

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

INTERAKCE DEKARBOXYLASY AROMATICKÝCH AMINOKYSELIN
S DERIVÁTEM KOENZYMU IN VITRO

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce :

Prof. MUDr. Jaroslav Dršata, CSc.

Hradec Králové 2006

Kamila Vančurová

Chtěla bych poděkovat svému školiteli prof. MUDr. Jaroslavu Dršatovi, CSc. za odborné rady, trpělivý přístup a pomoc, kterou mi poskytl při vypracování diplomové práce.

Zároveň děkuji paní Boženě Navrátilové a Mgr. Heleně Kaiserové za ochotnou spolupráci a ostatním pracovníkům Katedry biochemických věd FaF UK za pomoc při řešení dílčích problémů souvisejících s vypracováním zadané diplomové práce.

OBSAH

1. ÚVOD	6
2. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY	8
2. 1. Pyridoxalisonikotinoylhydrazon (PIH)	8
2. 1. 1. Hydrolýza PIH.....	11
2. 1. 2. Vlastnosti PIH	12
2. 2. Dekarboxylasa aromatických L-aminokyselin (DAAK, Aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC, EC 4. 1. 1. 28)	12
2. 2. 1. Pyridoxal-5-fosfát (PLP)	15
2. 2. 2. Fyziologický význam DAAK.....	17
2. 2. 3. Klinický význam DAAK.....	17
2. 2. 4. Regulace DAAK	18
2. 2. 5. Deficit DAAK	19
2. 3. Isoniazid (INH)	20
2. 4. Oxidační stres a ROS	21
2. 5. Železo	23
4. MATERIÁL A METODIKY	27
4. 1. Použité chemikálie	27
4. 1. 1. Substráty.....	27
4. 1. 2. Chemikálie pro přípravu pufrů	27
4. 1. 3. Chemikálie pro přípravu roztoků	27
4. 1. 4. Chemikálie pro scintilační stanovení $^{14}\text{CO}_2$	28
4. 2. Přístroje	28
4. 3. Enzym.....	28
4. 3. 1. Příprava enzymu.....	28
4. 3. 2. Postup přípravy enzymu.....	29
4. 4. Koenzym	29
4. 4. 1. Příprava roztoku pyridoxal-5-fosfátu	29
4. 4. 2. Postup přípravy roztoku pyridoxal-5-fosfátu	30
4. 5. Inhibitor	30

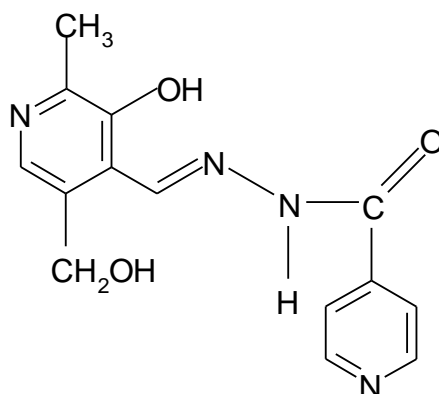
4. 5. 1. Příprava roztoku inhibitoru	30
4. 5. 2. Postup přípravy roztoku inhibitoru	30
4. 6. Metoda stanovení aktivity dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin pomocí substrátu značeného isotopem ^{14}C na karboxylu.....	31
4. 6. 1. Princip stanovení	31
4. 6. 2. Reagencie	31
4. 6. 3. Postup stanovení aktivity DAAK.....	32
4. 7. Pokusy se substrátem L-(karboxyl- ^{14}C)tyrosinem	33
4. 7. 1. Předběžné ověření substrátu Tyr ^{14}C	33
4. 7. 2. Hodnoty naměřené radioaktivity slepých vzorků pro substrát tyrosin-1- ^{14}C	35
4. 7. 3. Metodika stanovení enzymové aktivity dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin se substrátem Tyr ^{14}C	37
4. 7. 4. Metodika sledování enzymové kinetiky se substrátem Tyr ^{14}C	38
4. 7. 5. Metodika sledování inhibice dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin pyridoxalisonikotinoylhydrazonem (PIH).....	39
4. 7. 6. Metodika sledování kinetiky inhibované a neinhibované reakce se substrátem Tyr ^{14}C	40
4. 7. 7. Metodika sledování inhibice dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin pyridoxalisonikotinoylhydrazonem pro dvě rozdílné koncentrace substrátu Tyr ^{14}C	42
4. 7. 8. Pokus s měnicí se koncentrací pyridoxalofosfátu, koenzymu DAAK.....	43
4. 8. Pokusy se substrátem DL-3-(3,4-dihydroxyfenyl)alaninem-1- ^{14}C	44
4. 8. 1. Specifika pokusů se substrátem dopou-1- ^{14}C	44
4. 8. 2. Hodnoty naměřené radioaktivity slepých vzorků pro substrát dopou-1- ^{14}C	45
4. 8. 3. Metodika stanovení enzymové aktivity dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin se substrátem dopou-1- ^{14}C	46
4. 8. 4. Metodika ověření substrátu dopou-1- ^{14}C	47
4. 8. 5. Metodika sledování enzymové kinetiky se substrátem dopou-1- ^{14}C	48
4. 8. 6. Metodika sledování inhibice dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin pyridoxalisonikotinoylhydrazonem.....	48
4. 8. 7. Metodika sledování kinetiky inhibované a neinhibované reakce se substrátem dopou-1- ^{14}C	49

