

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie
Klinická a toxikologická analýza

Metabolismus některých vybraných donorů oxidu dusnatého

Diplomová práce

Alena Stibingerová

Školitel: Prof. RNDr. Gustav Entlicher, CSc.

Praha 2007

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením Prof. RNDr. Gustava Entlichera CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze dne 27. 3. 2007

.....
S. G. G. G. G.
podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli, panu Prof. RNDr. Gustavu Entlicherovi CSc., za jeho pomoc, trpělivost a za čas, který věnoval mně i mé práci.

Dále bych ráda poděkovala paní Marcele Špundové, která mi vždy s ochotou pomohla a poradila a také celému kolektivu laboratoře 209 za příjemnou atmosféru, kterou mi během mého studia vytvořili.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, která mi vždy pomohla a umožnila mi studium na vysoké škole.

Předmětová slova: enzymologie, spektrofotometrie

Klíčová slova: NO, donory NO, glutathionreduktasa, lipoamiddehydrogenasa,
2 – phenyl – 4,4,5,5 – tetramethylimidazoline – 1 – oxyl – 3 – oxide,
diaforasa

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	10
1 ÚVOD	12
2 TEORETICKÝ ÚVOD.....	14
2.1 Historie NO v datech	14
2.2 NO.....	15
2.3 Vlastnosti NO.....	15
2.3.1 Biologické vlastnosti NO.....	16
2.3.2 Fyziologické vlastnosti NO	16
2.4 Mechanismus působení NO.....	18
2.5 Mechanismus působení NOS.....	19
2.6 Superoxid a SOD	20
2.7 ENZYMY.....	21
2.7.1 Aldehyddehydrogenasa (ALDH).....	21
2.7.2 Diaforasa (DP) z (Clostridium kluyveri).....	21
2.7.3 Lipoamiddehydrogenasa (LAD)	22
2.7.4 Glutathionreduktasa (GTR)	23
2.7.5 PTIO.....	24
2.7.6 NOS.....	24
2.8 DONORY NO	26
2.8.1 Hydroxylamin (HA)	26
2.8.2 Látky uvolňující NO spontánně	27
2.8.2.1 Nitrosyly železa	28
2.8.2.2 NO adukty	28
2.8.2.3 RSNO.....	28
2.8.3 Látky uvolňující NO enzymatickou cestou	30
2.8.3.1 Organické nitráty	30
2.8.3.2 Oximy	31

3 CÍL PRÁCE	32
4 MATERIÁLY	33
4.1 Použité chemikálie.....	33
4.2 Použité přístroje	33
5 METODY	34
5.1 Kalibrační přímka pro spektrofotometrické stanovení dusitanů.....	34
5.1.1 Příprava Griessova činidla.....	34
5.1.2 Příprava pufru TRIS-HCl	34
5.2 Spektrofotometrické stanovení	35
5.2.1 Stanovení kinetických parametrů pro reakce DP s GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO, FAM, AC, HA	35
5.2.2 Stanovení kinetických parametrů pro reakce LAD(h) s GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO, FAM, AC, HA	36
5.2.3 Vliv přítomnosti SOD na reakce DP a LAD(h) s GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO	36
5.2.4 Stanovení kinetických parametrů pro reakce DP s GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO, FAM, AC, HA v přítomnosti SOD	37
5.2.5 Stanovení kinetických parametrů pro reakce LAD(h) s GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO, FAM, AC, HA v přítomnosti SOD.....	38
5.2.6 Stanovení kinetických parametrů pro reakce GTR s GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO, FAM, AC	38
5.2.7 Stanovení kinetických parametrů pro reakce LAD(h) a LAD(i) s GTN a FAL.....	39
5.2.8 Stanovení kinetických parametrů pro reakce LAD(h) a LAD(i) s GTN a FAL v přítomnosti SOD.....	39
5.3 Grafické vyhodnocení.....	40
5.4 NADH oxidasová aktivita GTR v pufru TRIS-HCl.....	40
5.5 Stanovení kinetických parametrů pro reakce DP, LAD(h), LAD(i) a GTR s PTIO.....	41

6 VÝSLEDKY	42
6.1 Stanovení dusitanů – kalibrační křivka.....	42
6.2 Orientační pokus vlivu přítomnosti SOD na reakce DP se substráty	42
6.2.1 Vliv přítomnosti SOD na reakci DP s GTN	43
6.2.2 Vliv přítomnosti SOD na reakci DP s FAL	43
6.2.3 Vliv přítomnosti SOD na reakci DP s SNAP	44
6.2.4 Vliv přítomnosti SOD na reakci DP s SNOG.....	44
6.2.5 Vliv přítomnosti SOD na reakci DP s AO.....	45
6.2.6 Vliv přítomnosti SOD na reakci DP s NP	45
6.3 Orientační pokus vlivu přítomnosti SOD na reakce LAD(h) se substráty	46
6.3.1 Vliv přítomnosti SOD na reakci LAD(h) s GTN	46
6.3.2 Vliv přítomnosti SOD na reakci LAD(h) s FAL	47
6.3.3 Vliv přítomnosti SOD na reakci LAD(h) s SNAP	47
6.3.4 Vliv přítomnosti SOD na reakci LAD(h) s SNOG.....	48
6.3.5 Vliv přítomnosti SOD na reakci LAD(h) s AO	48
6.3.6 Vliv přítomnosti SOD na reakci LAD(h) s NP.....	49
6.4 Kinetické parametry pro reakci DP se substráty a reakci DP se substráty v přítomnosti SOD.....	49
6.4.1 Kinetické parametry pro reakce DP s GTN a DP s GTN v přítomnosti SOD	50
6.4.2 Kinetické parametry pro reakce DP s FAL a DP s FAL v přítomnosti SOD	51
6.4.3 Kinetické parametry pro reakce DP s NP a DP s NP v přítomnosti SOD	52
6.4.4 Kinetické parametry pro reakce DP s SNOG a DP s SNOG v přítomnosti SOD.....	53
6.4.5 Kinetické parametry pro reakce DP s SNAP a DP s SNAP v přítomnosti SOD.....	54
6.4.6 Kinetické parametry pro reakce DP s AO a DP s AO v přítomnosti SOD	55
6.4.7 Kinetické parametry pro reakce DP s HA a DP s HA v přítomnosti SOD	56

6.4.8 Vliv Kinetické parametry pro reakce DP s FAM, AC a DP s FAM, AC v přítomnosti SOD.....	57
6.5 Kinetické parametry pro reakci LAD(h) se substráty a LAD(h) se substráty v přítomnosti SOD.....	57
6.5.1 Kinetické parametry pro reakce LAD(h) s GTN a LAD(h) s GTN v přítomnosti SOD.....	58
6.5.2 Kinetické parametry pro reakce LAD(h) s FAL a LAD(h) s FAL v přítomnosti SOD.....	59
6.5.3 Kinetické parametry pro reakce LAD(h) s NP a LAD(h) s NP v přítomnosti SOD.....	60
6.5.4 Kinetické parametry pro reakce LAD(h) s SNOG a LAD(h) s SNOG v přítomnosti SOD.....	61
6.5.5 Kinetické parametry pro reakce LAD(h) s SNAP a LAD(h) s SNAP v přítomnosti SOD.....	62
6.5.6 Kinetické parametry pro reakce LAD(h) s AO a LAD(h) s AO v přítomnosti SOD.....	63
6.5.7 Kinetické parametry pro reakce LAD(h) s HA a LAD(h) s HA v přítomnosti SOD.....	64
6.5.8 Kinetické parametry pro reakce LAD(h) s FAM, AC a DP s FAM, AC v přítomnosti SOD.....	64
6.6 Kinetické parametry pro reakce LAD(i) se substráty GTN a FAL a reakce LAD(i) s GTN a FAL v přítomnosti SOD.....	65
6.6.1 Kinetické parametry pro reakci LAD(i) s GTN.....	65
6.6.2 Kinetické parametry pro reakci LAD(i) s FAL	66
6.6.3 Kinetické parametry pro reakci LAD(i) s GTN v přítomnosti SOD	66
6.6.4 Kinetické parametry pro reakci LAD(i) s FAL v přítomnosti SOD	67
6.7 NADH oxidasová aktivita GTR v pufru TRIS-HCl	67
6.8 Kinetické parametry pro reakce GTR se substráty	68
6.8.1 Kinetické parametry pro reakci GTR (10 U.ml ⁻¹) s SNOG	68
6.8.2 Kinetické parametry pro reakci GTR (20 U.ml ⁻¹) s SNOG	69

6.9 Kinetické parametry pro reakce DP, LAD(h), LAD(i), GTR s PTIO.....	69
6.9.1 Kinetické parametry pro reakci DP s PTIO.....	70
6.9.2 Kinetické parametry pro reakci LAD(h) s PTIO.....	70
6.9.3 Kinetické parametry pro reakci LAD(i) s PTIO.....	71
6.9.4 Kinetické parametry pro reakci GTR s PTIO.....	71

7 KINETICKÉ PARAMETRY ENZYMOVÝCH REAKCÍ (SOUHRN).....	72
--	-----------

8 DISKUSE	74
------------------------	-----------

9 ZÁVĚR	76
----------------------	-----------

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	77
---------------------------------------	-----------

Seznam použitých zkratek

α -KGDC	α - ketoglutarátdehydrogenasový komplex
AC	acetonoxim
ADM	asymetrický dimethylarginin
AHA	acetohydroxamová kyselina
AO	acetaldoxim
ATP	adenosintrifosfát
cGMP	cyklický guanosin-3',5'-monofosfát
DLTA	dihydrolipoamidacetyltransferasa
DP	diaforasa
EDRF	endoteliální relaxační faktor
eNOS	endoteliální NOS
EPR	elektronová paramagnetická rezonanční spektroskopie
FAD	flavinadenindinukleotid
FAL	formaldoxim
FAM	formamidoxim
FMN	flavinmononukleotid
GTN	glyceroltrinitrát
HA	hydroxylamin
iNOS	inducibilní NOS
LAD(h)	lipoamiddehydrogenasa z prasečího srdce
LAD(i)	lipoamiddehydrogenasa z hovězího střeva
L-NOHA	N ^G -hydroxy-L-arginin
mtALDH	mitochondriální aldehyddehydrogenasa
NAD(P)H	nikotinamidadenindinukleotid(fosfát)
nNOS	neuronální NOS
NOS	NO-synthasa
NP	nitroprussid sodný
PDC	pyruvátdehydrogenasový komplex
PDH	pyruvátdehydrogenasa

PTIO 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide
RSNO S-nitrosothioly
sGC rozpustná guanylátcyklasa
SNAP S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin
SNOG S-nitrosoglutathion
SOD superoxiddismutasa

1 Úvod

Oxid dusnatý (NO) je jednou z nejmenších a nejjednodušších biologicky velmi aktivních molekul v přírodě. Jako jedna z nejrozšířenějších signálních molekul u savců ovlivňuje NO téměř veškeré funkce buněk a orgánů v těle. Hlavní doposud objevená biosyntetická cesta vzniku NO v savčích tkáních je oxidace L-argininu na citrulin a NO [1]. NO však může vznikat v organismu i z jiných látek, které nejsou tělu vlastní a to buď samovolně nebo reakcemi katalyzovanými jinými enzymy než NOS [2,3]. Také meziproduct přeměny reakce L-argininu na citrulin, N^G-hydroxy-L-arginin (L-NOHA), může být metabolizován na NO vedle NOS i pomocí systému cyt P-450 [4,5].

Podobně mohou být na NO přeměňovány systémem cyt P-450 i jiné látky nesoucí skupinu >C = NOH (např. oximy) [6]. Tyto látky, zvláště oximy, mohou působit jako účinné donory NO nezávislé na NOS [7]. Předpokládá se také, že vedle systému cyt P-450 mohou být některé donory NO metabolizovány na NO doposud nespécifikovanými oxidoreduktasami závislými na NAD/NADP [7-9].

Jako reprezentant takových oxidas byla zkoušena diaforasa (DP) závislá na NAD(P)H. Bylo zjištěno, že tento enzym je schopen katalyzovat přeměnu formaldoximu (FAL) a glyceroltrinitrátu (GTN) na NO. V tomto případě byl vybrán FAL, o němž bylo teprve nedávno zjištěno, že z něj může vznikat NO a GTN jako dlouho známý donor NO [10]. Podobně jako pro FAL byla zjištěna schopnost uvolňovat NO pro řadu oximů. Vznik NO byl prokázán elektronovou paramagnetickou rezonanční spektroskopií (EPR) a tyto oximy relaxovaly, díky vzniku NO, kontrahované kroužky aorty [11].

Úkolem této diplomové práce bylo rozšířit počet méně známých donorů NO, zejména oximů, které jsou schopné poskytovat NO a stejně tak i počet dobře známých donorů NO a zjistit, zda jsou tyto donory na NO přeměňovány DP.

DP je ovšem enzym bakteriálního původu, a proto bylo úkolem vyzkoušet i možnost přeměny NO donorů na NO pomocí obdobného enzymu živočišného původu lipoamiddehydrogenasy (LAD). Rozdíl v názvech DP a LAD byl zachován proto, že

takto jsou tyto enzymy označovány výrobcem i v dostupné literatuře o těchto enzimech.

2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (PTIO) je dlouho známý a široce používaný „scavenger“ NO. Je však aktivní pouze ve své oxidované formě [12]. Již dříve bylo prokázáno, že může být jeho účinek snadno eliminován redukcí katalyzovanou DP [10]. Bylo tedy také úkolem této diplomové práce zjistit, zda takovou redukcí PTIO může katalyzovat i živočišná LAD.

Při reakcích katalyzovaných DP a LAD vzniká jako vedlejší produkt superoxidový anion $\bullet\text{O}_2^-$. Tento radikál se pak může podílet i na přeměnách některých NO donorů na NO [13]. Proto byly v celé diplomové práci enzymové reakce sledovány jak v nepřítomnosti superoxidodismutasy (SOD), tak v přítomnosti SOD, tj. enzymu, který může eliminovat vznikající $\bullet\text{O}_2^-$.

2 Teoretický úvod

2.1 Historie NO v datech

1620 – NO byl prvně připraven belgičanem Janem Baptistou van Helmontem

1772 – NO byl chemicky charakterizován Josephem Priestleym.

1800 – byla objevena toxicita NO

1867 – se zjistilo, že amylnitrit snižuje krevní tlak při hypertenzi. Dnes se již ví, že se to děje uvolňováním NO.

1914-1918 – zavedení nitroglycerinových tablet pro úlevu při angině pectoris. Dnes již víme, že i nitroglycerin je zprostředkován NO uvolňovaným z těchto látek.

1977 – Ferid Murad zjistil, že NO aktivuje guanylátcyklasu a tím zvyšuje intracelulární koncentraci cyklického guanosin-3',5'-monofosfátu (cGMP).

1980 – Robert Furchgott objevil endoteliální relaxační faktor (EDRF)

1987 – Louis J. Ignarro, Salvador Moncada zjistili, že eukaryotické buňky jsou schopny tvořit NO

1992 – NO se stal molekulou tohoto roku

1998 – Udělena **Nobelova cena** za fyziologii a lékařství R.F. Furchgottovi, L.J. Ignarroví, F. Muradovi za klíčové objevy týkající se NO jako signální molekuly v kardiovaskulárním systému.

2.2 NO

NO zaujímá důležitou úlohu ve fyziologické regulaci organismu. Je to esenciální signální molekula a efektor v kardiovaskulárním, imunitním a nervovém systému. Dlouhou dobu byl považován jen za znečišťující plyn v atmosféře.

Až v roce 1986–1987 Furchgott a Ignarro současně navrhli, že EDRF může být NO [14,15]. Následující výzkumy prokázaly, že EDRF a NO vykazují identické vlastnosti [16,17]. Bylo zjištěno, že vasorelaxace v endoteliu hladkého svalu je spojena se vzrůstem cGMP. Rozpustná guanylátcyklasa (sGC) je stimulována NO [18-21]. Relaxace závislá na endoteliu je inhibována hemoglobinem, který váže molekulu NO [22,23] a dále methylenovou modří, která inhibuje sGC [20,21]. SOD chrání NO před rozkladem [24,25]. $\cdot\text{O}_2^-$ reaguje s NO za vzniku peroxinitritu.

2.3 Vlastnosti NO

NO je nestabilní radikálová molekula s nepárovým elektronem, která může vytvářet různé redoxní formy (nitrosonium NO^+ a nitroxylový aniont NO^-), což přispívá k rozmanitosti biologických dějů ovlivnitelných NO [26]. NO může přenášet dostatek informací ke kontrole důležitých životních funkcí, například: krevního tlaku, respirace, ničení mikrobů a nádorových buněk.

Je meziproduktem výroby HNO_3 z amoniaku. Na životní prostředí má však špatný vliv především jeho syntéza z volných prvků, která probíhá ve spalovacích motorech. NO vzniká reakcí: $\text{N}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{NO}$ Je to reakce endotermická a dochází k ní při vyšších teplotách.

Mezi nejznámější reakce NO patří reakce s O_2 v plynné fázi za vzniku oxidu dusičitého (NO_2). Přidáním NO za fyziologických podmínek do vodného prostředí dojde ke vzniku dusitanů a malého množství dusičnanů [27].

NO také reaguje se superoxidem za vzniku peroxinitritu [28], s thioly [29], aminy [30], s hydroxylaminem (HA) [31] nebo s L-NOHA [32], s železem jak hemovým tak nehemovým [33,34].

2.3.1 Biologické vlastnosti NO

NO určuje bazální cévní tonus (stav vnitřního napětí svalů a cév) včetně vasodilatace jako odpovědi na hormonální chemické reakce. Tento cévní tonus je důležitý pro regulaci krevního průtoku a tlaku.

Mechanismus účinku je vysvětlen vazbou NO s sGC ve vaskulárních buňkách hladkého svalu. Tento mechanismus vede ke zvýšení koncentrace cGMP a vyvolává vaskulární relaxaci. Inhibice tvorby enzymu NOS a tím nedostatek NO způsobuje, že jsou v převaze endoteliny, které vyvolávají vasokonstrikci [14]. Jak již bylo zmíněno shora, NO má rovněž významnou funkci v imunitním a nervovém systému.

