibited by phosphoramides. *Toxicol. Lett.* 1996, 85, s. 35–39.
- [22] EKSTRÖM, F. J., C. ASTOT a Y. P. PANG. Novel nerve-agent antidote design based on crystallographic and mass spectrometric analyses of tabun conjugated acetylcholinesterase in complex with antidotes. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2007, 82, 282–293.
- [23] BISHOP, C. M. *Neural networks for pattern recognition*. New York, USA: Oxford University Press Inc., 1995. p. 482.