5. VÝSLEDKY	51
5. 1. Výsledky pokusů se substrátem L-(karboxyl- ¹⁴ C)tyrosinem	51
5. 1. 1. Výsledky stanovení aktivity dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin se substrátem L-tyrosinem- ¹⁴ C.	51
5. 1. 2. Výsledky sledování enzymové kinetiky se substrátem Tyr ¹⁴ C.....	52
5. 1. 3. Výsledky sledování inhibice dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin pyridoxalisonikotinoylhydrazonem.....	55
5. 1. 4. Výsledky sledování kinetiky inhibované a neinhibované reakce.....	59
5. 1. 5. Výsledky sledování inhibice dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin pyridoxalisonikotinoylhydrazonem pro dvě rozdílné koncentrace substrátu Tyr ¹⁴ C.....	60
5. 1. 6. Výsledky pokusu s měnící se koncentrací PLP.....	62
5. 2. Výsledky pokusů se substrátem DL-3-(3,4-dihydroxyfenyl)alaninem-1- ¹⁴ C (dopou-1- ¹⁴ C).	64
5. 2. 1. Výsledky pokusu k ověření dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin se substrátem dopou-1- ¹⁴ C.....	64
5. 2. 2. Výsledky pokusu k ověření substrátu dopu-1- ¹⁴ C.....	65
5. 2. 3. Výsledky sledování enzymové kinetiky pro substrát dopu-1- ¹⁴ C.....	67
5. 2. 4. Výsledky sledování inhibice dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin pyridoxalisonikotinoylhydrazonem.....	68
5. 2. 5. Výsledky sledování kinetiky inhibované a neinhibované reakce.....	70
6. DISKUSE	75
7. SOUHRN	81
8. ZÁVĚR.....	83

1. ÚVOD

Na katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové se již tradičně studují pyridoxalové enzymy, tzn. enzymy, jejichž koenzymem je pyridoxal-5-fosfát. Mezi pyridoxalové enzymy patří např. aminotransferasy a dekarboxylasy.

Zároveň byl na katedře k pokusům dostupný pyridoxalisonikotinoylhydrazon (PIH). Jde o látku ze skupiny aroylhydrazonů, jejíž zástupci mj. chrání před kardiotoxicitou anthracyklinových antibiotik. Uvažuje se pravděpodobně o využití jeho chelatačních vlastností v terapii nadbytku železa v organismu.



Obr. 1 Vzorec pyridoxalisonikotinoylhydrazonu

Ve vzorci PIH je možno vypočítat strukturu pyridoxalu a isoniazidu. PIH je relativně nestabilní, může se rozkládat na zmíněné látky. Isoniazid je značně reaktivní, což bylo dokázáno dřívějšími pracemi. Z důvodu podobnosti struktury PIH s koenzymem pyridoxalfosfátem (PLP) je možno uvažovat o působení PIH na aktivitu pyridoxalových enzymů.

Struktura PIH vypovídá o jeho značné lipofilitě. Existuje tudíž možnost, že by se při podání do organismu mohl hromadit v mozku a interferovat s různými enzymy, např. i s dekarboxylasou aromatických L-aminokyselin (Parkinsonova choroba).

Ukázalo se tedy jako zajímavé sledovat, zda PIH neovlivňuje aktivitu dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin (DAAK) a v jakém rozsahu.

Experimentální část diplomové práce zahrnovala sledování aktivity DAAK za využití dvou substrátů značených ^{14}C na karboxylu in vitro metodou a sledování vlivu PIH na její aktivitu. Na katedře byly již dříve prováděny pokusy se značenými substráty tyrosinem-1- ^{14}C a dopou-1- ^{14}C , které byly používány i v rámci této diplomové práce.

Praktická část byla doplněna rešerší současné literatury týkající se zejména PIH a DAAK.

2. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU PROBLEMATIKY

Ke zpracování přehledu jsem využívala separáty školitele, vyhledávání informací v databázi Medline a v případě nedostupnosti zejména starších prací v elektronické podobě jsem čerpala informace v Chemical Abstracts.

Cílem bylo částečně zmapovat vývoj a současných stav problematiky bezprostředně související s touto prací. Rešerše byla proto zaměřena na PIH a DAAK.

Dále jsem se snažila podat základní informace týkající se oxidačního stresu a vlivu iontů železa na jeho rozvoj.

Vzhledem k tomu, že ve struktuře PIH lze sledovat část odpovídající pyridoxalu a isoniazidu, zařadila jsem i kapitolu o reaktivitě isoniazidu. Interakce isoniazidu byly zkoumány hlavně dříve, informace jsou proto čerpala zejména v Chemical Abstracts.

Pyridoxal-5-fosfát je mj. koenzymem DAAK, informace o něm jsem proto zahrнула do části týkající se DAAK.

2. 1. Pyridoxalisonikotinoylhydrazon (PIH)

Pyridoxalisonikotinoylhydrazon (PIH) byl původně studován v padesátých letech minulého století jako koenzym pyridoxalových enzymů (Davison 1956, Duhault se sp. 1967). Později více autorů popsalo jeho schopnost chelatovat železo (Hoy se sp. 1979, Poňka se sp. 1979).

PIH má také schopnost předcházet poškozením vyvolaným volnými radikály (Schulman se sp. 1995).