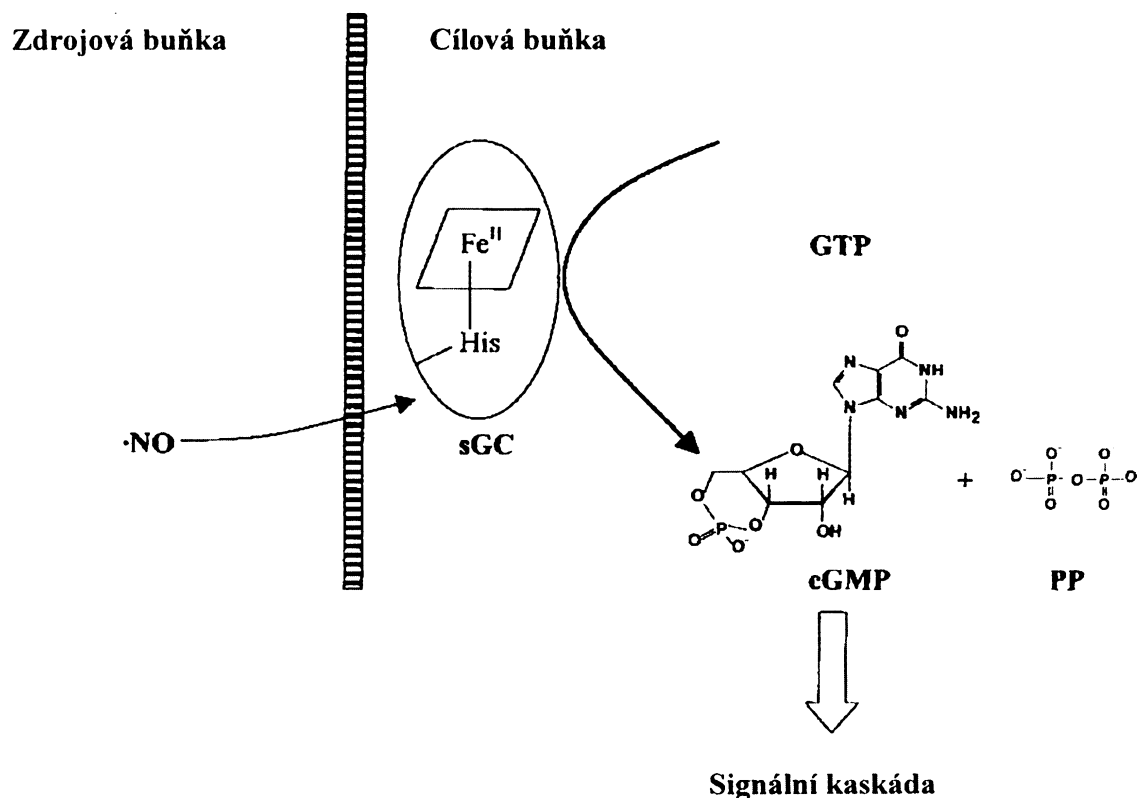
2.3.2 Fyziologické vlastnosti NO [35]

- Neurotransmitter (difusní ovlivnění nějaké oblasti)
 - učení, paměť, spánek, bolest, deprese
 - retrogradní „messenger“ (postsynaptická buňka potvrzuje presynaptické buňce příjem zprávy)
 - dlouhodobá potenciace (presynaptická buňka je programována, aby příště vyslala signál silnější - podklad paměti)
- Zabíjí viry, bakterie, parazity, tumory (inducibilní NOS (iNOS); indukci inhibují kortikosteroidy)
- Inhibuje mitochondriální respiraci
- Nejvíce NO se vytváří v nose a dutinách
 - pravděpodobně důležité pro jejich dezinfekci
 - NO lze dobře měřit ve vydechaném vzduchu
 - malá část vydechaného NO pochází z dolních dýchacích cest (lze měřit odebráním vzorků z úst) - mění se při některých nemocech, např. astma

- Vasodilatace závislá na endotelu (ACh,... – endoteliální NOS (eNOS))
- Průtokem indukovaná vasodilatace „shear stress“
 - NO je v tomto nenahraditelný ⇒ porucha vede k hypertenzi
- Existují endogenní inhibitory NOS, např. asymetrický dimethylarginin (ADMA)
 - lidé, kteří ho mají hodně, mají zvýšené riziko aterosklerózy
- Vasodilatace kůže při oteplení (podstatné pro termoregulaci) [36]
- Snižuje srážlivost krve
 - inhibice adheze, agregace a sekrece trombocytů
- Zprostředkuje zvýšení diurézy při zvýšení arteriálního tlaku
 - difunduje k tubulům a snižuje v nich reabsorpci Na (neuronální NOS (nNOS), eNOS))
- Erektce (vasodilatace hladkého svalstva kavernózních těles a jeho arterií zprostředkovaná NO z terminál pánevních nervů - nNOS)
- Inhibuje apoptózu tím, že inhibuje (prostřednictvím cGMP a G kinázy) apoptotické fosforylační signály a také přímo inhibuje kaspázy (specifické proteasy apoptózy, které obsahují v aktivním místě cystein, ten může být NO S-nitrosylován)
- NO tlumí kontrakci kosterního svalstva [37]

2.4 Mechanismus působení NO

NO působí na různé cílové molekuly. Základním mechanismem působení NO je aktivace sGC nitrosací jejího hemu [38]. Tento mechanismus je důležitý převážně v buňkách vaskulárního hladkého svalu, kde stimulovaný vzrůst cGMP vede k vasodilataci [39,40].



Obr. 2.1 Základní mechanismus působení NO

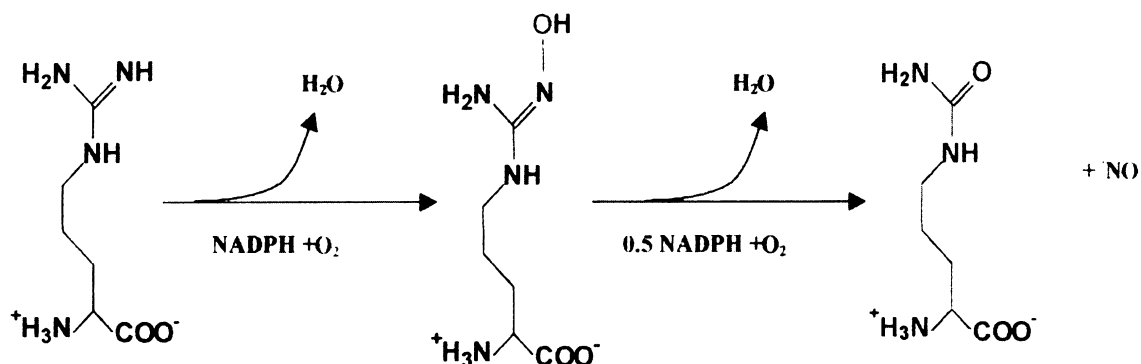
Předtím, než bylo zjištěno, že makrofágy uvolňují NO, bylo jejich působení na nádorové buňky dáváno do souvislosti s inhibicí Fe-S enzymů (NADH: ubichinonoxidoreduktasa, NADH: sukcinát oxidoreduktasa a cis-akonitasa) [41]. Teprve nedávno začalo být ničení cílových buněk spojováno s účinkem NO. V makrofágách, které produkují NO a v cílových buňkách, které byly poškozeny makrofágy, se detekovaly pomocí EPR spektroskopie komplexy, které odpovídají nitrosylovaným Fe-S komplexům. Inhibice enzymů pomocí NO je spojena s uvolňováním Fe z Fe-S center [42].

NO je znám tím, že přímo aktivuje některé G-proteiny ve spojení se zvýšením GTPázové aktivity [43]. To vede k předpokladu, že NO může ovlivňovat aktivitu mnoha proteinů tím, že se změní úroveň jejich fosforylace. Hlavní působení makrofágů na nádorové buňky však spočívá v tom, že inhibují syntézu DNA (pravděpodobně přes inhibici mitochondriálního dýchání) a syntézy adenosintrifosfátu (ATP). NO může reagovat i s ribonukleotidreduktasou a inaktivovat ji. Tento enzym katalyzuje syntézu deoxyribonukleotidů a jeho inaktivace znamená inhibici syntézy DNA a rozmnožování buněk.

2.5 Mechanismus působení NOS

U reakce katalyzované NOS je intermediátem L-NOHA a hydroxylovaný dusík L-NOHA je přeměněn na NO. Tvorba citrulinu a NO z L-argininu vyžaduje 1,5 molu NADPH, avšak z L-NOHA vyžaduje jen 0,5 molu NADPH.

Tato reakce (Obr. 2.2) má dva kroky, jedná se o dvě monooxygenační reakce. Prvním krokem je N-hydroxylace jednoho ze dvou ekvivalentních guanidinových dusíků L-argininu. Tato reakce vykazuje vlastnosti monooxygenací, závislých na cytochromu P-450, se spotřebou jednoho molu NADPH a O₂. Do L-argininu se začlení jen jeden kyslíkový atom z O₂ (druhý vytvoří vodu, proto monooxygenace) a vznikne stabilní meziprodukt L-NOHA. Druhý krok je tříelektronová oxidace meziproduktu (L-NOHA) a oxidační štěpení vazby C=N-OH. Vznikne citrulin a NO [44]. První krok je normální hydroxylace, avšak druhý krok nemá v biologii obdoby, neboť spotřebovává jen 0,5 molu NADPH [45].

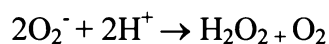


Obr. 2.2 Reakční mechanismus vzniku NO z L-argininu za katalýzy NOS

2.6 Superoxid a SOD [46]

Superoxid vzniká jednoelektronovou redukcí kyslíku. Dismutací se přeměňuje na H_2O_2 . Je to radikál, který se nejčastěji objevuje v organismech [47,48]. Vzniká při autooxidaci hydrochinonů, katecholaminů, flavinů, thiolů. Také se tvoří při přenosu elektronů v dýchacím řetězci, při enzymových reakcích – katalytickým účinkem oxidas, cyklooxygenasy a při fotosyntéze v chloroplastech.

Ze superoxidu mohou vznikat škodlivější formy kyslíku (H_2O_2 , peroxonitrit...), a proto se ho organismus snaží odstranit a zabránit vzniku hydroxylového radikálu. K tomu slouží enzym SOD, který urychluje dismutaci superoxidu o 4 řády.



Je to enzym tzv. antioxidační ochrany (obrané mechanismy proti volným radikálům, které si vytvořil organismus).

Známe 3 druhy SOD, které se liší kofaktorem:

Mn²⁺SOD a Fe²⁺SOD – jsou podobné struktury, mají je všechna prokaryota a najdeme je i v prokaryotických řasách.

Fe SOD se nachází v dimerické formě

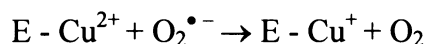
Mn SOD se vyskytuje jako dimer i tetramer

Každá z podjednotek váže jeden kovový atom.

Cu²⁺ / Zn²⁺SOD – má odlišnou strukturu od Mn²⁺SOD a Fe²⁺SOD. Je to enzym, který má strukturu dimeru. Zn má úlohu strukturní a Cu je redoxní centrum.

Každá podjednotka obsahuje po jednom atomu obou kovů. Nachází se v buňkách vyšších eukaryotických organismů.

Reakční mechanismus: Cu²⁺ iont v molekule enzymu je redukován první molekulou superoxidu na Cu⁺ [49].



Další molekula superoxidu je pak v protonizované formě, jakožto hydroperoxylový radikál, schopna znovu oxidovat Cu⁺ a tak regenerovat původní formu enzymu. Tvoří se zde peroxid vodíku.



SOD se může podávat jako léčebný přípravek. Intravaskulární aplikace snižuje zánětlivé projevy v kloubu. Ty jsou vyvolané nadprodukcí superoxidu. Intravenózní aplikace vede ke snížení reperfučního poškození transplantovaného orgánu a k jeho lepší funkci [50].

Snížení aktivity SOD však má pro organismus závažné následky. U člověka vede nedostatek $\text{Cu}^{2+} / \text{Zn}^{2+}$ SOD k postižení motorických neuronů v mozkové kůře a míše. Onemocnění je známo pod názvem amyotrofická laterální skleróza [51].

Zvýšená aktivita $\text{Cu}^{2+} / \text{Zn}^{2+}$ SOD ve tkáních doprovází tzv. onemocnění z volných radikálů. Zvýšená tvorba superoxidu vede ke stimulaci syntézy enzymu. Např. u nemocných Alzheimerovou chorobou [52], revmatoidní artritidou [53].

2.7 Enzymy

2.7.1 Aldehyddehydrogenasa (ALDH)

Pokud jde o biotransformaci GTN na NO dlouho neexistovaly žádné informace, i když GTN je používán jako lék pro onemocnění srdce po více než 130 let. Teprve v roce 2002 se objevila zpráva [54], že biotransformace GTN probíhá zřejmě v mitochondriích a že je za ni zodpovědná mitochondriální aldehyddehydrogenasa (mtALDH). Ta byla inhibovaná v cévách tolerantních k účinkům GTN.

2.7.2 DP z (*Clostridium kluyveri*)

Je to enzym, který patří mezi oxidoreduktasy a je závislý na NAD(P)H / NAD(P). Obsahuje pevně vázaný flavinový kofaktor. Bylo sledováno, zda DP jako oxidoreduktasa, může katalyzovat tvorbu NO z některých vasorelaxantů [10]. V přítomnosti koenzymu NADH nebo NADPH může DP převést vybrané donory NO, GTN a FAL na dusitany a dusičnany s NO jako meziproduktem. Prvotní produkt reakce – NO – byl potvrzen EPR spektroskopii.

DP mnohem lépe katalyzuje reakci s GTN než s FAL. Samotná DP ani NAD či NADPH nevykazují žádnou aktivitu. Konečným produktem reakce jsou hlavně dusitany. Dusičnanů se tvoří malé množství. Tento diaforasový systém katalyzuje i přeměnu HA s výsledným efektem mezi GTN a FAL, ale není schopen oxidovat L-NOHA na dusitany a dusičnany [10]. DP katalyzuje tvorbu NO také z dalších látek – acetaldoximu (AO), nitroprusidu (NP), formamidoximu (FAM) [nepublikované výsledky].

V případě FAL a GTN DP katalyzuje dvě různé reakce. S GTN jde o jednoduchou redukci, zatímco s FAL je to oxidace v přítomnosti O₂ a NAD(P)H [10].

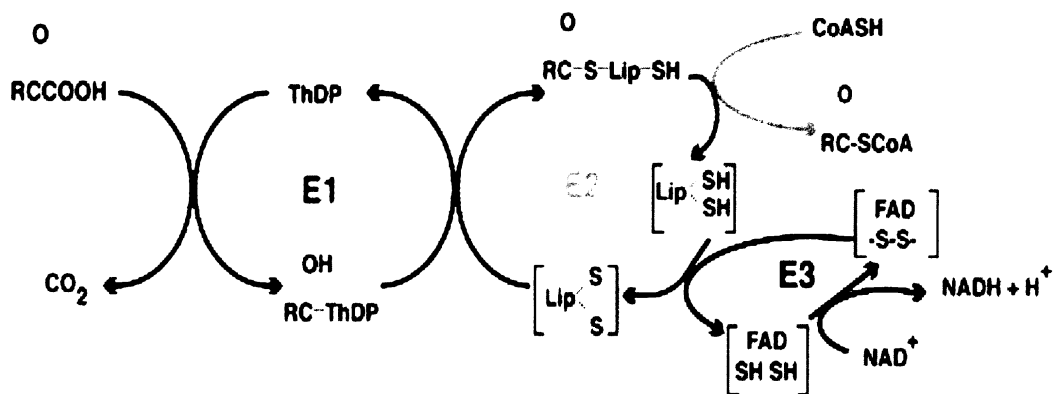
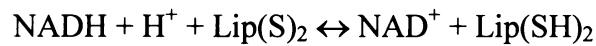
2.7.3 LAD

Lipoamiddehydrogenasa (protein – N- (dihydrolipoyl) lysin: NAD⁺ oxidoreduktasa, EC 1.8.1.4.) (LAD) je část multienzymového komplexu: pyruvátdehydrogenasového komplexu (PDC), 2-oxoglutarátového komplexu a glycindekarboxylového komplexu.

PDC se skládá z mnohonásobných kopií tří katalytických enzymů známých jako pyruvátdehydrogenasa (PDH) = (E₁), dihydrolipoamidacetyltransferasa (DLTA) = (E₂) a LAD = (E₃) [55]. Tento enzymový komplex hraje významnou roli v energetickém metabolismu, neboť katalyzuje přeměnu pyruvátu na acetylkoenzym A (Obr. 2.3). Změny tohoto homodimerického flavoproteinu často vyvolají nemoc známou jako E3 deficit.

LAD se vyskytuje i v dalších významných enzymových komplexech. V α -ketoglutarátdehydrogenasovém komplexu (α -KGDC) a dehydrogenasovém komplexu rozvětvených α -ketokyselin (BCKADC = „branched-chain“ α -keto acid dehydrogenase complex). Všechny tyto mitochondriální komplexy lze označit jako multienzymový komplex dehydrogenas 2-oxokyselin.

LAD katalyzuje reverzibilní oxidaci NADH lipoamidem a ve svém aktivním centru obsahuje nekovalentně vázanou molekulu flavinadenindinukleotidu (FAD) a redoxně aktivní disulfid. Během redukce NADH redukuje FAD, který dále přenáší elektrony na disulfid a vytváří tak „charge-transfer“ komplex. Limitujícím krokem katalýzy je oxidace redukovaného disulfidu lipoamidem [56].



Obr. 2.3 Schématické znázornění reakcí probíhajících při přeměně pyruvátu na acetyl-CoA pomocí pyruvátdekarboxylasového komplexu (PDC) E1 = pyruvátdehydrogenasa, E2 = dihydrolipoyltransacetylasa, E3 = lipoamiddehydrogenasa = LAD [57]

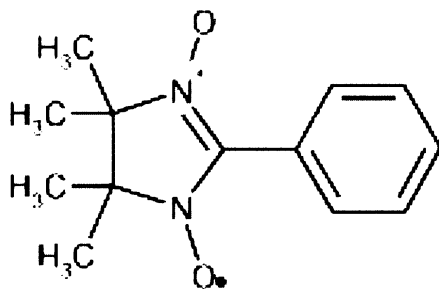
2.7.4 Glutathionreduktasa (GTR)

GTR je téměř všudypřítomný enzym patřící do skupiny disulfidové oxidoreduktasy. Je to flavoprotein, který katalyzuje redukci glutathiondisulfidu na glutathion závislou na NADPH.

2.7.5 PTIO

2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (PTIO) se rutinně používá jako „scavenger“ oxidu dusnatého. PTIO se při reakci s NO redukuje a z NO vzniká ekvimolární směs dusitanů a dusičnanů. Jako „scavenger“ je PTIO aktivní pouze ve své oxidované formě [12].

Bylo zjištěno, že enzym DP (z *Clostridium kluyveri*), je schopná v přítomnosti redukovaných koenzymů redukovat PTIO a vzhledem k tomu i eliminovat efekt jeho působení jako NO „scavengru“ [10]. Redukce PTIO v přítomnosti DP a NAD(P)H byla sledována spektrofotometricky, oxidovaná forma PTIO má zřetelné absorpční maximum okolo 550 nm. Tato snadná redukce PTIO katalyzovaná DP může ovlivnit jeho univerzální použití jako NO „scavengru“ v biologických tkáních [10].



Obr. 2.4 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide

2.7.6 NOS

NO vzniká při přeměně L-argininu na citrulin katalyzované NOS (viz kap. 2.5).