PIH vzniká kondenzací pyridoxalu a hydrazidu kyseliny isonikotinové, jde o Schiffovu basi (imin). Jedná se o vůdčí sloučeninu skupiny aroylhydrazonů, nových chelátorů železa. PIH a některé jeho analogy vykazují vysokou chelatační aktivitu jak in vitro (Poňka se sp. 1988, Edward se sp. 1995, Edward se sp. 1997, Buss se sp. 2002a), tak in vivo (Bláha se sp.1998). PIH je schopen vázat volný nebo volně vázaný Fe^{3+} pomocí fenolového a karbonylového kyslíku a iminového dusíku. Ve vodném roztoku komplexy železo-PIH vykazují stechiometrii 1:2 (Buss se sp. 2002b).

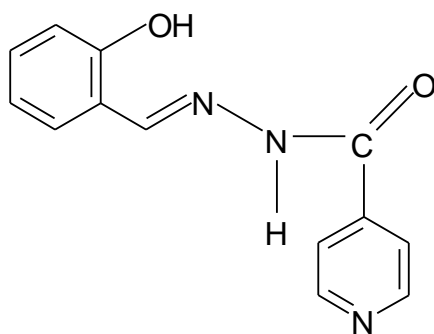
Analogy PIH podléhají hydrolyze v kyselém i zásaditém prostředí (Richardson se sp. 1989).

Hodnocením stability PIH ve své práci zabývala také Kovaříková se sp. (2005) s využitím HPLC.

Hydrolyza vlivem pH prostředí je důležitým faktorem výběru vhodné lékové formy. Při podání per os je třeba, aby látka odolala velmi kyselému prostředí žaludku a mohla být efektivně absorbována (Buss a Poňka 2003).

Buss se sp. (2002c) uvádí, že komplexy železo-chelátor způsobují oxidační stres, což může být hlavní příčinou jejich toxicity. PIH vykazoval nejnižší toxicitu, zatímco mnohem lipofilnější analog 2-hydroxy-1-naftaloylbenzoylhydrazon byl nejvíce toxický. Aroylhydrazony mobilizují železo a dochází k přechodné akumulaci komplexu železo-chelátor v cytosolu, což pravděpodobně koreluje s toxicitou. Rozsah akumulace roste s lipofilitou tohoto komplexu.

Schröterová se sp. (2004) se ve své studii zabývali vlivem pyridoxalisonikotinoylhydrazonu (PIH) a salicylaldehydisonikotinoylhydrazonu (SIH) na aktivitu enzymů podílejících se na metabolismu anthracyklinových antibiotik. Nejvýznamnějším nežádoucím účinkem terapie těmito antineoplastiky je na dávce závislá kardiomyopatie. Poškození srdečního svalu anthracykliny je pravděpodobně způsobeno produkcí volných kyslíkových radikálů. Vzhledem k antioxidačním schopnostem PIH a SIH a jejich vhodným biologickým, fyzikálním a chemickým vlastnostem jsou tyto sloučeniny považovány za kandidáty pro preklinické zkoušení a klinické hodnocení. Výsledky Schröterové se sp. (2004) poukazují na významnější pokles aktivit enzymů podílejících se na metabolismu daunorubicinu a doxorubicinu a jiných léčiv nebo xenobiotik pouze v případě použití vyšších koncentrací PIH a SIH než je koncentrace předpokládaná pro použití v praxi. Předpokládá se, že PIH a SIH nebudou interferovat s metabolismem společně podávaných léčiv a jiných xenobiotik. Anthracykliny znatelně redukuje aktivitu cytochromu P450. Přidání PIH a SIH dochází ke zvratu redukce a obnově až 90 % původní aktivity.



Obr. 2 Vzorec derivátu kyseliny salicylové, salicylaldehydisonikotinoylhydrazonu (SIH)

SIH zajišťuje velmi účinnou a rychlou ochranu myokardu před oxidačním stresem vyvolaným peroxidem vodíku H_2O_2 pravděpodobně přes železem katalyzovanou Fentonovu reakci. Produktem Fentonovy reakce je mj. hydroxylový radikál. Železo je za normálních podmínek v organismu v nereaktivní formě, protože je vázáno na bílkoviny (transferrin, ferritin). Během reperfúze ischemického myokardu reaktivní formy kyslíku uvolňují železo z bílkovin. Volné železo Fe^{2+} zajišťuje vznik toxického hydroxylového radikálu. Ochranný efekt SIH je výraznější než u deferoxaminu z důvodu pomalého a omezeného vstupu deferoxaminu do buněk. SIH chelatuje intracelulární železo, čímž se omezí jeho podíl na Fentonově reakci (Horáčková se sp. 2000).

Šimůnek se sp. (2005) zkoumali kardioprotektivní efekt pyridoxalisonikotinoylhydrazonu u králíků. PIH a jiné aroylhydrazony působí jako potenciální ochranné látky proti kardiotoxicitě vyvolané anthracykliny.

Studiem antiproliferativního potenciálu látek ze skupiny PIH se zabývali Richardson se sp. (1995). Železo představuje potenciální místo zásahu terapie zhoubného bujení z důvodu své klíčové role v buněčné proliferaci. Autoři došli k závěru, že pyridoxalové analogy jsou vhodnými kandidáty pro terapii onemocnění doprovázených nadbytkem železa v organismu, ale mají nízkou antiproliferativní aktivitu. Velký antiproliferativní potenciál, větší než deferoxamin, však vykazují deriváty 2-hydroxy-1-naphthylaldehydu.