Existuje jedna forma iNOS a dvě formy konstitutivní –eNOS a nNOS. iNOS je za normálních podmínek inaktivní a produkuje vysoká množství NO pouze po aktivaci imunitního systému. eNOS je důležitá pro regulaci cévního tonu. Tvoří menší množství NO, které je však přesně regulováno a to převážně intracelulární koncentrací Ca^{2+} [58,59,60].

Společné znaky NOS:

1. obsahují v aktivním centru hem
2. jsou aktivní jako homodimery
3. jsou stereospecifické (D-arginin není substrátem)
4. jako kofaktory vyžadují - NADPH
 - 6(R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin
 - FAD
 - flavinmononukleotid (FMN)
 - kalmodulin (k nNOS a eNOS se váže po navázání Ca^{2+} na kalmodulin, k iNOS se váže kalmodulin trvale)

Odlišné znaky NOS:

1. Alternativní označení
 - nNOS - NOS I
 - iNOS - NOS II
 - eNOS - NOS III
2. Molekulární hmotnost
 - nNOS : Mr = 160 kDa
 - iNOS, eNOS: Mr = 133 kDa
3. Potřeba Ca^{2+}
 - nNOS, eNOS - potřebují
 - iNOS - nepotřebuje
4. Lokalizace
 - nNOS, eNOS - jsou v cytosolu
 - iNOS - je v buněčné membráně
5. Výskyt
 - nNOS - v některých centrálních a periferních neuronech
 - v některých buňkách epitelu a cévního hladkého svalu
 - iNOS - v makrofágách
 - v epitelu, endotelu
 - v hepatocytech
 - eNOS - v cévním endotelu
 - v plicním a renálním epitelu
6. Regulace aktivity
 - nNOS, eNOS - jsou regulovány systémem Ca^{2+} / kalmodulin
 - iNOS - není regulován

2.8 Donory NO

NO donory jsou farmakologicky aktivní látky, které buď spontánně nebo jsou-li metabolisovány uvolňují NO nebo jeho redoxní formy. Plynný NO má však omezenou schopnost působení, protože má krátký poločas rozpadu *in vivo*. Ale i přesto je hodně využíván ve farmakologii a také jako terapeutická látka při zjišťování, jak NO působí v kardiovaskulární fyziologii a patofyziologii. Některé látky mají nebo měly klinický význam po desetiletí (glyceroltrinitrát – GTN, nitroprussid sodný – NP).

Od poloviny 80. let roste zájem o fyziologii NO a dochází k vývoji nových látek, které mají širší pole působnosti. Tyto látky jsou rozdělovány do tříd podle svých reaktivit a kinetiky uvolňování NO.

Látky, které jsme i my používali (které by mohly uvolňovat NO), byly vybrány na základě strukturní podobnosti s L-NOHA → s obecným vzorcem $>C=N-OH$. L-NOHA je meziprodukt v tvorbě endogenního NO z L-argininu. Všechny vybrané látky byly komerčně dostupné.

2.8.1 Hydroxylamin (HA) (NH₂OH)

Před několika lety bylo dvěma vědeckými skupinami navrženo, že HA je potencionální vasorelaxant fungující přes NO nebo jiné příbuzné sloučeniny [61,62]. Obě skupiny zjistily, že i přes odstranění endotelia z aorty, HA způsobuje vasorelaxaci. Avšak závěry obou skupin se liší. Thomas a Ramwell [62] nenalezli vztah mezi relaxací způsobenou HA a produkcí NO/NO₂⁻, a proto byl závěr takový, že EDRF je HA, a že relaxace, kterou způsobil HA, neprobíhá přes NO. Naopak druzí považují HA za prekurzor NO [61].

2.8.2 Látky uvolňující NO spontánně

Jsou to látky, které obsahují buď nitroso či nitrosylovou funkční skupinu. Tyto látky samovolně uvolňují NO. Je to rozdíl od organických nitrátů, které musí být metabolisovány.

Látkou, která působí selektivní vasodilataci (kromě kyslíku v některých případech), je plynný NO. Má omezené využití z důvodů krátkého poločasu rozpadu a vysoké reaktivity s molekulárním kyslíkem. NO je velmi rychle inaktivován hemoglobinem. Vdechnutý NO prochází z alveolů do krve přes hladký sval ve stěně periferních plicních cév a vyvolává jejich dilataci. Jakmile se však dostane do krve, je inaktivován hemoglobinem dříve, než může dosáhnout systémových cév. Hemoglobin je oxidován na methemoglobin.

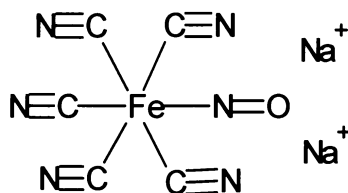
- Do této skupiny patří:
- nitrosyly železa (NP)
 - trioxodinitrát sodný
 - NO adukty
 - * 2-(N,N-diethylamin)-diazénolát-2-oxid
 - S-nitrosothioly (RSNO)
 - * S-nitrosoglutathion (SNOG)
 - * S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin (SNAP)
 - S-nitrosocystein

2.8.2.1 Nitrosyly železa

NP

V NP se NO vyskytuje jako nitrosylová skupina, která se váže na Fe v bipyramidálním komplexu. NO je spontánně uvolňován z této sloučeniny při fyziologickém pH dosud nezjištěným mechanismem. Může být také uvolňován enzymatickou nebo fotochemickou cestou.

NP se po desetiletí využíval k léčbě anginy pectoris. Velikou nevýhodou bylo, že současně s NO uvolňuje i kyanid. Jeho poločas rozpadu je v organismu velice krátký (cca 2 min.).



Obr. 2.5 Nitroprussid sodný

2.8.2.2 NO adukty

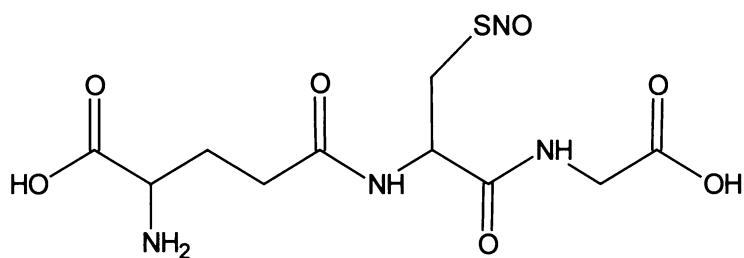
Jsou to komplexy NO s nukleofilními látkami. Jsou-li rozpuštěny ve vodném roztoku s normálním až alkalickým pH, uvolňují spontánně NO a to stálou a predikovatelnou rychlostí a nezávisle na přítomnosti biologického materiálu.

2.8.2.3 RSNO

Vysoká koncentrace thiolů snižuje množství uvolňovaného NO, protože vznikají S-nitrosothioly. Ty mohou pak zpětně uvolňovat NO.

SNOG

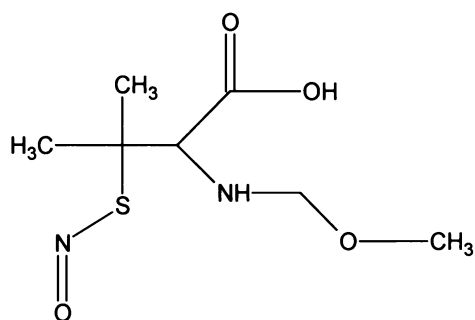
Rozkládá se na NO a disulfid za katalytického působení Cu^{2+} . Mohou se tvořit thiolové radikály.



Obr. 2.6 *S-nitrosoglutathion*

SNAP

Některé thioly (*S*-nitrosocystein) jsou do buněk transportovány transportními systémy pro aminokyseliny, ale jiné (SNAP, SNOG) vyžadují přítomnost cysteinu resp. cystinu pro transport [63].



Obr. 2.7 *S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin*

2.8.3 Látky uvolňující NO enzymatickou cestou

Jsou to látky, které nejsou schopny uvolňovat NO samovolně, ale vyžadují přispění různých enzymatických systémů (např. cyt P-450, ALDH, DP,...).

- Do této skupiny patří:
- organické nitráty
 - * GTN
 - organické nitrity
 - * isoamyl nitrit
 - oximy
 - * FAL
 - * formamidoxim (FAM)
 - * acetaldoxim (AO)
 - * acetonoxim (AC)
 - acetohydroxamová kyselina (AHA)

2.8.3.1 Organické nitráty

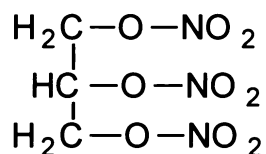
Jsou metabolisovány enzymatickou i neenzymatickou cestou. Z esterů kyseliny dusičné jsou nejznámější ethylenglykoldinitrát (1,2-GDN) a GTN.

GTN

Terapeutické rozmezí je 0,5 – 8 mg/hod. Při nadměrném užití dochází ke chudokrevnosti, poškození srdečního svalu, ledvin, jater a sleziny. Akutní otravy často končí smrtí. Do organismu vstupuje všemi cestami (požitím, inhalací, přes kůži).

Účinek GTN je založen na uvolnění hladkého svalstva cév. Jak je již zmiňováno, je donorem NO. NO způsobuje relaxaci hladkého svalstva stimulací sGC a následně zvýšením intracelulární koncentrace cGMP. Tím se stimuluje cGMP-dependentní proteinkinasa a dochází ke změně fosforylace některých proteinů v buňce hladkého

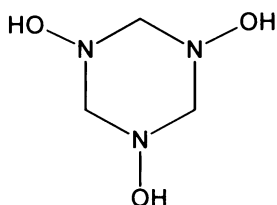
svalu. To nakonec vede k defosforylaci lehkého řetězce myosinu a ke snížení kontrakce.



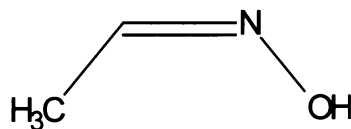
Obr. 2.8 *Glyceroltrinitrát*

2.8.3.2 Oximy

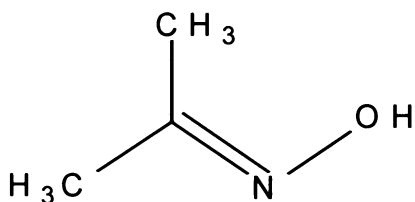
Jsou považovány za jedny z donorů NO, které jsou nezávislé na NOS. Obecný vzorec je $\begin{matrix} R_1 \\ \diagdown \\ \text{C} \\ \diagup \\ R_2 \end{matrix} = \text{NOH}$, kde R_1 může být organická skupina a R_2 buď organická skupina (ketoximy), atom vodíku (aldoximy) nebo amidová skupina (amidoxim). Byly vybrány na základě strukturní podobnosti s L-NOHA (intermediátem v reakci endogenního vzniku NO). Všechny námi používané oximy relaxovaly kontrahované kroužky potkaních aort jak kroužků s endoteliem tak bez něj. Mechanismus působení prostřednictvím NO byl potvrzen důkazem NO pomocí EPR spektroskopie.



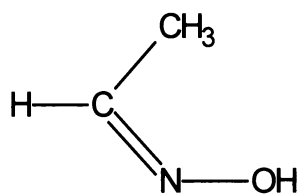
Obr. 2.9 *Formaldoxim*



Obr. 2.10 *Acetaldoxim*



Obr. 2.11 *Acetonoxim*



Obr. 2.12 *Formamidoxim*

3 Cíl práce

- 1) Zjistit kinetické parametry (K_m a V_{max}) u reakcí **LAD(h)**, **DP** a **GTR** s GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO, FAM, AC a HA.
- 2) Zjistit vliv **SOD** na reakce **LAD(h)**, **DP** s GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO, FAM, AC a HA.
- 3) Zjistit kinetické parametry (K_m a V_{max}) u reakcí **LAD(h)**, **DP** s GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO, FAM, AC a HA v přítomnosti **SOD**.
- 4) Zjistit zda má **GTR** NADH oxidasovou aktivitu v pufru TRIS-HCl.
- 5) Porovnat kinetické parametry (K_m a V_{max}) u reakcí **LAD(h)** a **LAD(i)** s GTN a FAL.
- 6) Porovnat kinetické parametry (K_m a V_{max}) u reakcí **LAD(h)** a **LAD(i)** s GTN a FAL v přítomnosti **SOD**.
- 7) Zjistit kinetické parametry (K_m a V_{max}) u reakcí **DP**, **LAD(h)**, **LAD(i)** a **GTR** s **PTIO**

4 Materiály

4.1 Použité chemikálie

Sigma Aldrich : Diaforasa z *Clostridium kluyveri*

Lipoamiddehydrogenasa z prasečího srdce

Lipoamiddehydrogenasa z hovězího střeva

Sulfanilamid; >99 %

NADH; 95 %

Trizma Base; 99,9 % (TRIS)

S-nitrosoglutathion

S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin

Formamidoxim, 99 %

Hydrochlorid hydroxylaminu, 99 %

Glutathionreduktasa z droždí

2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide (PTIO)

Fluka: Hydrochlorid formaldoximu (hydrochlorid triformoximu)

Acetonoxim, > 98 %

Lachema: Nitroprusid sodný

Dusitan sodný

Kyselina fosforečná, 85 %

Riedel-de Haën: Dichlorid N-(1-naftyl)-ethylendiamonia

Merck: Acetaldoxim; >99 %

Glyceroltrinitrát; 1% roztok v alkoholu

4.2 Použité přístroje

Spektrofotometr Utrospec[®] 1000 Pharmacia Biotech, USA

5 Metody

5.1 Kalibrační přímka pro spektrofotometrické stanovení dusitanů

Do 6-ti mikrokumavek typu Eppendorf (1,5 ml) bylo pipetováno 0,5 ml roztoku NaNO_2 o koncentraci $2,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $1,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $15 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$, $25 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (vždy v duplikátech). K tomuto roztoku bylo přidáno 0,5 ml Grisesova činidla. Absorbance byla měřena při vlnové délce 540 nm.

5.1.1 Příprava Griessova činidla

0,2 g sulfanilamidu bylo rozpuštěno v 10 ml 2,5 % H_3PO_4 , 0,02 g naftyletylendiaminu bylo rozpuštěno v 10 ml H_3PO_4 . Oba roztoky byly těsně před měřením smíchány a směs byla přidána ke vzorku v poměru 1 : 1. Roztoky se musely uchovávat ve tmě.

5.1.2 Příprava pufru TRIS-HCl

1,211 g TRIS bylo rozpuštěno ve 150 ml destilované vody a pH bylo upraveno pomocí HCl na 7,6. Objem byl doplněn destilovanou vodou na 200 ml.

5.2 Spektrofotometrické stanovení

Koncentrace dusitanů byly určovány reakcí s Griessovým činidlem: 1% sulfanilamid, 0,1% N-(1-naftyl)ethylendiamin v 2,5% kyselině orthofosforečné [64]. Griessovo činidlo bylo smícháno se vzorkem v poměru 1:1. Po 10 min. byla změřena absorbance při vlnové délce 540 nm proti slepému vzorku (samotný pufr). Koncentrace dusitanů byly odečítány z kalibrační křivky. Pro kalibrační křivku byl jako standard použit NaNO_2 .

5.2.1 Stanovení kinetických parametrů pro reakce DP s GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO, FAM, AC, HA

Vzorek obsahoval 0,7 ml pufru TRIS-HCl ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ o $\text{pH} = 7,6$), 0,1 ml DP ($1,7 \text{ U.ml}^{-1}$), 0,1 ml substrátu (GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO, FAM, AC, HA), 0,1 ml NADH (1 mmol.l^{-1}). Vzorky byly připravovány v duplikátech.

Kontrolní vzorek obsahoval 0,8 ml pufru TRIS-HCl ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ o $\text{pH} = 7,6$), 0,1 ml substrátu (GTN, FAL, SNAP, SNOG, NO, AO, FAM, AC, HA), 0,1 ml NADH.

Vzorky a kontrolní vzorky byly inkubovány při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a byly měřeny proti pufru TRIS-HCl v čase 5 – 60 min. pomocí Griessova činidla při 540 nm. Absorbance kontrolních vzorků byly odečítány od absorbance vzorků.

Výsledné koncentrace v měřeném vzorku byly:

DP : $1,7 \text{ U.ml}^{-1}$

NADH : 1 mmol.l^{-1}

Tab. 5.1 *Výsledná koncentrace substrátů*

Koncentrace	(mmol.l^{-1})	(mmol.l^{-1})	(mmol.l^{-1})	(mmol.l^{-1})	(mmol.l^{-1})
GTN	0,2	0,5	1	1,5	2
FAL	2	3,5	5	7,5	10
SNAP	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6
SNOG	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8
NP	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6
AO	0,6	1,2	2,4	4,8	9,6
FAM	2	5	10	15	20
AC	2	5	10	15	20
HA	1	2,5	3,5	5	7,5

5.2.2 Stanovení kinetických parametrů pro reakce LAD(h) s GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO, FAM, AC, HA

Vzorek obsahoval 0,7 ml pufru TRIS-HCl ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ o $\text{pH} = 7,6$), 0,1 ml LAD(h) ($2,9 \text{ U.ml}^{-1}$), 0,1 ml substrátu (GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO, FAM, AC, HA), 0,1 ml NADH (1 mmol.l^{-1}). Vzorky byly připravovány v duplikátech.

Kontrolní vzorek obsahoval 0,8 ml pufru TRIS-HCl ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ o $\text{pH} = 7,6$), 0,1 ml substrátu (GTN, FAL, SNAP, SNOG, NO, AO, FAM, AC, HA), 0,1 ml NADH.

Vzorky a kontrolní vzorky byly inkubovány při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a byly měřeny proti pufru TRIS-HCl v čase 5 - 60 min. pomocí Griessova činidla při 540 nm. Absorbance kontrolních vzorků byly odečítány od absorbance vzorků.

Výsledné koncentrace v měřeném vzorku byly:

LAD(h) : $2,9 \text{ U.ml}^{-1}$

NADH : 1 mmol.l^{-1}

Tab. 5.2 *Výsledná koncentrace substrátů*

Koncentrace	(mmol.l^{-1})	(mmol.l^{-1})	(mmol.l^{-1})	(mmol.l^{-1})	(mmol.l^{-1})
GTN	0,2	0,5	1	1,5	2
FAL	2	3,5	5	7,5	10
SNAP	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6
SNOG	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8
NP	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6
AO	0,6	1,2	2,4	4,8	9,6
FAM	2	5	10	15	20
AC	2	5	10	15	20
HA	1	2,5	3,5	5	7,5

5.2.3 Vliv přítomnosti SOD na reakce DP a LAD(h) s GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO

Orientační pokus:

K reakcím enzymů – DP($1,7 \text{ U.ml}^{-1}$) a LAD(h)($2,9 \text{ U.ml}^{-1}$) se substrátem – (GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO) a NADH (1 mmol.l^{-1}) byla přidána SOD (100 a 300 U.ml^{-1}). Koncentrace substrátů byla zvolena z předešlých měření [65].