V práci Tsafacka se sp. (1996) je uvedena další možnost terapeutického využití aroylhydrazonů. Terapeutickou hodnotu má pravděpodobně použití kombinace chelátorů železa jako antimalarik. Antimalarický efekt chelátorů železa je však omezen faktory vztahujícími se k permeaci léčiva a citlivosti parazita ke ztrátě železa. Efekt kombinace

salicylaldehydisonikotinoylhydrazonu nebo 2-hydroxy-1-naftylaldehyd-m-fluorobenzoylhydrazonu s deferoxaminem byl více než aditivní. SIH odnímá železo z postižených buněk a přenáší kov na extracelulární deferoxamin, předpokládá se synergický efekt hydrazonu pronikajícího do buněk a nepronikajícího chelátoru železa.

2. 1. 1. Hydrolýza PIH

K hydrolýze PIH dochází i při neutrálním pH, ale v kyselém nebo zásaditém prostředí probíhá hydrolýza PIH rychleji. Při hydrolýze dochází ke štěpení iminové vazby. Produktem hydrolýzy PIH a jeho analogů jsou příslušné aldehydy a hydrazidy. Kyselou hydrolýzu v žaludku po perorálním podání lze minimalizovat podáním PIH a jeho analogů spolu s uhlíčitánem vápenatým nebo formulací enterosolventních tablet (Richardson se sp. 1989). Při přibližně neutrálním pH (7,4) byl poločas hydrolytického rozkladu PIH kolem 24 hodin (Buss a Poňka 2003). Při pH 7,4 nedochází ke kompletní hydrolýze (Richardson se sp. 1989). Kovaříková se sp. (2005) uvádí, že nejnižší rozsah hydrolýzy byl pozorován v případě použití fosfátového pufru pH 7,0 a farmaceutických kosolventů (30 % PEG-300 a 10 % Cremophor EL). PIH hydrolyzuje rychleji než jeho analogy. Je to z důvodu silného elektrony odtahujícího efektu dusíkového atomu pyridinu hydrazidového kruhu, což se projeví jako pokles elektronové hustoty na iminovém uhlíkovém atomu z důvodu existence konjugovaného systému.

Při laboratorní teplotě hydrolýza probíhá rychleji v zásaditém prostředí (pH 9) než v přiměřeně kyselém (pH 2; 3,9). Zvýšená teplota signifikantně urychluje hydrolýzu (Kovaříková se sp. 2005).

Vedle hydrazonové vazby obsahuje PIH ještě jeden typ vazby citlivý k hydrolýze, vazbu hydrazidovou. Očekávaným produktem tohoto štěpení je kyselina isonikotinová, jejíž pík se objevil na HPLC chromatogramu při gradientové eluci provedené Kovaříkovou se sp. (2005). Byly jimi potvrzeny hlavní rozkladné produkty hydrolýzy, pyridoxal a isoniazid (INH), a jako minoritní produkt kyselina isonikotinová. Kovaříková se sp. (2005) se ve své práci zabývali také oxidační, fotolytickou a termální stabilitou PIH. Došli k závěru, že PIH je citlivější vůči hydrolýze než vůči oxidaci a pevná substance (PIH.2 HCl) je stálá pod vlivem vnějších podmínek (UV záření, teplo).

2. 1. 2. Vlastnosti PIH

PIH je barevná krystalická látka, zbarvená od světle žluté do oranžové, existující ve formě různých hydrátů a solí. Volná base je málo rozpustná ve vodném prostředí při neutrálním pH.

2. 2. Dekarboxylasa aromatických L-aminokyselin (DAAK, Aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC, EC 4. 1. 1. 28)

V rámci klasifikace enzymů je dekarboxylasa aromatických L-aminokyselin (DAAK) řazena do čtvrté třídy, mezi lyasy. Enzymy této třídy katalyzují nehydrolytické štěpení a energeticky nenáročný vznik vazeb C-C, C-N, C-O atd. Ze substrátu odštěpují nebo do něj vnášejí malé molekuly (CO₂, NH₃, H₂O, atd.) bez účasti dalšího reaktantu. Lyasy tvoří málo početnou skupinu enzymů. Do podtříd jsou enzymy děleny podle typu štěpených nebo vytvořených vazeb (Vodrážka 1996).

Systémové číslo charakterizuje zařazení enzymu v klasifikaci EC (Enzyme Commission). Dekarboxylase aromatických aminokyselin (DAAK) přísluší číslo EC 4. 1. 1. 28 (Internetová databáze Brenda 2006).

DAAK byla poprvé identifikována v extraktu ze savčích ledvin v roce 1938. Nejprve byla nazývána L-3,4-dihydroxyfenylalanin (L-dopa) dekarboxylasa (Holtz se sp. 1938). Bylo zjištěno, že extrakt způsobuje dekarboxylaci L-dopy a L-5-hydroxytryptofanu na dopamin a 5-hydroxytryptamin (serotonin).

DAAK je enzymem zodpovědným za dekarboxylaci při syntéze katecholaminů a indolaminů. Dekarboxylace řady aromatických L-aminokyselin a jejich α -metylderivátů může být katalyzována tímto enzymem. Toto zjištění vedlo k zavedení názvu dekarboxylasa aromatických L-aminokyselin (Lovenberg se sp. 1962).