Vzorky byly připravovány v duplikátech. Po 30 minutách inkubace při 37 °C bylo přidáváno Griessovo činidlo. Po 10 minutách byla změřena absorbance při 540 nm proti slepému vzorku (pufru TRIS-HCl).

Byl sestaven graf závislosti absorbance na čase (30 min.).

Výsledné koncentrace v měřeném vzorku byly:

DP : 1,7 U.ml ⁻¹	LAD(h) : 2,9 U.ml ⁻¹
NADH : 1 mmol.l ⁻¹	NADH : 1 mmol.l ⁻¹
SOD: 100 a 300 U.ml ⁻¹	SOD: 100 a 300 U.ml ⁻¹

Tab. 5.3 Výsledné koncentrace substrátů, vlevo pro DP, vpravo pro LAD(h)

Koncentrace (mmol.l ⁻¹)	(mmol.l ⁻¹)	Koncentrace (mmol.l ⁻¹)	(mmol.l ⁻¹)		
GTN	0,4	3,2	GTN	1,5	2
FAL	1,6	3,2	FAL	0,2	1
SNAP	0,25	0,5	SNAP	0,5	0,75
SNOG	0,25	0,5	SNOG	0,1	0,5
NP	0,25	1	NP	2,4	9,6
AO	5	10	AO	0,25	1

5.2.4 Stanovení kinetických parametrů pro reakce DP s GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO, FAM, AC, HA v přítomnosti SOD

Vzorek obsahoval 0,6 ml pufru TRIS-HCl (0,05 mol.l⁻¹ o pH = 7,6), 0,1 ml DP (1,7 U.ml⁻¹), 0,1 ml substrátu (GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO, FAM, AC, HA), 0,1 ml SOD (200 U.ml⁻¹), 0,1 ml NADH (1 mmol.l⁻¹). Vzorky byly připravovány v duplikátech.

Kontrolní vzorek obsahoval 0,7 ml pufru TRIS-HCl (0,05 mol.l⁻¹ o pH = 7,6), 0,1 ml substrátu (GTN, FAL, SNAP, SNOG, NO, AO, FAM, AC, HA), 0,1 ml SOD (200 U.ml⁻¹), 0,1 ml NADH.

Vzorky a kontrolní vzorky byly inkubovány při 37 °C a byly měřeny proti pufru TRIS-HCl v čase 5 - 60 min. pomocí Griessova činidla při 540 nm. Absorbance kontrolních vzorků byly odečítány od absorbance vzorků.

Výsledné koncentrace v měřeném vzorku byly:

SOD : 200 U.ml⁻¹

Ostatní výsledné koncentrace byly stejné jako v kapitole 5.2.1

5.2.5 Stanovení kinetických parametrů pro reakce LAD(h) s GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO, FAM, AC, HA v přítomnosti SOD

Vzorek obsahoval 0,6 ml pufru TRIS-HCl ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ o $\text{pH} = 7,6$), 0,1 ml LAD(h) (200 U.ml^{-1}), 0,1 ml substrátu (GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO, FAM, AC, HA), 0,1 ml SOD (200 U.ml^{-1}), 0,1 ml NADH (1 mmol.l^{-1}). Vzorky byly připravovány v duplikátech.

Kontrolní vzorek obsahoval 0,7 ml pufru TRIS-HCl ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ o $\text{pH} = 7,6$), 0,1 ml substrátu (GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO, FAM, AC, HA), 0,1 ml SOD (200 U.ml^{-1}), 0,1 ml NADH.

Vzorky a kontrolní vzorky byly inkubovány při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a byly měřeny proti pufru TRIS-HCl v čase 5 - 60 min. pomocí Griessova činidla při 540 nm. Absorbance kontrolních vzorků byly odečítány od absorbance vzorků..

Výsledné koncentrace v měřeném vzorku byly:

SOD : 200 U.ml^{-1}

Ostatní výsledné koncentrace byly stejné jako v kapitole 5.2.2

5.2.6 Stanovení kinetických parametrů pro reakce GTR s GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO, FAM, AC

Vzorek obsahoval 0,778 ml pufru TRIS-HCl ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ o $\text{pH} = 7,6$), 0,022 ml GTR (10 U.ml^{-1} a 20 U.ml^{-1}), 0,1 ml substrátu (GTN, FAL, SNAP, SNOG, NP, AO, FAM,), 0,1 ml NADH (1 mmol.l^{-1}). Vzorky byly připravovány v duplikátech.

Kontrolní vzorek obsahoval 0,8 ml pufru TRIS-HCl ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ o $\text{pH} = 7,6$), 0,1 ml substrátu (GTN, FAL, SNAP, SNOG, NO, AO, FAM, AC, HA), 0,1 ml NADH.

Vzorky a kontrolní vzorky byly inkubovány při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a byly měřeny proti pufru TRIS-HCl v čase 5 - 60 min. pomocí Griessova činidla při 540 nm. Absorbance kontrolních vzorků byly odečítány od absorbance vzorků..

Výsledné koncentrace v měřeném vzorku byly:

GTR : 10 U.ml⁻¹ a 20 U.ml⁻¹

SNOG : 0,1 mmol.l⁻¹, 0,25 mmol.l⁻¹, 0,5 mmol.l⁻¹, 0,75 mmol.l⁻¹, 1 mmol.l⁻¹

Ostatní výsledné koncentrace byly stejné jako v kapitole 5.2.1

5.2.7 Stanovení kinetických parametrů pro reakce LAD(h) a LAD(i) s GTN a FAL

Vzorek obsahoval 0,7 ml pufru TRIS-HCl (0,05 mol.l⁻¹ o pH = 7,6), 0,1 ml, LAD(h) (2,9 U.ml⁻¹) nebo LAD(i) (2,9 U.ml⁻¹), 0,1 ml substrátu (GTN, FAL), 0,1 ml NADH (1 mmol.l⁻¹). Vzorky byly připravovány v duplikátech.

Kontrolní vzorek obsahoval 0,8 ml pufru TRIS-HCl (0,05 mol.l⁻¹ o pH = 7,6), 0,1 ml substrátu (GTN, FAL), 0,1 ml NADH.

Vzorky a kontrolní vzorky byly inkubovány při 37 °C a byly měřeny proti pufru TRIS-HCl v čase 5 - 60 min. pomocí Griessova činidla při 540 nm. Absorbance kontrolních vzorků byly odečítány od absorbance vzorků.

Výsledné koncentrace v měřeném vzorku byly:

LAD(h) : 2,9 U.ml⁻¹

LAD(i) : 2,9 U.ml⁻¹

NADH : 1 mmol.l⁻¹

Tab. 5.4 Výsledné koncentrace GTN a FAL

Koncentrace	(mmol.l ⁻¹)	(mmol.l ⁻¹)	(mmol.l ⁻¹)	(mmol.l ⁻¹)	(mmol.l ⁻¹)
GTN	0,2	0,5	1	1,5	2
FAL	2	3,5	5	7,5	10

5.2.8 Stanovení kinetických parametrů pro reakce LAD(h) a LAD(i) s GTN a FAL v přítomnosti SOD

Vzorek obsahoval 0,6 ml pufru TRIS-HCl (0,05 mol.l⁻¹ o pH = 7,6), 0,1 ml, LAD(h) (2,9 U.ml⁻¹) nebo LAD(i) (2,9 U.ml⁻¹), 0,1 ml substrátu (GTN, FAL), 0,1 ml NADH (1 mmol.l⁻¹) a 0,1 ml SOD (200 U.ml⁻¹). Vzorky byly připravovány v duplikátech.

Kontrolní vzorek obsahoval 0,7 ml pufru TRIS-HCl ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ o $\text{pH} = 7,6$), 0,1 ml substrátu (GTN, FAL), 0,1 ml SOD (200 U.ml^{-1}), 0,1 ml NADH.

Vzorky a kontrolní vzorky byly inkubovány při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a byly měřeny proti pufru TRIS-HCl v čase 5 - 60 min. pomocí Griessova činidla při 540 nm.

Absorbance kontrolních vzorků byly odečítány od absorbance vzorků.

Výsledné koncentrace v měřeném vzorku byly:

SOD : 200 U.ml^{-1}

Ostatní výsledné koncentrace byly stejné jako v kapitole 5.2.1

5.3 Grafické vyhodnocení

Vždy byl sestaven graf závislosti absorbance na čase, ze kterého byly vypočteny hodnoty počátečních rychlostí. K výpočtu kinetických parametrů byl použit program *Hyper 32* (<http://www.liv.ac.uk/~jse/software.html>).

5.4 NADH oxidasová aktivita GTR v pufru TRIS-HCl

Nejprve byl připraven roztok GTR (10 U/ml) v pufru TRIS-HCl o $\text{pH} 7,6$ a koncentraci $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$. Ve stejném pufru byl připraven i 1 ml roztoku NADH o koncentraci 1 mmol.l^{-1} . Ten byl dále použit na přípravu roztoku o koncentraci $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$.

Reakční směs byla míchána přímo do kyvety a to v pořadí 400 μl pufru, 50 μl GTR a 50 μl NADH, směs byla promíchána a měřena absorbance při 340 nm po dobu 10 minut s krokem 1 minuta. Reakční směs byla měřena proti pufru TRIS-HCl. Na závěr byla měřena i absorbance samotného NADH v TRIS-HCl při 340 nm.

Byl sledován úbytek absorbance v čase.

Výsledné koncentrace v měřeném vzorku byly:

GTR : 10 U.ml^{-1}

NADH : $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$

5.5 Stanovení kinetických parametrů pro reakce DP, LAD(h), LAD(i) a GTR s PTIO

V pufru TRIS-HCl ($0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ o $\text{pH} = 7,6$) byly připraveny roztoky PTIO o výsledných koncentracích $0,15 \text{ mmol.l}^{-1}$, $0,3 \text{ mmol.l}^{-1}$, $0,75 \text{ mmol.l}^{-1}$, $0,9 \text{ mmol.l}^{-1}$, $1,5 \text{ mmol.l}^{-1}$. Ve stejném pufru byl připraven roztok NADH (1 mmol.l^{-1}) a roztoky DP ($0,016 \text{ U.ml}^{-1}$), LAD(h) ($0,027 \text{ U.ml}^{-1}$), LAD(i) ($0,027 \text{ U.ml}^{-1}$) a GTR (10 U.ml^{-1}).

Vzorek obsahoval $0,350 \text{ ml}$ pufru, $0,05 \text{ ml}$ PTIO (5 vzorků o různé koncentraci), $0,05 \text{ ml}$ enzymu (DP, LAD(h), LAD(i)) a $0,05 \text{ ml}$ NADH.

Kontrolní vzorek obsahoval $0,4 \text{ ml}$ pufru TRIS-HCl, $0,05 \text{ ml}$ PTIO (5 vzorků o různé koncentraci), $0,05 \text{ ml}$ NADH.

Pro GTR vzorek obsahoval $0,389 \text{ ml}$ pufru TRIS-HCl, $0,05 \text{ ml}$ PTIO (5 vzorků o různé koncentraci), $0,011 \text{ ml}$ GTR a $0,05 \text{ ml}$ NADH. Kontrolní vzorek byl stejný jako u ostatních enzymů.

Vzorky byly inkubovány při $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Reakční směs byla vždy smíchána přímo do kyvety, důkladně promíchána a byla měřena absorbance při 550 nm v čase $0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 \text{ min}$. Vzorky byly měřeny proti pufru TRIS-HCl.

Vzorky a kontrolní vzorky byly od sebe odečteny a byl sestaven graf závislosti absorbance na čase, ze kterého byly vypočteny počáteční rychlosti. K výpočtu kinetických parametrů byl použit program *Hyper 32* (<http://www.liv.ac.uk/~jse/software.html>)

Výsledné koncentrace v měřeném vzorku byly:

GTR : 10 U.ml^{-1}

LAD(h) : $0,027 \text{ U.ml}^{-1}$

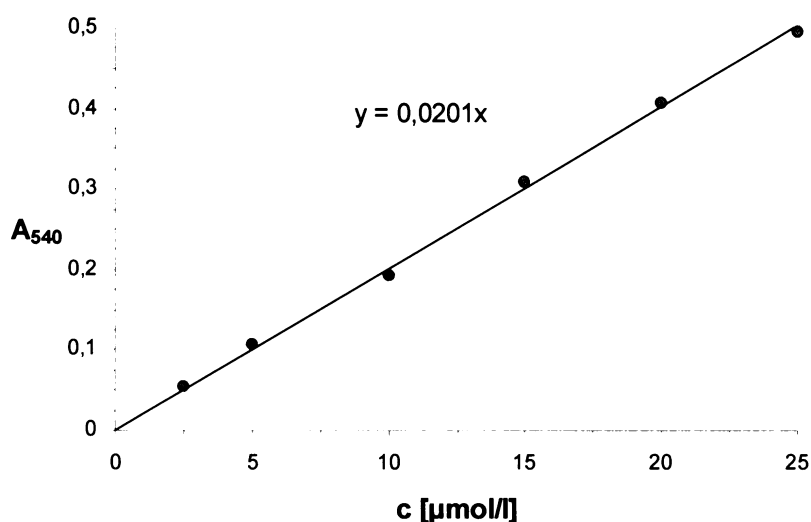
LAD(i) : $0,027 \text{ U.ml}^{-1}$

DP : $0,016 \text{ U.ml}^{-1}$

PTIO : $0,15 \text{ mmol.l}^{-1}$, $0,3 \text{ mmol.l}^{-1}$, $0,75 \text{ mmol.l}^{-1}$, $0,9 \text{ mmol.l}^{-1}$, $1,5 \text{ mmol.l}^{-1}$

6 Výsledky

6.1 Stanovení dusitanů – kalibrační křivka



Obr. 6.1 Kalibrační křivka závislosti absorpance na koncentraci dusitanu sodného pro spektrofotometrické stanovení dusitanů

6.2 Orientační pokus vlivu přítomnosti SOD na reakce DP se substráty

Tento pokus nám ukázal, zda přítomnost SOD má vliv na reakce DP s GTN, FAL, SNAP, SNOG, AO, NP. SOD byla používána ve dvou koncentracích (100 a 300 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Přítomnost SOD nemá vliv na reakce DP s GTN, SNAP. U ostatních reakcí snižuje množství vznikajícího NO a tedy dusitanů, které byly stanovovány: DP s FAL asi o 50 %, DP s SNOG asi o 10 %, DP s AO asi o 50 %, DP s NP asi o 10 %.

6.2.1 Vliv přítomnosti SOD na reakci DP s GTN

Tab. 6.1 *Reakce DP s GTN v přítomnosti SOD*

Vzorek	Absorbance (540 nm)
GTN (0,4 mmol.l ⁻¹)	0,379
GTN (0,4 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,388
GTN (0,4 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	0,400
GTN (3,2 mmol.l ⁻¹)	(1,950)
GTN (3,2 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	(1,944)
GTN (3,2 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	(1,929)

Přidání SOD (100 a 300 U.ml⁻¹) nemá na tuto reakci vliv. Superoxidový radikál nepřispívá ke vzniku NO z GTN.

6.2.2 Vliv přítomnosti SOD na reakci DP s FAL

Tab. 6.2 *Reakce DP s FAL v přítomnosti SOD*

Vzorek	Absorbance (540 nm)
FAL (1,6 mmol.l ⁻¹)	0,048
FAL (1,6 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,027
FAL (1,6 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	0,023
FAL (3,2 mmol.l ⁻¹)	0,059
FAL (3,2 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,037
FAL (3,2 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	0,026

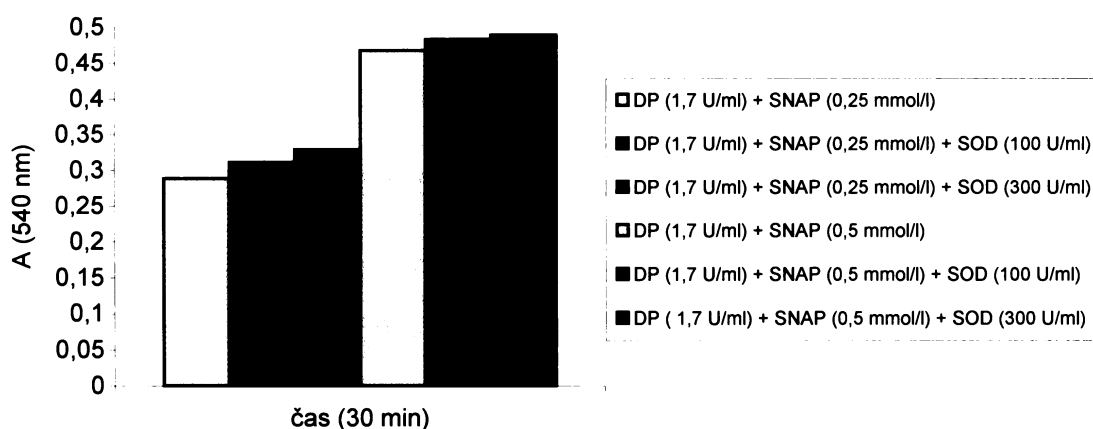
Přidání SOD (100 a 300 U.ml⁻¹) má vliv, snižuje absorbanci asi o 50 %. Superoxidový radikál přispívá ke vzniku NO z FAL.

6.2.3 Vliv přítomnosti SOD na reakci DP s SNAP

Tab. 6.3 Reakce DP s SNAP v přítomnosti SOD

Vzorek	Absorbance (540 nm)
SNAP (0,25 mmol.l ⁻¹)	0,289
SNAP (0,25 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,311
SNAP (0,25 mmol.l ⁻¹) + SOD 300 U.ml ⁻¹)	0,329
SNAP (0,5 mmol.l ⁻¹)	0,468
SNAP (0,5 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,483
SNAP (0,5 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	0,489

Přidání SOD (100 a 300 U.ml⁻¹) nemá na tuto reakci vliv (viz. Obr. 6.2). Superoxidový radikál nepřispívá ke vzniku NO z SNAP.



Obr. 6.2 Reakce DP (1,7 U.ml⁻¹) s SNAP (0,25 a 0,5 mmol.l⁻¹) v přítomnosti SOD (100 a 300 U.ml⁻¹). Detailní experimentální podmínky jsou uvedeny v odstavci 5.2.3

6.2.4 Vliv přítomnosti SOD na reakci DP s SNOG

Tab. 6.4 Reakce DP s SNOG v přítomnosti SOD

Vzorek	Absorbance (540 nm)
SNOG (0,25 mmol.l ⁻¹)	0,298
SNOG (0,25 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,290
SNOG (0,25 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	0,249
SNOG (0,5 mmol.l ⁻¹)	0,485
SNOG (0,5 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,475
SNOG 0,5 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	0,461

Přidání SOD (100 a 300 U.ml⁻¹) má vliv, snižuje absorbanci asi o 10 %. Superoxidový radikál přispívá ke vzniku NO z SNOG.