DAAK způsobuje ireverzibilní dekarboxylaci různých aromatických L-aminokyselin, konkrétně dopy, m-tyrosinu, p-tyrosinu, fenylalaninu, 5-hydroxytryptofanu a tryptofanu. Nejvyšší afinitu k DAAK mají substráty 3,4-dihydroxyfenylalanin (dopa) a 5-hydroxytryptofan (Udenfriend 1964).

Molekula DAAK se skládá ze dvou identických podjednotek s molekulovou hmotností podjednotky přibližně 50 kDa (Nagatsu 1991).

Gen lidské DAAK je tvořen patnácti exony obsahující více než 85 kilobází (Sumi-Ichinose se sp. 1992). Titěž autoři podali i první informace o struktuře genu a lokalizaci genu pro DAAK na chromozomech u savců. Kang a Joh (1990) analyzovali sekvenci nukleotidů cDNA bovinní DAAK.

DAAK je přítomna jak v nervové tkáni, kde hraje specifickou roli jako biosyntetický enzym neurotransmitterů, tak v extraneuronální tkáni, kde působí jako nesespecifický dekarboxylační enzym (Zhu a Juorio 1995).

V centrálním nervovém systému je DAAK lokalizována hlavně v neuronech obsahujících katecholaminy a 5-HT (Hökfelt se sp. 1973). Nejvyšší koncentrace mRNA DAAK byla zjištěna v substantia nigra, locus coeruleus a nucleus raphe, předním hypothalamu a bulbus olfactorius. Ve striatu je nevelké množství mRNA DAAK (Eaton se sp. 1993). DAAK je přítomna v mozku, ale i v periferních tkáních, v nadledvinkách, ledvinách, játrech, pankreatu, gastrointestinálním traktu a plicích (Berry se sp.1996). Aktivita DAAK v nadledvinkách je vysoká a je zde také největší poměr enzymové aktivity pro substrát L-dopu a pro L-5-hydroxytryptofan z několika orgánů. V nadledvinkách je tedy aktivita DAAK primárně spojena se syntézou monoaminů. Přesná funkce DAAK v jednotlivých buňkách dalších periferních orgánů není úplně jasná. Enzym je přítomen poměrně hojně v játrech a ledvinách, ačkoliv v těchto orgánech nedochází k syntéze monoaminů (Zhu a Juorio 1995).

Je možné, že v gliových buňkách dochází k syntéze tyraminu, 2-fenylethylaminu nebo tryptaminu. Glie jsou doplňkovým místem, kde může docházet k dekarboxylaci L-dopy prostřednictvím aktivity DAAK. Toto je důležité u parkinsoniků, u nichž dochází k omezení syntézy dopaminu ve striatu a exogenní L-dopa může být dekarboxylována gliovou DAAK (Zhu a Juorio 1995). Jiní autoři uvádí jako nepravděpodobné, že by se gliová DAAK účastnila syntézy neurotransmitterů s výjimkou parkinsoniků, u kterých existuje možnost, že se DAAK stane limitující pro danou syntézu (Berry se sp. 1996). Nakamura se sp. (2000) zmiňují, že v případě Parkinsonovy choroby dochází ke ztrátě nigrostriálních dopaminergních neuronů obsahujících DAAK. Autoři hodnotili, zda u parkinsoniků striatální DAAK představuje významný zdroj dopaminu. Zjistili, že striatální DAAK patrně není primárním zdrojem dopaminu po dekarboxylaci L-dopy u parkinsoniků. Poznání zdroje a

lokalizace DAAK je podle nich nezbytné k pochopení komplikací terapie L-dopou a pro zavedení nových terapeutických přístupů pro pacienty s Parkinsonovou chorobou zahrnující buněčnou transplantaci a genovou terapii.

V lidském mozku je aktivita DAAK poměrně nízká (Vogel se sp. 1970, Lloyd a Hornykiewicz 1972). Nízké a proměnlivé hladiny dekarboxylasy aromatických aminokyselin v lidském mozku poukazují na její rozhodující vliv při syntéze monoaminů. Enzymová inhibice může proto významně ovlivnit syntézu biogenních aminů (Berry se sp. 1996).

Vedle syntézy neurotransmitterů má DAAK pravděpodobně ještě další funkce zahrnující přeměnu nových substrátů a vztahující se k autokrinnímu a parakrinnímu působení dopaminu v řadě periferních tkání (Berry se sp. 1996).

Jak popisuje Berry se sp. (1996), původně byla DAAK považována za neregulovaný enzym. Zhu a Juorio (1995) uvádí, že na regulaci enzymu se podílí rychlý mechanismus a dlouhodobý mechanismus. Rychlý mechanismus spočívá v aktivaci adenylátcyklasy a proteinkinasy C, dlouhodobý mechanismus v aktivaci změnou genetické exprese.

DAAK může být regulována pre- i posttranslačně. Pretranslačně znamená hladinou syntézy mRNA, pravděpodobným mechanismem posttranslační regulace DAAK je fosforylace. Struktura DAAK totiž obsahuje řadu míst pro fosforylaci cAMPdependentní proteinkinasy (PK-A), proteinkinasy C (PK-C), Ca^{2+} /kalmmodulin-dependentní proteinkinasy II (Ca-CM PK II) a prolinem řízenou proteinkinasy.

Proteinkinasy jsou enzymy regulující mnoho buněčných procesů. Katalyzují fosforylaci specifických serinových, treoninových a tyrosinových zbytků a tím mění funkce cílových proteinů (Kemp a Pearson 1990). Látky, které vedou k fosforylaci proteinů, zvyšují aktivitu DAAK.

Regulace aktivity DAAK je však primárně ovlivňována na presynaptické úrovni. Presynaptické receptory dopaminu jsou především D2 receptory (Creese se sp. 1983). Antagonisté těchto receptorů deinhibují adenylátcyklasu, což vede ke zvýšené produkci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) a následně k aktivaci proteinkinasy A (PK-A). Aktivovaná PK-A poté fosforyluje DAAK a zvyšuje tím její aktivitu. DAAK může existovat částečně fosforylovaná i za normálních podmínek (Berry se sp. 1996).

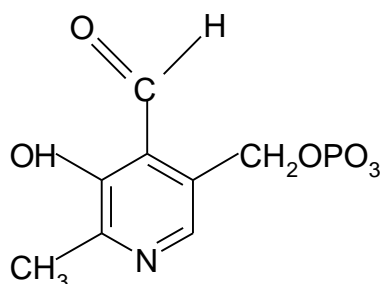
Pretranslační regulace se týká regulace genetické exprese. Byl pozorován rozdíl v regulaci genetické exprese u neuronální a mimoneuronální DAAK, což vedlo k poznatku, že DAAK

plní rozdílné funkce v neuronech a ostatní tkáni. Alternativní splicing v prvním exonu reguluje tkáňově specifickou expresi (Ichinose se sp.1992) .

V souvislosti s DAAK byla dlouhou dobu řešena otázka, zda za přeměnou všech substrátů stojí jeden enzym. Ve starších pracích je zmíněno, že pravděpodobně existují různé isoformy tohoto enzymu, které jsou přítomny jak v nervové, tak v ostatních tkáních. O'Malley se sp. (1995) uvádí, že isoformy DAAK vznikají v důsledku alternativního splicingu ve třetím exonu. Pouze jedna isoforma má aktivitu vůči L-dopě a L-5-hydroxytryptofanu, druhá je neaktivní. Je možné, že DAAK má ještě další doposud neznámé substráty. Existuje také možnost, že tato druhá isoforma dekarboxyluje substráty jako p-tyrosin a fenylalanin.

Někteří starší autoři zmiňují, že dekarboxylaci L-dopy a 5-hydroxytryptofanu katalyzují různé enzymy. Naproti tomu se vyskytly i názory, že se jedná o samostatný enzym s jedním katalytickým místem, ale s různými polohami pro připojení dvou substrátů (Bender a Coulson 1972) a že enzymatická dekarboxylace L-dopy a 5-hydroxytryptofanu je zajištěna proteinem získaným ze stejného genu a stejné mRNA. Existují však druhově a tkánově specifické varianty DAAK. mRNA DAAK vzniká na základě tkánově specifického alternativního splicingu transkriptu jednoho genu. Přes postupný vývoj s protichůdnými názory je dnes pravděpodobná existence jediné DAAK (Zhu a Juorio 1995). Byly podány přesvědčivé důkazy o existenci jedné DAAK na základě biologických a molekulárních studií. Coge se sp. (1990) zjistil, že primární sekvence DAAK v neuronální a mimoneuronální tkáni je identická. Některé patologické stavy jsou spojeny se sníženou nebo zvýšenou aktivitou DAAK. U Parkinsonovy choroby, vzhledem k dopaminergní degeneraci, dochází ke ztrátě aktivity DAAK ve srovnání s kontrolou (Gjedde se sp. 1993), u schizofrenie dochází ke zvýšení aktivity DAAK (Reith se sp. 1994).

2. 2. 1. Pyridoxal-5-fosfát (PLP)



Obr. 3 Vzorec koenzymu DAAK pyridoxal-5-fosfátu

Pro katalytickou aktivitu DAAK je nezbytná přítomnost pyridoxal-5-fosfátu (PLP). Pyridoxalfosfát je koenzymem řady enzymů podílejících se na metabolismu aminokyselin, mj. dekarboxylas a transaminas. Je vázán aldehydovou skupinou na ϵ -aminoskupinu lysinového zbytku DAAK, dochází k vytvoření Schiffovy baze mezi koenzymem a aminoskupinou postranního lysinového řetězce. α -aminoskupina přeměňované aminokyseliny vytlačí ϵ -aminoskupinu lysinu vytvoří s pyridoxalfosfátem novou Schiffovu basi (aldimin). Pyridoxalfosfát mezitím zůstane spojen s enzymem nekovalentně. Podle typu katalyzované reakce dochází následně k oslabení C-C vazby a dekarboxylaci aminokyseliny, oslabení C-H vazby a transaminaci, oslabení C-R vazby a aldolovému štěpení nebo labilizaci vazby C-N a racemizaci. Pyridoxalové enzymy katalyzují i eliminace a substituce na β - a γ -uhlíkových atomech aminokyselin (Vodrážka 1996).

Při redukci aktivity DAAK *in vitro* v důsledku nedostatku PLP je možné tento deficit překonat přidáním exogenního PLP (Rahman *se sp.* 1982). Dršata *se sp.* (1996) ve své práci potvrzují již dříve zveřejněnou myšlenku, že aktivitu DAAK lze zvýšit *in vitro* v přítomnosti těsně vázaného PLP přidáním exogenního koenzymu.