6.2.5 Vliv přítomnosti SOD na reakci DP s AO

Tab. 6.5 *Reakce DP s AO v přítomnosti SOD*

Vzorek	Absorbance (540 nm)
AO (5 mmol.l ⁻¹)	0,058
AO (5 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,036
AO (5 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	0,033
AO (10 mmol.l ⁻¹)	0,063
AO (10 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,037
AO (10 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	0,034

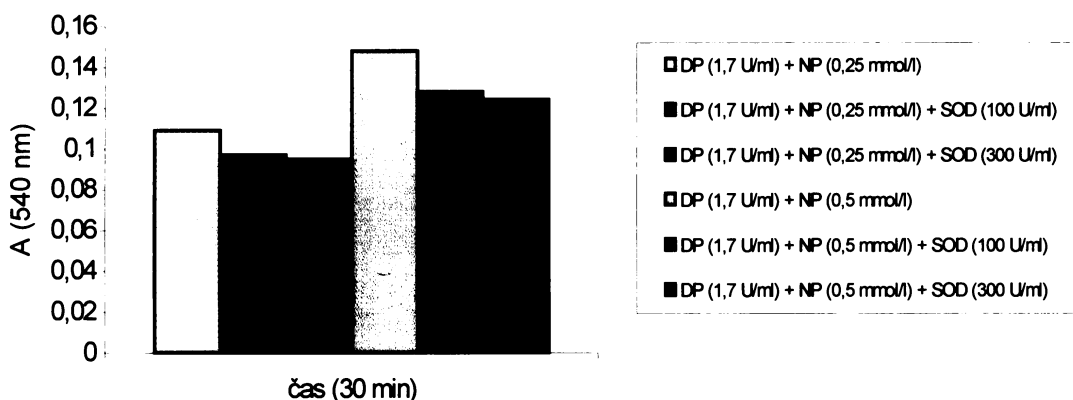
Přidání SOD (100 a 300 U.ml⁻¹) má vliv, snižuje absorbanci asi o 50 %. Superoxidový radikál přispívá ke vzniku NO z AO.

6.2.6 Vliv přítomnosti SOD na reakci DP s NP

Tab. 6.6 *Reakce DP s NP v přítomnosti SOD*

Vzorek	Absorbance (540 nm)
NP (0,25 mmol.l ⁻¹)	0,109
NP (0,25 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,097
NP (0,25 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	0,095
NP (1 mmol.l ⁻¹)	0,148
NP (1 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,128
NP (1 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	0,124

Přidání SOD (100 a 300 U.ml⁻¹) má vliv, snižuje absorbanci asi o 10 % (viz. Obr. 6.3). Superoxidový radikál přispívá ke vzniku NO z NP.



Obr. 6.3 *Reakce DP (1,7 U.ml⁻¹) s NP (0,25 a 0,5 mmol.l⁻¹) v přítomnosti SOD (100 a 300 U.ml⁻¹). Detailní experimentální podmínky jsou uvedeny v odstavci 5.2.3*

6.3 Orientační pokus vlivu přítomnosti SOD na reakce LAD(h) se substráty

Tento pokus nám ukázal, zda má přítomnost SOD vliv na reakce LAD(h) s GTN, FAL, SNAP, SNOG, AO, NP. SOD se používala ve dvou koncentracích (100 a 300 U.ml⁻¹).

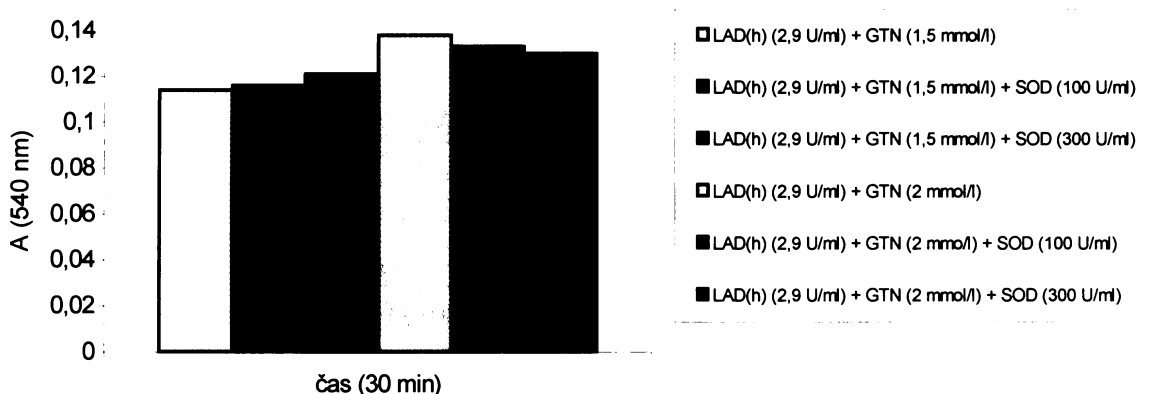
SOD nemá vliv na reakci LAD(h) s GTN. U ostatních reakcí snižuje množství vznikajícího NO a tedy dusitanů, které byly stanovovány: LAD(h) s FAL asi o 60 %, LAD(h) s SNAP asi o 15 %, LAD(h) s SNOG asi o 10 %, LAD(h) s AO asi o 50 - 60 %, LAD(h) s NP asi o 10 – 50 %.

6.3.1 Vliv přítomnosti SOD na reakci LAD(h) s GTN

Tab. 6.7 Reakce LAD s GTN v přítomnosti SOD

Vzorek	Absorbance (540 nm)
GTN (1,5 mmol.l ⁻¹)	0,114
GTN (1,5 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,116
GTN (1,5 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	0,121
GTN (2 mmol.l ⁻¹)	0,138
GTN (2 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,133
GTN (2 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	0,130

Přidání SOD (100 a 300 U.ml⁻¹) nemá na tuto reakci vliv (viz. Obr. 6.4). Superoxidový radikál nepřispívá ke vzniku NO z GTN.



Obr. 6.4 Reakce LAD(h) (2,9 U.ml⁻¹) s GTN (1,5 a 2 mmol.l⁻¹) v přítomnosti SOD (100 a 300 U.ml⁻¹). Detailní experimentální podmínky jsou uvedeny v odstavci 5.2.3

6.3.2 Vliv přítomnosti SOD na reakci LAD(h) s FAL

Tab. 6.8 Reakce LAD s FAL v přítomnosti SOD

Vzorek	Absorbance (540 nm)
FAL (0,2 mmol.l ⁻¹)	0,118
FAL (0,2 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,050
FAL (0,2 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	0,048
FAL (1 mmol.l ⁻¹)	0,133
FAL (1 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,056
FAL (1 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	0,054

Přidání SOD (100 a 300 U.ml⁻¹) má vliv, snižuje absorbanci asi o 60 % (viz. Obr. 6.5).

Superoxidový radikál přispívá ke vzniku NO z FAL.



Obr. 6.5 Reakce LAD(h) (2,9 U.ml⁻¹) s FAL (0,2 a 1 mmol.l⁻¹) v přítomnosti SOD (100 a 300 U.ml⁻¹). Detailní experimentální podmínky jsou uvedeny v odstavci 5.2.3

6.3.3 Vliv přítomnosti SOD na reakci LAD(h) s SNAP

Tab. 6.9 Reakce LAD s SNAP v přítomnosti SOD

Vzorek	Absorbance (540 nm)
SNAP (0,5 mmol.l ⁻¹)	0,412
SNAP (0,5 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,361
SNAP (0,5 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	0,325
SNAP (0,75 mmol.l ⁻¹)	0,496
SNAP (0,75 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,410
SNAP (0,75 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	0,365

Přidání SOD (100 a 300 U.ml⁻¹) má vliv, snižuje absorbanci asi o 15 %. Superoxidový radikál přispívá ke vzniku NO z SNAP.

6.3.4 Vliv přítomnosti SOD na reakci LAD(h) s SNOG

Tab. 6.10 *Reakce LAD s SNOG v přítomnosti SOD*

Vzorek	Absorbance (540 nm)
SNOG (0,5 mmol.l ⁻¹)	0,611
SNOG (0,5 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,578
SNOG (0,5 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	0,530
SNOG (0,1 mmol.l ⁻¹)	0,912
SNOG (0,1 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,881
SNOG (0,1 mmol.l ⁻¹) + SOD (300) U.ml ⁻¹	0,852

Přidání SOD (100 a 300 U.ml⁻¹) má vliv, snižuje absorbanci asi o 10 %. Superoxidový radikál přispívá ke vzniku NO z SNOG.

6.3.5 Vliv přítomnosti SOD na reakci LAD(h) s AO

Tab. 6.11 *Reakce LAD s AO v přítomnosti SOD*

Vzorek	Absorbance (540 nm)
AO (2,4 mmol.l ⁻¹)	0,099
AO (2,4 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,053
AO (2,4 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	0,043
AO (9,6 mmol.l ⁻¹)	0,127
AO (9,6 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,050
AO (9,6 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	0,045

Přidání SOD (100 a 300 U.ml⁻¹) má vliv, snižuje absorbanci asi o 50 – 60 %. Superoxidový radikál přispívá ke vzniku NO z AO.

6.3.6 Vliv přítomnosti SOD na reakci LAD(h) s NP

Tab. 6.12 *Reakce LAD s NP v přítomnosti SOD*

Vzorek	Absorbance (540 nm)
NP (0,25 mmol.l ⁻¹)	0,192
NP (0,25 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,156
NP (0,25 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	0,150
NP (1 mmol.l ⁻¹)	0,427
NP (1 mmol.l ⁻¹) + SOD (100 U.ml ⁻¹)	0,237
NP (1 mmol.l ⁻¹) + SOD (300 U.ml ⁻¹)	0,225

Přidání SOD (100 a 300 U.ml⁻¹) má vliv, snižuje absorbanci o 10 – 50 %. Superoxidový radikál přispívá ke vzniku NO z NP.

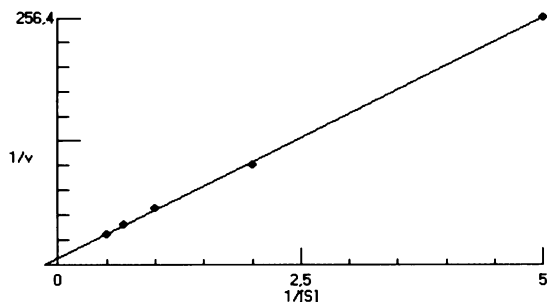
6.4 Kinetické parametry pro reakci DP se substráty a reakci DP se substráty v přítomnosti SOD

Pro reakce DP s GTN, FAL, NP, SNOG, SNAP, AO, HA, FAM, AC a DP s GTN, FAL, NP, SNOG, SNAP, AO, HA, FAM, AC v přítomnosti SOD byly zjištěny kinetické parametry (K_m a V_{max}) (Tab. 6.13 – 6.25). Kinetické parametry se nepodařilo zjistit

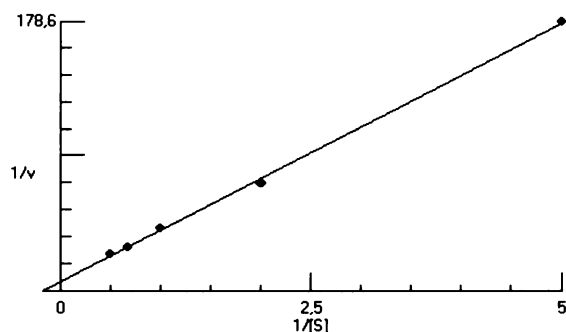
u reakcí DP s AC a FAM, DP s AO, AC, FAM v přítomnosti SOD, neboť nevykazovaly enzymatický průběh reakce.

Na každé následující stránce jsou uvedeny dva grafy a dvě tabulky. Vždy se jedná o reakci DP se substrátem a reakci DP s tímtež substrátem v přítomnosti SOD.

6.4.1 Kinetické parametry pro reakce DP s GTN a DP s GTN v přítomnosti SOD



Obr. 6.6 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci DP, GTN; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu



Obr. 6.7 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci DP, GTN a SOD; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

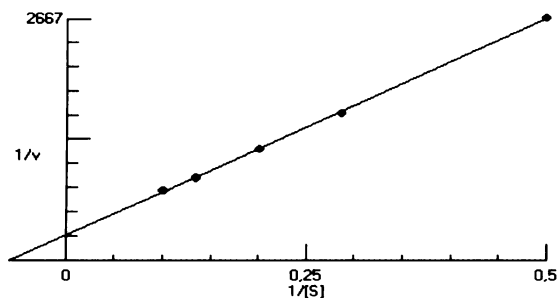
Tab. 6.13 Kinetické parametry reakce DP s GTN

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$6,7 \pm 0,7$	$6,8 \pm 0,6$
Lineweaver-Burk	$7,0 \pm 0,7$	$7,0 \pm 0,7$
Eadie-Hofstee	$6,3 \pm 0,6$	$6,4 \pm 0,4$

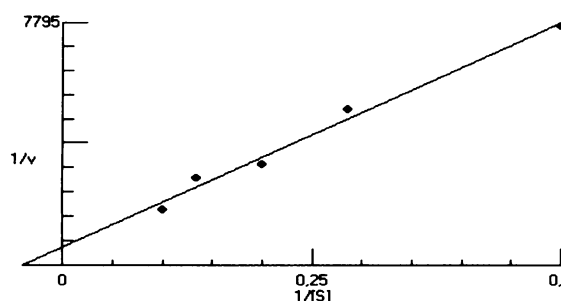
Tab. 6.14 Kinetické parametry reakce DP s GTN v přítomnosti SOD

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$4,6 \pm 0,4$	$6,8 \pm 0,5$
Lineweaver-Burk	$5,7 \pm 0,6$	$8,3 \pm 0,8$
Eadie-Hofstee	$4,3 \pm 0,3$	$6,5 \pm 0,6$

6.4.2 Kinetické parametry pro reakce DP s FAL a DP s FAL v přítomnosti SOD



Obr. 6.8 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci DP, FAL; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu



Obr. 6.9 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci DP, FAL a SOD; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

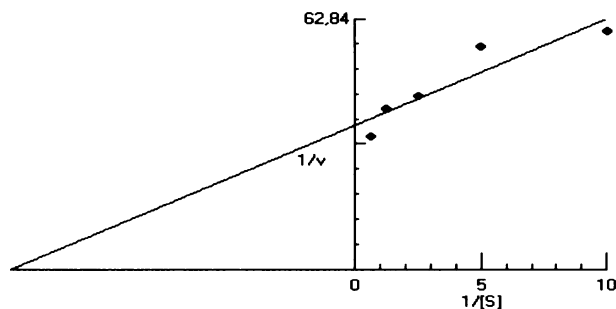
Tab. 6.15 Kinetické parametry reakce DP s FAL

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$15,7 \pm 0,6$	$0,2 \pm 0,02$
Lineweaver-Burk	$17,3 \pm 0,8$	$0,2 \pm 0,02$
Eadie-Hofstee	$15,9 \pm 0,6$	$0,2 \pm 0,01$

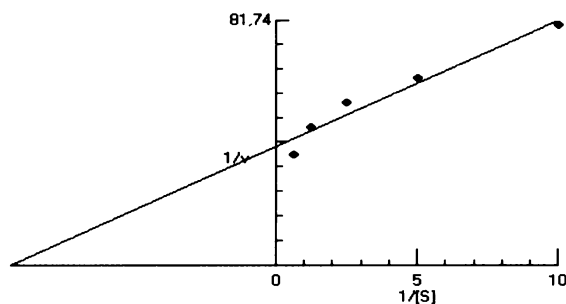
Tab. 6.16 Kinetické parametry reakce DP s FAL v přítomnosti SOD

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$38,1 \pm 0,8$	$0,1 \pm 0,01$
Lineweaver-Burk	$25,0 \pm 0,9$	$0,1 \pm 0,01$
Eadie-Hofstee	$12,8 \pm 1,0$	$0,1 \pm 0,01$

6.4.3 Kinetické parametry pro reakce DP s NP a DP s NP v přítomnosti SOD



Obr. 6.10 Vynesení dle Lineweavera-Burka pro reakci DP, NP; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu



Obr. 6.11 Vynesení dle Lineweavera-Burka pro reakci DP, NP a SOD; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

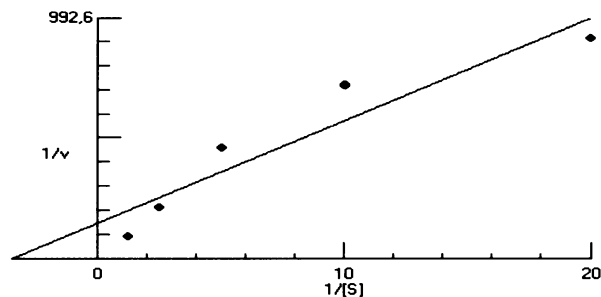
Tab. 6.17 Kinetické parametry reakce DP s NP

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$0,2 \pm 0,01$	$1,6 \pm 0,1$
Lineweaver-Burk	$0,07 \pm 0,005$	$1,4 \pm 0,1$
Eadie-Hofstee	$0,1 \pm 0,01$	$1,4 \pm 0,1$

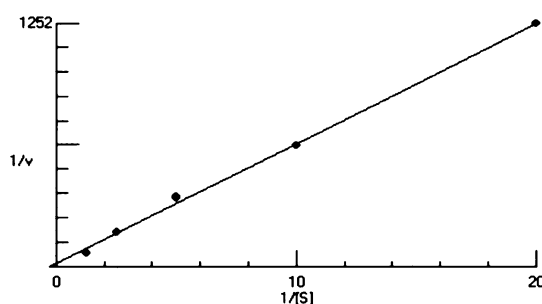
Tab. 6.18 Kinetické parametry reakce DP s NP v přítomnosti SOD

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$0,2 \pm 0,02$	$1,5 \pm 0,1$
Lineweaver-Burk	$0,1 \pm 0,01$	$1,3 \pm 0,1$
Eadie-Hofstee	$0,1 \pm 0,01$	$1,3 \pm 0,1$

6.4.4 Kinetické parametry pro reakce DP s SNOG a DP s SNOG v přítomnosti SOD



Obr. 6.12 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci DP, SNOG; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu



Obr. 6.13 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci DP, SNOG a SOD; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

Tab. 6.19 Kinetické parametry reakce DP s SNOG

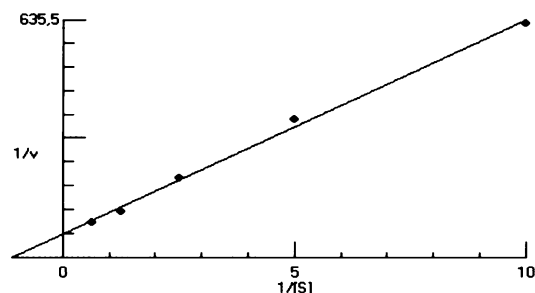
Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$4,7 \pm 0,4$	$3,5 \pm 0,3$
Lineweaver-Burk	$0,3 \pm 0,03$	$0,3 \pm 0,1$
Eadie-Hofstee	$0,3 \pm 0,02$	$0,4 \pm 0,03$

Tab. 6.20 Kinetické parametry reakce DP s SNOG v přítomnosti SOD

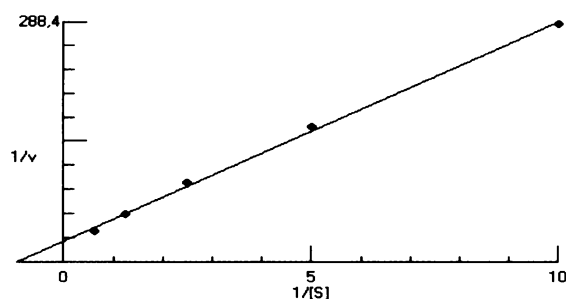
Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	Výsledky nedávající smysl	Výsledky nedávající smysl
Lineweaver-Burk	$3,6 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,2$
Eadie-Hofstee	Výsledky nedávající smysl	Výsledky nedávající smysl

Výsledky nedávaly smysl pro velmi nízké hodnoty počátečních rychlostí reakce.