V práci Příbové *se sp.* (1991) týkající se inhibice DAAK látkami ze skupiny nesteroidních antiflogistik je uvedeno, že inhibice byla slabší v nepřítomnosti koenzymu než v jeho přítomnosti a že je možné předpokládat určitý podíl koenzymu na inhibičním mechanismu.

Pro aktivitu DAAK je zřejmě důležitá přítomnost thiolových skupin ve struktuře enzymu, interakce s těmito skupinami je součástí mechanismu inhibice (Dršata *se sp.* 1996). Pro katalytickou aktivitu DAAK je esenciální thiolová skupina Cys-111 ležícího blízko vazebného místa pro pyridoxalfosfát (Dominici *se sp.* 1991).

2. 2. 2. Fyziologický význam DAAK

DAAK hraje roli i v dalších buňkách kromě neuronů, v buňkách glie a periferních orgánech. DAAK je pravděpodobně přítomna v nadbytku v monoaminergních neuronech pro syntézu neurotransmiterů (Berry se sp. 1996). Reith se sp. (1994) přirovnává DAAK k fosfofruktokinase. Tento enzym stejně jako DAAK je přítomen ve značném nadbytku a je regulován. Fosfofruktokinasa je enzym, jehož aktivita má hlavní úlohu v regulaci rychlosti glykolýzy a katalyzuje přeměnu fruktosa-6-fosfátu na fruktosa-1,6-bisfosfát. Předpokládá se, že katalýza DAAK jako první kontrolovaný krok syntézy neurotransmiterů je také regulována.

DAAK v ledvinách se podílí na syntéze dopaminu, který následně reguluje retenci sodíku (Hayashi se sp. 1990) a vylučování fosfátu (Isaac se sp. 1992). V játrech se DAAK účastní dekarboxylace L-aminokyseliny pro následnou exkreci (Berry se sp. 1996).

2. 2. 3. Klinický význam DAAK

Regulace DAAK je významná pro průběh různých patologických stavů, např. Parkinsonovy choroby, zhoubného bujení a schizofrenie.

Charakteristickým znakem Parkinsonovy choroby je pokles syntézy dopaminu v bazálních gangliích.

Nejběžnější terapií Parkinsonovy choroby je kombinace L-dopy s periferním inhibitorem DAAK (karbidopa, benserazid), samostatně nebo v kombinaci s L-deprenylem. Účinnost terapie Parkinsonovy choroby L-dopou je přičítána dopaminu po dekarboxylaci exogenní L-dopy ve striatu vlivem DAAK (Birkmayer a Hornykiewicz 1961), zejména při současném podání periferního inhibitoru DAAK (Jaffe 1973). Abercrombie se sp. (1990) zjistil, že difuze dopaminu do striata z extrastriálních zdrojů (serotoninergních neuronů, buněk glie, které jsou u parkinsoniků zachovány) hraje významnou roli v terapii Parkinsonovy choroby L-dopou. V důsledku výrazného zvýšení centrálních hladin L-dopy a snížených hladin DAAK jako následek degenerace neuronů lze očekávat, že DAAK bude limitujícím enzymem a zvýšeného významu nabude gliová DAAK (Berry se sp. 1996). Terapie dopou omezuje sebe samu, protože dochází ke zvýšené stimulaci dopaminových receptorů v důsledku zvýšené syntézy dopaminu. Regulační mechanismus vede k poklesu aktivity DAAK a odtud syntézy

dopaminu z L-dopy. Tento regulační mechanismus pravděpodobně hraje roli v léčbě Parkinsonovy choroby. Pro pacienty léčené L-dopou z tohoto vyplývá, že je vhodné pravidelně vysazovat L-dopu, aby mohlo dojít k obnově homeostázy DAAK (Kopin 1993). Vhodná je také kombinace L-dopy a neuroleptik. L-deprenyl zvyšuje expresi mRNA DAAK (Li se sp. 1992). Podle novějších názorů u parkinsoniků patrně nedochází k výrazné dekarboxylaci L-dopy ve striatu. V souvislosti s léčbou Parkinsonovy choroby se v současnosti hovoří o buněčné transplantaci a genové terapii (Nakamura se sp. 2000).

Neexistuje jednotná teorie vzniku schizofrenie. Dříve byla uplatňována hyperdopaminergní teorie (Randrup a Munkvad 1972), hypodopaminergní teorie zahrnující DAAK představuje její zajímavou alternativu (Davis se sp. 1991). Je však jasné, že schizofrenie není jednoduše důsledek dopaminergní dysfunkce, ale pravděpodobně dochází ke změnám v řadě neuronálních systémů, které se mohou ve výsledku manifestovat jako změny v dopaminergní aktivitě (Sedvall a Farde 1995, Olney a Farber 1995). U pacientů se schizofrenií dochází ke změnám v aktivitě DAAK v důsledku změn v expresi mRNA a syntéze proteinů. Regulaci DAAK lze také vysvětlit zpožděním nástupu účinku neuroleptik (Berry se sp. 1996).

Redukce exprese mRNA DAAK je pravděpodobně mechanismem vzniku psychózy navozené léky (Buckland se sp. 1996).