6.4.5 Kinetické parametry pro reakce DP s SNAP a DP s SNAP v přítomnosti SOD



Obr. 6.14 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci DP, SNAP; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu



Obr. 6.15 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci DP, SNAP a SOD; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

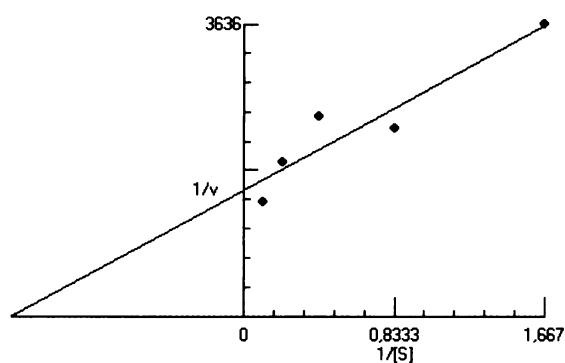
Tab. 6.21 Kinetické parametry reakce DP s SNAP

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$1,1 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,09$
Lineweaver-Burk	$0,9 \pm 0,01$	$0,8 \pm 0,07$
Eadie-Hofstee	$1,1 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,08$

Tab. 6.22 Kinetické parametry reakce DP s SNAP v přítomnosti SOD

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$1,4 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,02$
Lineweaver-Burk	$1,1 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,02$
Eadie-Hofstee	$1,3 \pm 0,09$	$2,3 \pm 0,03$

6.4.6 Kinetické parametry pro reakce DP s AO a DP s AO v přítomnosti SOD



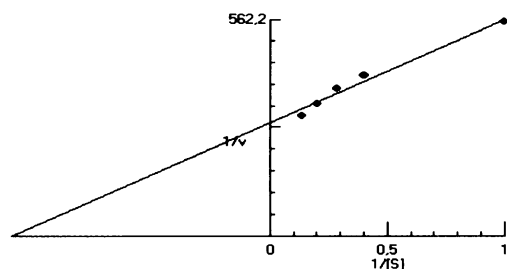
Obr. 6.16 Vynesení dle Lineweavera-Burka pro reakci DP, AO; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

Tab. 6.23 Kinetické parametry reakce DP s AO

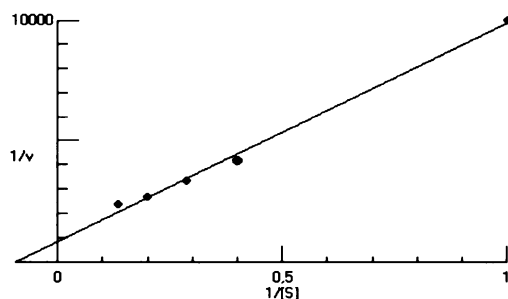
Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$1,6 \pm 0,09$	$0,04 \pm 0,004$
Lineweaver-Burk	$0,8 \pm 0,07$	$0,03 \pm 0,003$
Eadie-Hofstee	$0,8 \pm 0,09$	$0,03 \pm 0,002$

Kinetické parametry reakce DP s AO v přítomnosti SOD se nepodařilo zjistit, neboť přítomnost SOD snížila absorbance téměř na nulové hodnoty.

6.4.7 Kinetické parametry pro reakce DP s HA a DP s HA v přítomnosti SOD



Obr. 6.17 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci DP, HA; $1/v$ [$1/\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu



Obr. 6.18 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci DP, HA a SOD; $1/v$ [$1/\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

Tab. 6.24 Kinetické parametry reakce DP s HA

Vynesení podle:	K_m ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	V_{\max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
Hanes	$1,3\pm 0,1$	$0,2\pm 0,01$
Lineweaver-Burk	$0,9\pm 0,06$	$0,2\pm 0,02$
Eadie-Hofstee	$1,0\pm 0,1$	$0,2\pm 0,02$

Tab. 6.25 Kinetické parametry reakce DP s HA v přítomnosti SOD

Vynesení podle:	K_m ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	V_{\max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
Hanes	$6,5\pm 0,6$	$0,04\pm 0,005$
Lineweaver-Burk	$10,5\pm 0,9$	$0,06\pm 0,006$
Eadie-Hofstee	$6,6\pm 0,5$	$0,04\pm 0,004$

6.4.8 Kinetické parametry pro reakce DP s FAM, AC a DP s FAM, AC v přítomnosti SOD

DP ($1,7 \text{ U}\cdot\text{ml}^{-1}$) s FAM ($2\text{-}20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) a s AC ($2\text{-}20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) nereaguje, tudíž není možné zjistit kinetické parametry (K_m a V_{max}).

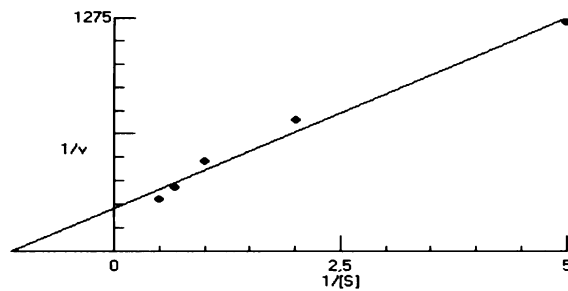
Proto také nemá smysl sledovat vliv přítomnosti SOD.

6.5 Kinetické parametry pro reakci LAD(h) se substráty a LAD(h) se substráty v přítomnosti SOD

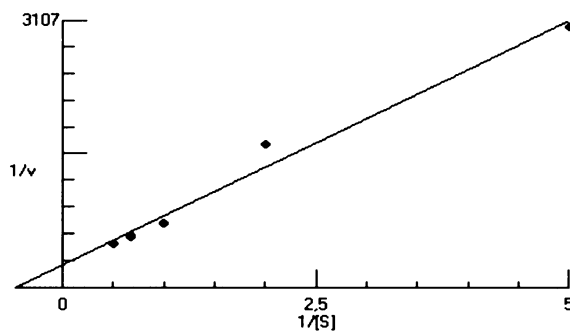
Pro reakce LAD(h) s GTN, FAL, NP, SNOG, SNAP, AO, HA, FAM, AC a reakce DP s GTN, FAL, NP, SNOG, SNAP, AO, HA, FAM, AC, v přítomnosti SOD byly zjištěny kinetické parametry (K_m a V_{max}) (Tab. 6.26 – 6.37). Kinetické parametry se nepodařilo zjistit u reakcí DP s AC a FAM a reakcí DP s AO, AC, FAM v přítomnosti SOD, neboť reakce neprobíhaly.

Na každé následující stránce jsou uvedeny dva grafy a dvě tabulky. Vždy se jedná o reakci DP se substrátem a reakci DP s tímtéž substrátem v přítomnosti SOD.

6.5.1 Kinetické parametry pro reakce LAD(h) s GTN a LAD(h) s GTN v přítomnosti SOD



Obr. 6.19 Vynesení dle Lineweavera-Burka pro reakci LAD(h), GTN; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu



Obr. 6.20 Vynesení dle Lineweavera-Burka pro reakci LAD(h), GTN a SOD; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

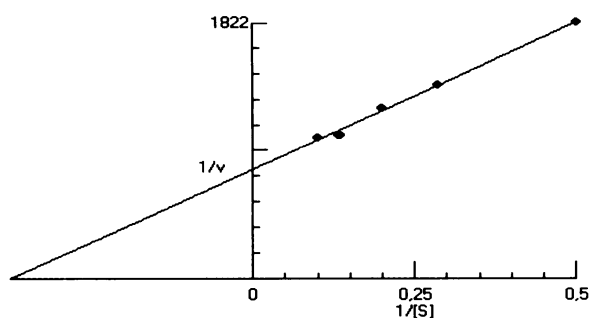
Tab. 6.26 Kinetické parametry reakce LAD(h) s GTN

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$1,5 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,03$
Lineweaver-Burk	$0,9 \pm 0,09$	$0,2 \pm 0,02$
Eadie-Hofstee	$1,1 \pm 0,09$	$0,2 \pm 0,01$

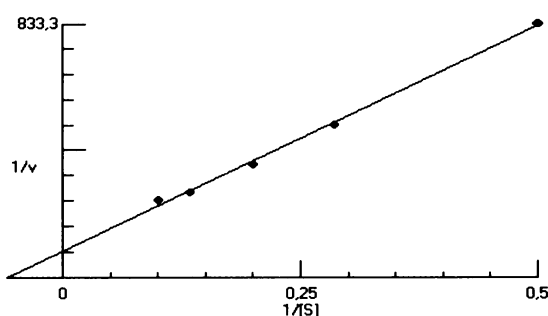
Tab. 6.27 Kinetické parametry reakce LAD(h) s GTN v přítomnosti SOD

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$3,5 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,02$
Lineweaver-Burk	$2,2 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,02$
Eadie-Hofstee	$2,2 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,01$

6.5.2 Kinetické parametry pro reakce LAD(h) s FAL a LAD(h) s FAL v přítomnosti SOD



Obr. 6.21 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci LAD(h), FAL; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu



Obr. 6.22 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci LAD(h), FAL a SOD; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

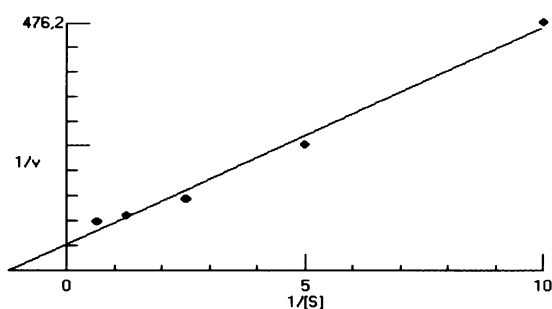
Tab. 6.28 Kinetické parametry reakce LAD(h) s FAL

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$2,7 \pm 0,3$	$0,1 \pm 0,01$
Lineweaver-Burk	$2,7 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,01$
Eadie-Hofstee	$2,7 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,01$

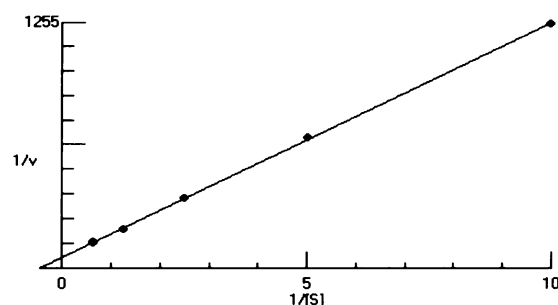
Tab. 6.29 Kinetické parametry reakce LAD(h) s FAL v přítomnosti SOD

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$13,1 \pm 0,8$	$0,5 \pm 0,04$
Lineweaver-Burk	$17,1 \pm 1,0$	$0,6 \pm 0,05$
Eadie-Hofstee	$13,1 \pm 0,9$	$0,5 \pm 0,05$

6.5.3 Kinetické parametry pro reakce LAD(h) s NP a LAD(h) s NP v přítomnosti SOD



Obr. 6.23 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci LAD(h), NP; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu



Obr. 6.24 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci LAD(h), NP a SOD; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

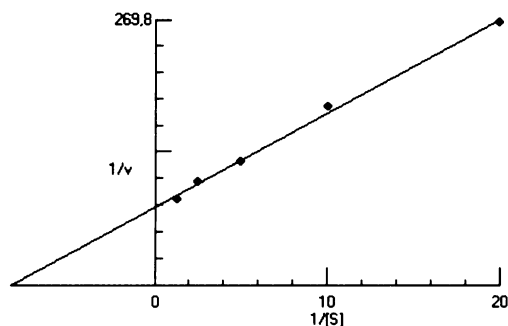
Tab. 6.30 Kinetické parametry reakce LAD(h) s NP

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$0,5 \pm 0,05$	$0,7 \pm 0,06$
Lineweaver-Burk	$0,8 \pm 0,09$	$1,0 \pm 0,1$
Eadie-Hofstee	$0,5 \pm 0,06$	$0,7 \pm 0,07$

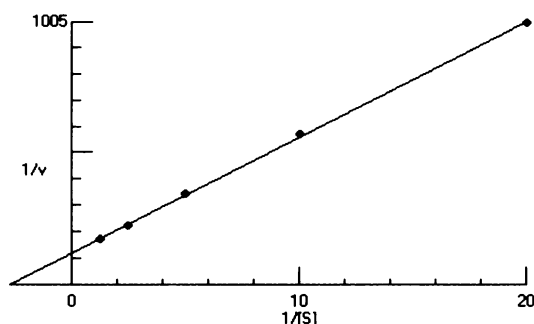
Tab. 6.31 Kinetické parametry reakce LAD(h) s NP v přítomnosti SOD

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$2,2 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$
Lineweaver-Burk	$2,2 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,08$
Eadie-Hofstee	$2,3 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,09$

6.5.4 Kinetické parametry pro reakce LAD(h) s SNOG a LAD(h) s SNOG v přítomnosti SOD



Obr. 6.25 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci LAD(h), SNOG; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu



Obr. 6.26 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci LAD(h), SNOG a SOD; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

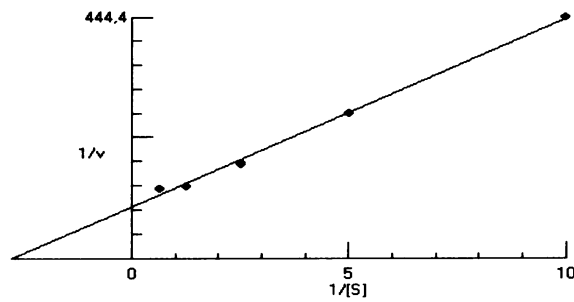
Tab. 6.32 Kinetické parametry reakce LAD(h) s SNOG

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$0,1 \pm 0,01$	$0,7 \pm 0,06$
Lineweaver-Burk	$0,1 \pm 0,01$	$0,6 \pm 0,07$
Eadie-Hofstee	$0,1 \pm 0,01$	$0,6 \pm 0,07$

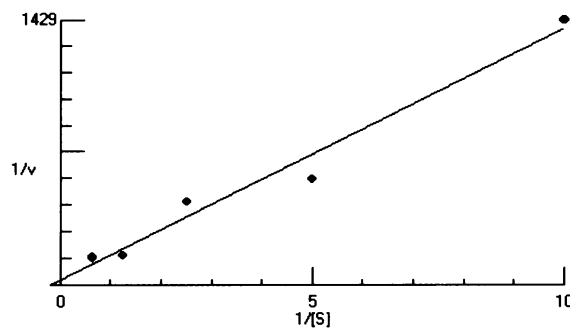
Tab. 6.33 Kinetické parametry reakce LAD(h) s SNOG v přítomnosti SOD

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$0,4 \pm 0,03$	$0,4 \pm 0,03$
Lineweaver-Burk	$0,4 \pm 0,04$	$0,4 \pm 0,03$
Eadie-Hofstee	$0,4 \pm 0,03$	$0,4 \pm 0,04$

6.5.5 Kinetické parametry pro reakce LAD(h) s SNAP a LAD(h) s SNAP v přítomnosti SOD



Obr. 6.27 Vynesení dle Lineweavera-Burka pro reakci LAD(h), SNAP; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu



Obr. 6.28 Vynesení dle Lineweavera-Burka pro reakci LAD(h), SNAP a SOD; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

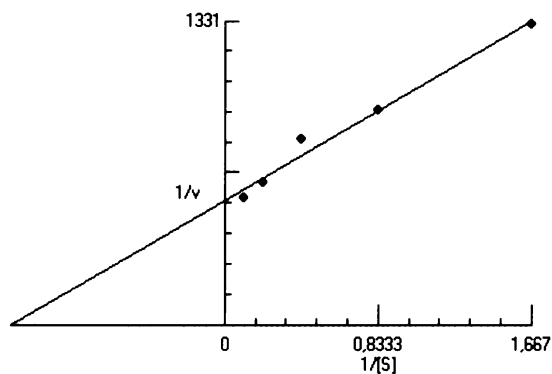
Tab. 6.34 Kinetické parametry reakce LAD(h) s SNAP

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$0,3 \pm 0,03$	$0,5 \pm 0,04$
Lineweaver-Burk	$0,4 \pm 0,03$	$0,5 \pm 0,06$
Eadie-Hofstee	$0,3 \pm 0,04$	$0,5 \pm 0,05$

Tab. 6.35 Kinetické parametry reakce LAD(h) s SNAP v přítomnosti SOD

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$1,9 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,09$
Lineweaver-Burk	$5,4 \pm 0,4$	$2,0 \pm 0,2$
Eadie-Hofstee	$0,6 \pm 0,05$	$0,4 \pm 0,05$

6.5.6 Kinetické parametry pro reakce LAD(h) s AO a LAD(h) s AO v přítomnosti SOD



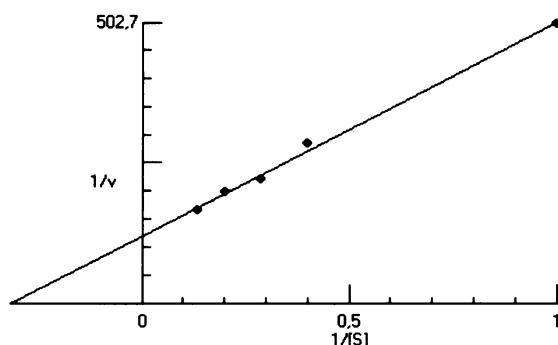
Obr. 6.29 Vynesení dle Lineweavera-Burka pro reakci LAD(h), AO; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

Tab. 6.36 Kinetické parametry reakce LAD(h) s AO

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$1,2 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,01$
Lineweaver-Burk	$0,9 \pm 0,08$	$0,1 \pm 0,01$
Eadie-Hofstee	$0,9 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,02$

Kinetické parametry reakce LAD(h) s AO v přítomnosti SOD se nepodařilo zjistit, neboť přítomnost SOD snížila absorbance téměř na nulové hodnoty.

6.5.7 Kinetické parametry pro reakce LAD(h) s HA a LAD(h) s HA v přítomnosti SOD



Obr. 6.30 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci LAD(h), HA; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

Tab. 6.37 Kinetické parametry reakce LAD(h) s HA

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$3,5 \pm 0,4$	$0,4 \pm 0,04$
Lineweaver-Burk	$3,2 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,03$
Eadie-Hofstee	$3,3 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,03$

Kinetické parametry reakce LAD(h) s HA v přítomnosti SOD se nepodařilo zjistit, neboť SOD snížila absorbance téměř na nulové hodnoty.

6.5.8 Kinetické parametry pro reakce LAD(h) s FAM, AC a DP s FAM, AC v přítomnosti SOD

LAD(h) ($2,9 \text{ U.ml}^{-1}$) s FAM ($2-20 \text{ mmol.l}^{-1}$) a s AC ($2-20 \text{ mmol.l}^{-1}$) nereaguje, tudíž není možné zjistit kinetické parametry (K_m a V_{max}).

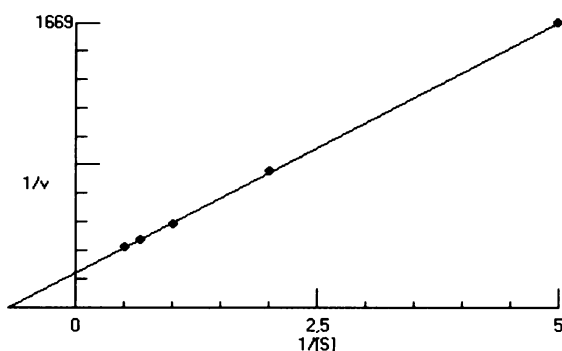
Proto také nemá smysl sledovat vliv přítomnosti SOD.

6.6 Kinetické parametry pro reakce LAD(i) se substráty GTN a FAL a reakce LAD(i) s GTN a FAL v přítomnosti SOD

Pro reakce LAD(i) s GTN a FAL a reakce LAD(i) s GTN, FAL v přítomnosti SOD byly zjištěny kinetické parametry (K_m a V_{max}) (Tab. 6.38 – 6.41).

U reakce LAD(i) s FAL je graf sestaven pouze ze třech hodnot koncentrací, neboť při vyšších koncentracích se již počáteční rychlost nemění. Toto koncentrační rozmezí bylo zvolené z důvodů porovnání s reakcí LAD(h) a FAL.

6.6.1 Kinetické parametry pro reakci LAD(i) s GTN

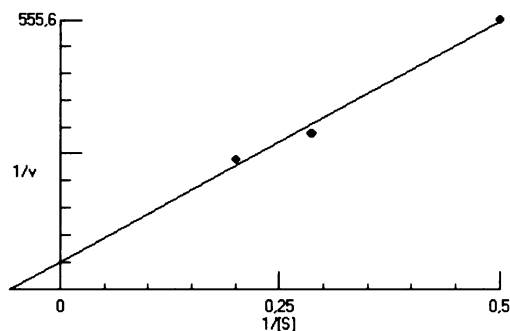


Obr. 6.31 Vynesení dle Lineweavera-Burka pro reakci LAD(i), GTN; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

Tab. 6.38 Kinetické parametry reakce LAD(i) s GTN

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$1,4 \pm 0,09$	$0,2 \pm 0,02$
Lineweaver-Burk	$1,4 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,02$
Eadie-Hofstee	$1,4 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,01$

6.6.2 Kinetické parametry pro reakci LAD(i) s FAL



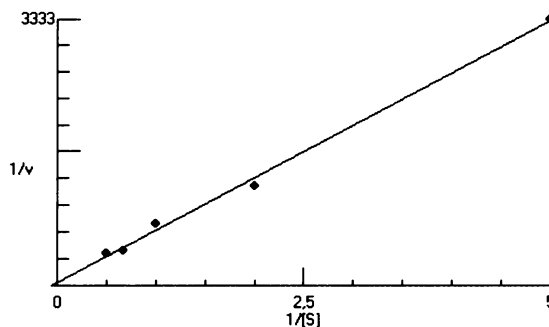
Obr. 6.32 Vynesení dle Lineweavera-Burka pro reakci LAD(i), FAL ; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

Tab. 6.39 Kinetické parametry reakce LAD(i) s FAL

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$12,5 \pm 0,9$	$0,7 \pm 0,08$
Lineweaver-Burk	$17,8 \pm 1,0$	$0,9 \pm 0,1$
Eadie-Hofstee	$9,1 \pm 0,8$	$0,5 \pm 0,06$

6.6.3 Kinetické parametry pro reakci LAD(i) s GTN v přítomnosti

SOD

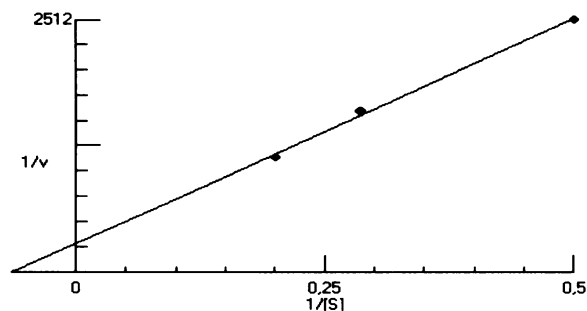


Obr. 6.33 Vynesení dle Lineweavera-Burka pro reakci LAD(i), GTN a SOD; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

Tab. 6.40 Kinetické parametry reakce LAD(i) s GTN a SOD

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$9,7 \pm 0,9$	$0,8 \pm 0,09$
Lineweaver-Burk	$16,9 \pm 1,2$	$1,3 \pm 0,1$
Eadie-Hofstee	$2,9 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,04$

6.6.4 Kinetické parametry pro reakci LAD(i) s FAL v přítomnosti SOD



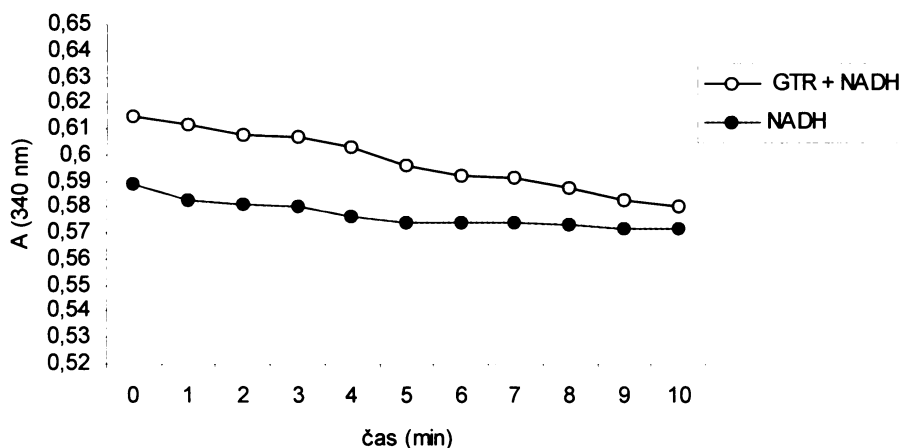
Obr. 6.34 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci LAD(i), FAL a SOD; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

Tab. 6.41 Kinetické parametry reakce LAD(i) s FAL a SOD

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$19,3 \pm 0,9$	$0,2 \pm 0,01$
Lineweaver-Burk	$15,8 \pm 0,8$	$0,2 \pm 0,02$
Eadie-Hofstee	$16,0 \pm 0,9$	$0,2 \pm 0,02$

6.7 NADH oxidasová aktivita GTR v pufru TRIS-HCl

U GTR nebyla NADH oxidasová aktivita zjištěna (viz. Obr. 6.35). Úbytek absorbance po dobu 10 min. byl nepatrný na rozdíl od DP [66].



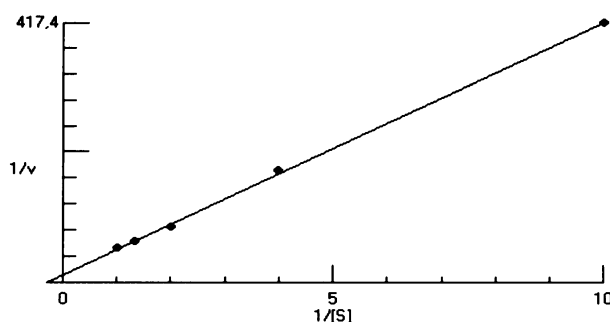
Obr. 6.35 NADH oxidasová aktivita GTR v pufru TRIS-HCl

6.8 Kinetické parametry pro reakce GTR se substráty

Pro reakci GTR s SNOG byly zjištěny kinetické parametry (K_m a V_{max}) (Tab. 6.42 a 6.43). GTR byla s SNOG použita ve dvou koncentracích (10 U.ml^{-1} a 20 U.ml^{-1}). Pro GTR byl substrátem pouze SNOG. GTR je zřejmě velmi specifický enzym.

Ostatní zkoušené látky (GTN, FAL, NP, SNAP, AO, HA, FAM, AC) nebyly pro GTR substráty.

6.8.1 Kinetické parametry pro reakci GTR (10 U.ml^{-1}) s SNOG

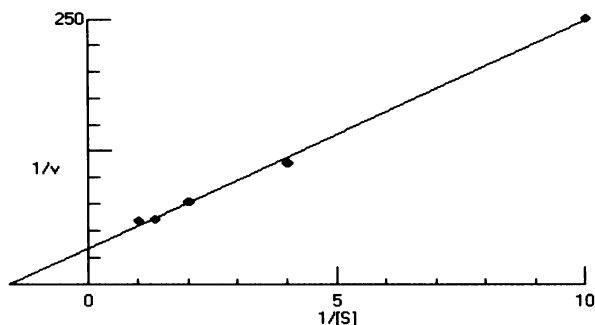


Obr. 6.36 Vynesení dle Lineweavera-Burka pro reakci GTR (10 U.ml^{-1}) s SNOG; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}\text{.min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

Tab. 6.42 Kinetické parametry reakce GTR (10 U.ml^{-1}) s SNOG

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}\text{.min}^{-1}$)
Hanes	$2,8 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,2$
Lineweaver-Burk	$3,3 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,4$
Eadie-Hofstee	$2,5 \pm 0,3$	$3,2 \pm 0,3$

6.8.2 Kinetické parametry pro reakci GTR (20 U.ml^{-1}) s SNOG



Obr. 6.37 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci GTR (20 U.ml^{-1}) s SNOG; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

Tab. 6.43 Kinetické parametry reakce GTR (20 U.ml^{-1}) s SNOG

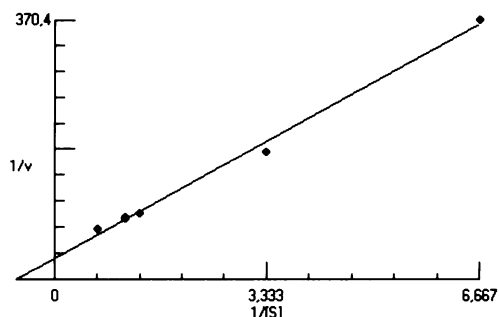
Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$0,5 \pm 0,04$	$1,3 \pm 0,1$
Lineweaver-Burk	$0,6 \pm 0,05$	$1,5 \pm 0,2$
Eadie-Hofstee	$0,6 \pm 0,06$	$1,4 \pm 0,1$

6.9 Kinetické parametry pro reakce DP, LAD(h), LAD(i), GTR s PTIO

Pro reakce DP, LAD(h), LAD(i) s PTIO byly zjištěny kinetické parametry (K_m a V_{\max}) (Tab. 6.44 – 6.46). DP, LAD(h), LAD(i) katalyzovaly redukci PTIO.

Pro reakci PTIO s GTR kinetické parametry (K_m a V_{\max}) zjištěné nebyly. GTR nekatalyzovala redukci PTIO.

6.9.1 Kinetické parametry pro reakci DP s PTIO

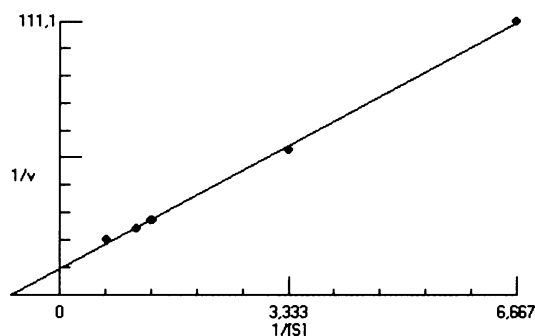


Obr. 6.38 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci DP s PTIO; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

Tab. 6.44 Kinetické parametry reakce DP s PTIO

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$1,1 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,09$
Lineweaver-Burk	$1,7 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$
Eadie-Hofstee	$1,2 \pm 0,09$	$1,3 \pm 0,09$

6.9.2 Kinetické parametry pro reakci LAD(h) s PTIO

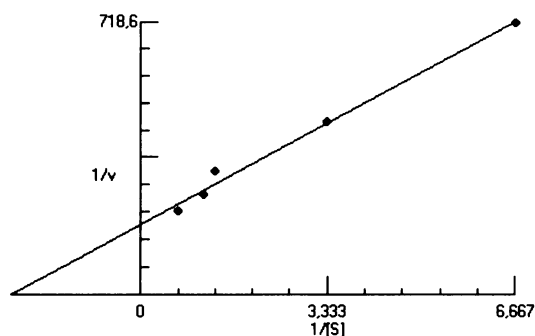


Obr. 6.39 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci LAD(h) s PTIO; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

Tab. 6.45 Kinetické parametry reakce LAD(h) s PTIO

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$1,1 \pm 0,09$	$4,0 \pm 0,4$
Lineweaver-Burk	$1,4 \pm 0,1$	$4,6 \pm 0,03$
Eadie-Hofstee	$1,2 \pm 0,08$	$4,2 \pm 0,03$

6.9.3 Kinetické parametry pro reakci LAD(i) s PTIO



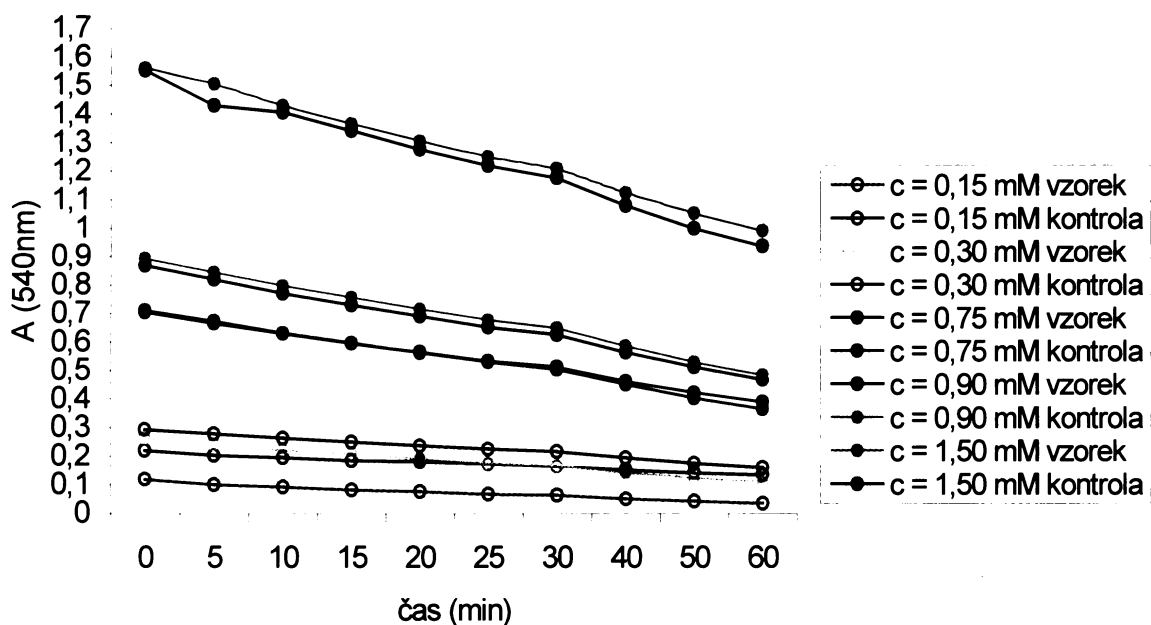
Obr. 6.40 Vynesení dle Lineweaver-Burka pro reakci LAD(i) s PTIO; $1/v$ [$1/\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$] je reciproká hodnota počáteční rychlosti a $1/[S]$ [$1/\text{mmol.l}^{-1}$] je reciproká koncentrace substrátu

Tab. 6.46 Kinetické parametry reakce LAD(i) s PTIO

Vynesení podle:	K_m (mmol.l^{-1})	V_{\max} ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)
Hanes	$0,6 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,02$
Lineweaver-Burk	$0,4 \pm 0,04$	$0,3 \pm 0,02$
Eadie-Hofstee	$0,5 \pm 0,03$	$0,3 \pm 0,01$

6.9.4 Kinetické parametry pro reakci GTR s PTIO

GTR nekatalyzovala redukci PTIO (viz. Obr. 7.41).



Obr. 6.41 Závislost absorbance na čase u reakce GTR s PTIO

7 Kinetické parametry enzymových reakcí (souhrn)

Kinetické parametry (K_m a V_{max}) jsou z vynesení **Lineweavera-Burka**.

Tab. 7.1 Kinetické parametry pro reakci DP a LAD(h) s testovanými substráty

Enzym	DP	DP	LAD(h)	LAD(h)
Kinetické parametry	K_m (mmol.l ⁻¹)	V_{max} (μ mol.l ⁻¹ .min ⁻¹)	K_m (mmol.l ⁻¹)	V_{max} (μ mol.l ⁻¹ .min ⁻¹)
GTN	7,0±0,7	7,0±0,7	0,9±0,09	0,2±0,02
FAL	17,3±0,8	0,2±0,02	2,7±0,1	0,1±0,01
NP	0,07±0,005	1,38±0,1	0,8±0,09	1,0±0,1
SNOG	0,3±0,03	0,3±0,02	0,1±0,01	0,6±0,07
SNAP	0,9±0,01	0,8±0,07	0,4±0,03	0,5±0,06
AO	0,8±0,07	0,03±0,003	0,9±0,08	0,1±0,01
HA	0,9±0,06	0,2±0,02	3,2±0,3	0,4±0,03
FAM	nekatalyzuje	nekatalyzuje	nekatalyzuje	nekatalyzuje
AC	nekatalyzuje	nekatalyzuje	nekatalyzuje	nekatalyzuje

Tab. 7.2 Kinetické parametry pro reakci DP a LAD(h) s testovanými substráty v přítomnosti SOD

Enzym	DP	DP	LAD(h)	LAD(h)
Kinetické parametry	K_m (mmol.l ⁻¹)	V_{max} (μ mol.l ⁻¹ .min ⁻¹)	K_m (mmol.l ⁻¹)	V_{max} (μ mol.l ⁻¹ .min ⁻¹)
GTN	5,7±0,6	8,3±0,6	2,2±0,2	0,2±0,02
FAL	25,0±0,9	0,1±0,01	17,1±1,0	0,6±0,05
NP	0,11±0,01	1,3±0,1	2,2±0,2	0,9±0,08
SNOG	3,6±0,3	2,9±0,2	0,4±0,04	0,4±0,03
SNAP	1,1±0,1	2,0±0,2	5,4±0,4	2,0±0,2
AO	Neměřitelné hodnoty	Neměřitelné hodnoty	Neměřitelné hodnoty	Neměřitelné hodnoty
HA	10,5±0,9	0,06±0,006	Neměřitelné hodnoty	Neměřitelné hodnoty
FAM	nekatalyzuje	nekatalyzuje	nekatalyzuje	nekatalyzuje
AC	nekatalyzuje	nekatalyzuje	nekatalyzuje	nekatalyzuje

Tab. 7.3 Kinetické parametry pro reakce LAD(h) a LAD(i) s GTN, FAL

Enzym	LAD(h)	LAD(h)	LAD(i)	LAD(i)
Kinetické parametry	K_m (mmol.l ⁻¹)	V_{max} (μ mol.l ⁻¹ .min ⁻¹)	K_m (mmol.l ⁻¹)	V_{max} (μ mol.l ⁻¹ .min ⁻¹)
GTN	0,9±0,09	0,2±0,02	1,4±0,1	0,2±0,02
FAL	2,7±0,1	0,1±0,01	17,8±1,4	0,9±0,1

Tab. 7.4 Kinetické parametry pro reakce LAD(h) a LAD(i) s GTN, FAL v přítomnosti SOD

Enzym	LAD(h)	LAD(h)	LAD(i)	LAD(i)
Kinetické parametry	K_m (mmol.l ⁻¹)	V_{max} (μ mol.l ⁻¹ .min ⁻¹)	K_m (mmol.l ⁻¹)	V_{max} (μ mol.l ⁻¹ .min ⁻¹)
GTN	2,2±0,2	0,2±0,02	16,9±1,2	1,3±0,1
FAL	17,1±1,0	0,6±0,05	15,8±0,8	0,2±0,02

Tab. 7.5 Kinetické parametry pro reakce DP, LAD(h), LAD(i) a GTR s PTIO

Enzym	PTIO	PTIO
Kinetické parametry	K_m (mmol.l ⁻¹)	V_{max} (μ mol.l ⁻¹ .min ⁻¹)
DP	1,7±0,1	1,7±0,1
LAD(h)	1,4±0,1	4,6±0,03
LAD(i)	0,4±0,04	0,3±0,02
GTR	nekatalyzuje	nekatalyzuje

V tabulkách jsou kinetické parametry (K_m a V_{max}) zaokrouhleny na jedno desetinné místo. Pouze u velmi nízkých hodnot jsou hodnoty uvedeny na dvě desetinná místa.

8 Diskuse

Řada donorů NO je již dlouhou dobu známa a rovněž je známo, že ve tkáních mohou tyto donory poskytovat NO samovolně nebo za enzymové katalýzy. O enzymech, které mohou takové reakce katalyzovat, toho však donedávna bylo známo velmi málo. Teprve v roce 2002 vyšla publikace [54] popisující enzym, který je schopen katalyzovat přeměnu GTN na NO. Šlo o mtALDH. Jinak se předpokládalo, že se na takových přeměnách mohou podílet blíže nesespecifické oxidoreduktasy závislé na NAD(P)H. Bylo také prokázáno, že jednou z oxidoreduktas schopných přeměňovat některé donory NO na NO je DP [10]. V našem případě byl srovnáván metabolismus NO donorů katalyzovaný bakteriální DP a živočišnou LAD.

Pro stanovení kinetických parametrů (K_m a V_{max}) byly zvoleny dvě skupiny látek. První skupinou jsou delší dobu známé a již používané donory NO (GTN, NP, SNOG, SNAP). Druhou skupinou jsou látky, které byly vytipované jako potenciální donory NO na základě své strukturní podobnosti s L-NOHA a při orientačních pokusech se studovanými enzymovými systémy uvolňovaly NO nejlépe (FAL, AO, FAM, AC, HA). Vznik NO ze studovaných látek je buď dobře znám anebo byl prokázán pomocí EPR spektroskopie [11].

Kinetické parametry byly zjišťovány z naměřených dat čtyřmi různými způsoby výpočtu, které nabízí program citovaný v odstavci 5.3 (grafické vyhodnocení). Prezentované grafy jsou však jen z vyhodnocení podle Lineweavera-Burka.

NO se za fyziologických podmínek nebo i v experimentálním vodním prostředí rychle přeměňuje převážně na dusitany: $4 \text{ NO} + \text{O}_2 + 2 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{ HNO}_2$ [27]. Proto jsme v našich pokusech pozorovali úroveň přeměny podle množství vzniklých dusitanů. To je všeobecně přijímaný přístup. Stanovení podle Griesse byla nejvhodnější metoda pro kvantifikaci konečného produktu vzniklého z NO.

Vedle aktivit, které byly sledovány v této diplomové práci, DP i LAD vykazují také NADH dehydrogenasovou aktivitu [66]. Při této reakci vzniká jako vedlejší produkt $\cdot\text{O}_2^-$. Proto byly srovnávány kinetické parametry přeměny donorů NO i v přítomnosti SOD. Zároveň je třeba počítat i s tím, že koncentrace NADH se během reakce se studovanými donory NADH dehydrogenasovou reakcí poněkud snižuje. Tato

skutečnost však v hodnotách kinetických parametrů nemohla být zohledněna. Kinetické parametry pro přeměnu GTN a FAL pomocí DP jsou v souladu s dříve získanými výsledky, tj. že GTN je na NO přeměňován mnohem rychleji než FAL [10].

Z tab.7.1 je zřejmé, že pro některé z testovaných donorů NO jsou lépe přeměňovány na NO LAD(h) než DP, u jiných je tomu opačně.

Z tab. 7.2 je vidět, že $\cdot\text{O}_2^-$ se podílí různou měrou na přeměně většiny testovaných donorů NO. Velmi malý vliv byl zjištěn jen při přeměně GTN ať už DP nebo LAD(h) a u SNAP v případě DP. Z porovnání LAD z různých zdrojů (LAD(h) a LAD(i)) (tab. 7.3) se dá říci, že testované substráty jsou hůře přeměňovány pomocí LAD(i) než pomocí LAD(h).

Jako jeden z dlouho známých donorů NO byl používán v této diplomové práci i SNOG. Z literatury je známo, že SNOG by neměl být substrátem GTR a tudíž, že by se tento enzym neměl podílet na vzniku NO z donoru NO [67, 68]. My jsme však získali právě opačné výsledky. Zdá se tedy, že GTR může významně přispívat ke vzniku NO z SNOG v živočišných tkáních. Kinetické parametry reakce GTR s SNOG významně ovlivňuje koncentrace enzymu. GTR je také specifický enzym, jiné zkoušené donory NO nejsou pro něj substráty.

Bylo zjištěno, že PTIO může být redukován LAD(h) i LAD(i). Zjištěné kinetické parametry byly srovnány s parametry zjištěnými pro DP. To, že DP může redukovat PTIO, bylo zjištěno již dříve [10], ovšem kinetické parametry této reakce nebyly zjišťovány. Redukci PTIO katalyzuje nejlépe LAD(i). GTR redukcí PTIO nekatalyzuje.

S výjimkou GTN nejsou zkoušené donory NO dobrými substráty pro DP, LAD(h) i LAD(i). Na přeměně těchto donorů NO se do větší nebo menší míry podílí $\cdot\text{O}_2^-$. Je zřejmé, že na metabolismu všech zkoušených donorů NO participují různé enzymové systémy, přinejmenším ty, které mohou produkovat $\cdot\text{O}_2^-$. A samozřejmě i další. Pro GTN byla jako takový enzym identifikována mtALDH. Je také zajímavé to, že některé donory NO, pro které byl prokázán vznik NO ve tkáni aorty pomocí EPR (FAL, FAM, AHA) nebyly vůbec substráty pro DP, LAD(h), LAD(i) a to FAM a AHA nebo byly relativně špatnými substráty a to FAL. Přesto tyto látky snižovaly za určitých podmínek krevní tlak potkanů po nitrožilní aplikaci [69]. Na metabolismu některých významných donorů NO se však LAD evidentně může podílet (např. GTN).

9 Závěr

- 1) Vybrané donory NO mohou být metabolisovány na NO pomocí DP a LAD.
- 2) Většinou se na přeměně na NO podílí různou měrou i superoxidový anion vznikající vedlejší reakcí těchto enzymů.
- 3) Pro všechny enzymové reakce byly zjištěny kinetické parametry a to jak v přítomnosti tak v nepřítomnosti SOD.
- 4) Byly porovnány i schopnosti metabolisovat vybrané donory pomocí LAD(h) a LAD(i).
- 5) Bylo zjištěno, že PTIO může být redukováno vedle DP i LAD(h) a LAD(i) a byly zjištěny kinetické parametry všech těchto reakcí.
- 6) SNOG může být na rozdíl od dřívějších zjištění metabolisován na NO pomocí GTR. Rovněž zde byly zjištěny kinetické parametry.
- 7) Donory NO mohou být zřejmě metabolisovány na NO řadou enzymových systémů. Nami zkoušené enzymy mohou být jedněmi z nich.

Seznam použité literatury

1. Moncada, S.; Palmer, R. M. J.; Higgs, E. A.: *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142 (1991)
2. Tullett, J. M.; Ress, D. D.: *Methods in molecular biology: Nitric oxide protocols* (Titheradge, M. A., Ed.), 205-214, Totowa, Humana Press (1998)
3. Feelish, M.: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **358**, 113-122 (1998)
4. Boucher, J.-L.; Genet, A.; Vadon, S.; Delaforge, M.; Henry, Y.; Mansuy, D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 880-886 (1992)
5. Renaud, J.-P.; Boucher, J.-L.; Vadon, S.; Delaforge, M.; Mansuy, D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**, 53-60 (1993)
6. Jousserandot, A.; Boucher, J.-L.; Henry, Y.; Niklaus, B.; Clement, B.; Mansuy, D.: *Biochemistry* **37**, 17179-17191 (1998)
7. Větrovský, P.; Boucher, J.-L.; Schott, C.; Beranová, P.; Chalupský, K.; Callizot, N.; Muller, B.; Entlicher, G.; Mansuy, D.; Stoclet, J.-C.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **303**, 823-830 (2002)
8. Mohazzab-H, K. M.; Kaminski, P. M.; Agarwal, R.; Wolin, M. S.: *Circ. Res.* **84**, 220-228 (1999)
9. Caro, A. A.; Cederbaum, A. I.; Stoyanovsky, D. A.: *Nitric oxide* **5**, 413-424 (2001)
10. Bartík, P.; Chalupský, K.; Vavruška, L.; Muller, B.; Stoclet, J.-C.; Entlicher, G.: *Physiol. Res.* **53**, 615-620 (2004)
11. Chalupský, K.; Lobysheva, I.; Nevpveu, F.; Gadea, I.; Beranová, P.; Entlicher, G.; Stoclet, J.-C.; Muller, B.: *Biochem. Pharmacol.* **67**, 1203-1214 (2004)
12. Akaike, T.; Yoshida, M.; Miyamoto, Y.; Sato, K.; Kohno, M.; Sasamoto, K.; Miyazaki, K.; Ueda, S.; Maeda, H.: *Biochemistry* **32**, 827-832 (1993)
13. Větrovský, P.; Stoclet, J.-C.; Entlicher, G.: *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **12**, 1311-1318 (1996)
14. Furchgoot, R. F.: *Mechanism of vasodilation* (Vanhouste, P. M, Ed.), 427-435, New York, Raven Press (1988)
15. Ignarro, L. J.; Byrns, R. E.; Buga, G. M.; Wood, K. S.: *Circ. Res.* **61**, 866-879 (1987)

16. Ignarro, L. J.; Buga, G. M.; Wood, K.S.; Byrns, R.E.; Chaudhuri, G.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 9265-9269 (1987)
17. Palmer, R. M. J.; Ferrige, A. G.; Moncada, S.: Nature **327**, 524-526 (1986)
18. Rapport, R.M.; Murad, F.: Circ. Res. **52**, 352-357 (1983)
19. Diamond, J.; Chou, E.B.: Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol. **41**, 369-381 (1986)
20. Martin, W.; Villani, G. M.; Jothinandan, D.; Furchgott, R. F.: J. Pharmacol. Exp. Ther. **232**, 708-716 (1985)
21. Martin, W.; Fuchgott, R. F.; Villani, G. M.; Jothinandan, D.: J. Pharmacol. Exp. Ther. **237**, 529-538 (1986)
22. Gryglewski, R. J.; Palmer, R. M. J.; Moncada, S.: Nature **320**, 539-547 (1986)
23. Rubanyi, G. M.; Vanhoutte, P. M.: Am. J. Physiol. **250**, H222-H227 (1986)
24. Azuma, H.; Ishikawa, M.; Sekizaki, S.: Br. J. Pharmacol. **88**, 411-415 (1986)
25. Radomski, M. W.; Palmer, R. M. J.; Moncada, S.: Br. J. Pharmacol. **92**, 181-187 (1987)
26. Stamler, J. S.; Singel, D.J.; Loscalzo, J.: Science **258**, 1898-1902 (1992)
27. Furchgott, R. F.; Khan, M.T.; Jothinandan, K. D.: *Endothelium – Derived Relaxing Factor* (Rubnanyi, G. M., Vanhoutte, P. M., Eds.), 8, Karger, Basel (1990)
28. Saran, M.; Michael, C.; Bors, W.: Free Radical Res. Commun. **10**, 221-226 (1990)
29. Liu, X.; Gillespie, J. S.; Martin, W.: Br. J. Pharmacol. **111**, 1287-1295 (1994)
30. Iyengar, R.; Stuehr, D. J.; Marletta, M. A.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 6369-6373 (1987)
31. Bonner, F. T.; Dzelkalns, L. S.; Bonnuci, J. A.: Inorg. Chem. **17**, 2487-2494 (1978)
32. Hecker, M.; Boese, M.; Schini-Kerth, V. B.; Mülsch, A. and Busse, R.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 4671-4675 (1995)
33. Doyle, M. P. and Hockstra, J. W.: J. Inorg. Biochem. **14**, 351-358 (1981)
34. Hidalgo, E.; Demple, B.: EMBO J. **13**, 138-146 (1994)
35. Hampl, V.: *Oxid dusnatý*. Dostupné z URL:
<http://fyziologie.lf2.cuni.cz/hampl/teach_mat/nitricox/index.html> [cit.26.1.2007]
36. Hampl, V.: J. Appl. Physiol.: **86**, 1185-1190 (1999)
37. Hampl, V.: News Physiol. Sci.: **11**, 114-119 (1996)
38. Ignarro, L. J.: Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **30**, 535-560 (1990)

39. Craven, P. A.; DeRubertis, F. R.: J. Biol. Chem. **253**, 8433-8443 (1978)
40. Gruetter, C. A.; Barry, B. K.; McNamara, D. B.; Gruetter, D. Y.; Kadowitz, P. J.; Ignarro, L. J.: Adv. Cyclic Nucleot. Res. **5**, 211-224 (1979)
41. Hibbs, J. B.; Taintor, R. R.; Vavrin, V.; Granger, D. L.; Drapier J.-C.; Amber, J. I.; Lancaster, J.R.: *Nitric Oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System*, (Moncada S., Higgs E.A, Eds) 189-223, Elsevier, Amsterdam (1990)
42. Drapier, J.-C.; Pellat, C.; Yann, H.: J. Biol. Chem. **266**, 10162-10167 (1991)
43. Lander, H. M.; Sehajpal, P. K.; Novogrodsky, A.: J. Immunol. **151**, 7182-7187 (1993)
44. Stuehr, D. J.; Griffith, O. W.: Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. **65**, 287-346 (1992)
45. Masters, B.S.S.: Ann. Rev. Nutr. **14**, 131-145 (1994)
46. Racek, J.; Holeček V.: Chem. Listy **93**, 774-780 (1999)
47. Bowler, C.; Van Montagu, M.; Inzé, D.: Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. **43**, 83 (1992)
48. Elstner, E. E.: *Der Sauerstoff*. Biochemie, Biologie, Medizin, B. L. Wiessenschaftsverlag, Mannheim (1990)
49. Fielden, E. M.; Roberts, P. B.; Bray, R. C.; Lowe, D. L.; Mautner, G. N.; Rotilio, G.; Calabrese, L.: Biochem. J. **139**, 499 (1974)
50. Schneeberger, H.; Schleibner, S.; Schilling, M.; Illner, W. D.; Abendroth, D.; Haucke, E.; Janicke, U.; Land, W.: Transplant. Proc. **22**, 2224- 2225 (1990)
51. Hosler, B. A.; Brown, R. H. Jr.: Adv. Neurol. **68**, 41-46 (1995)
52. de Lustig, E. S.; Serra, J. A.; Kohan, S.; Canziani, G. A.; Famulari, A. L.; Dominquez, R. Q.: J. Neurol. Sci. **115**, 18-25 (1993)
53. Kučera, M.; Racek, J.; Holeček, V.: Vnitř.Lék. **42**, 320 (1996)
54. Chen, Z.; Zhang, J.; Stamler, J.S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**, 8306-8311 (2002)
55. Massey, V.: Biochem. Biophys. Acta **37**, 314-322 (1996)
56. Matthewsw, R. G. and Williams, C. H., Jr.: J.Biol.Chem. **251** 3956-3964 (1976)
57. Patel, M. S. ; Harris, R. A.: FASEB J. **9**, 1164-1172 (1995)
58. Nathan, C.: FASEB J. **6**, 3051-3064 (1992)
59. Nathan, C.; Xie, Q-W.: J. Biol. Chem. **269**, 13725-13728 (1994)

60. Knowles, R. G.; Moncada, S.: *Biochem. J.* **298**, 249-258 (1994)
61. DeMaster, E.G.; Raij, L.; Archer, S.L. and Weir, E.K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**, 527-533 (1989)
62. Thomas, G.; Ramwell, P. W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 889-893 (1989)
63. Zhang, Y.; Hogg, N.: *Free Radic.Biol.Med.* **38**, 831-838 (2005)
64. Green, L.; Wagner, D.; Glogowski, J.; Skipper, P.L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S.R: *Anal. Biochem.* **126**, 131-138 (1982)
65. Velvarská, H.: *Diplomová práce*, Katedra biochemie PřF UK Praha (2006)
66. Zahrádka, J.: *Bakalářská práce*, Katedra biochemie PřF UK Praha (2006)
67. Nikitovic, D.; Holmgren, A.: *J. Biol. Chem.* **32**, 19180-19185 (1996)
68. Clancy, R.M.; Abramson, S.B.: *Anal. Biochem.* **204**, 365-371 (1992)
69. Jaroš, F. ; Straka, T. ; Dobešová, Z. ; Chalupský, K. ; Kuněš, J. ; Entlicher, G. ; Zicha, J.: *Eur. J. Pharmacol.* (odesláno do tisku)