Některé neoplazie periferních orgánů bývají často spojeny s extrémně vysokou aktivitou DAAK. K tomu dochází zejména u malobuněčného karcinomu plic (Watanabe se sp. 1994). Zhoubné bujení může být považováno za protiklad neurodegenerativních onemocnění. Zatímco degenerace představuje progresivní smrt buněk, zhoubné bujení je charakterizováno nekontrolovatelným dělením buněk. Vzestup aktivity DAAK v transformovaných buňkách může být důležitý pro chemoterapii. Např. v terapii některých typů malobuněčného karcinomu plic hraje DAAK roli jako cíl, proti kterému mohou být zaměřeny enzymem aktivované cytotoxické sloučeniny (Gilbert se sp. 1995).

2. 2. 4. Regulace DAAK

V rámci ontogeneze s ohledem na aktivitu DAAK rozeznáváme dvě období. Aktivita vzrůstá od narození do dospělosti, poté klesá s věkem (Brus 1975).

Mozková DAAK může být regulována přes dopaminové receptory. K aktivaci dochází následkem blokády dopaminového receptoru a k inhibici stimulací dopaminového receptoru (Zhu a Juorio 1995). Regulace striatální synaptosomální DAAK přes dopaminové receptory je závislá na vápníku (Zhu se sp.1994). Stimulace dopaminových receptorů ve striatálních synaptosomech jejich agonisty nebo blokáda jejich antagonisty vyvolává změny v systému druhých posílů (second messengers), čímž dochází k ovlivnění fosforylace, která vede ke změně v aktivitě DAAK. Jde o enzym, který může být regulován také na úrovni exprese genu. Regulace striatální DAAK je rychlá a dlouhodobá. Rychlá (krátkodobá) je založená na fosforylaci, ke které dochází do jedné hodiny od blokády dopaminového receptoru. Fosforylaci katalyzuje proteinkinasa C a další proteinkinasy (Zhu a Juorio 1995). Na dlouhodobé regulaci se podílí změna genetické exprese (Coge se sp. 1990).

2. 2. 5. Deficit DAAK

Je zajímavé, že v souvislosti s enzymem, který byl původně považován za nevýznamný a hojně se vyskytující, jsou dokumentovány i případy výskytu jeho deficitu.

Deficit DAAK byl poprvé u člověka zaznamenán v roce 1990 Hylandem a Claytonem. Provedli screening vzorků cerebrospinální tekutiny na abnormality v metabolitech neurotransmitterů u dětí s neidentifikovatelnými neurologickými poruchami. Charakteristickým znakem abnormalit v cerebrospinální tekutině u pacientů s deficitem DAAK je nízká hladina kyseliny homovanilové a 5-hydroxyindolyloctové, zvýšená hladina L-dopy, 5-hydroxytryptofanu, 3-ortometyldopy a normální hladiny pterinu.

Základním nástrojem k identifikaci pacientů s deficitem DAAK je screening neurotransmitterů v cerebrospinální tekutině (Swobodová se sp. 2003).

Deficit DAAK se projevuje vážným vývojovým opožděním, okulogyrickými krizemi a autonomními dysfunkcemi (Pons se sp. 2004). Autoři uvádí, že u pacientů byla zjištěna reziduální aktivita DAAK od nedetegovatelné hodnoty po 8 % původní aktivity. Všichni pacienti vykazovali hypotonii, hypokinezi, okulogyrické krize a znaky autonomní dysfunkce od raného věku. U poloviny pacientů bylo zjištěno zlepšení stavu po spánku a kolísání během dne.

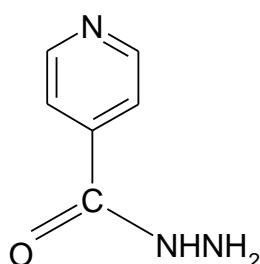
Léčba takto postižených pacientů je vedena agonisty dopaminu a IMAO. Léčba je prospěšná, ale dlouhodobá prognosa je nejasná. Pons se sp.(2004) uvádí variabilní odpověď pacientů na

léčbu. Rozlišili dvě skupiny, v první převažovali jedinci mužského pohlaví s žádoucí odpovědí na léčbu. Ve druhé skupině převládaly ženy se slabou odpovědí na léčbu, často doprovázenou dyskinezí indukovanou léky.

V práci Swobodové se sp. (2003) je zmíněno, že klinické znaky deficitu DAAK nastupují kolem šestého měsíce věku charakteristickými pohybovými poruchami. Poruchy pohybu u všech sledovaných pacientů zahrnovaly intermitentní okulogyrické krize, končetinové dystonie, generalizovanou atetózu a narušení volní pohyblivosti. Nejzávažnější charakter má úplná absence sympatické modulace srdečního rytmu a tlaku krve, která se může u pacientů s deficitem DAAK vyskytnout. Toto je významné zejména během anestezie, kdy jsou reflexy i tak otupené. Často se u pacientů vyskytují gastrointestinální symptomy, což je pravděpodobně dáno dysregulací autonomního systému.

Terapie je vedena různými skupinami léčiv, agonisty dopaminových receptorů, anticholinergiky, antiepileptiky, inhibitory MAO, serotoninergními látkami a léčivy ovlivňujícími gastrointestinální trakt (prokinetika, antacida) a dalšími. V současné době se spoléhá na podpůrnou léčbu symptomů běžně dostupnými léky. Náhrada vlastního enzymu pomocí kmenových buněk nebo genové terapie představuje směr vývoje léčby deficitu DAAK (Swobodová se sp. 2003).

2. 3. Isoniazid (INH)



Obr. 4 Vzorec antituberkulotika isoniazidu

Isoniazid (INH) je poměrně bezpečnou a účinnou látkou pro terapii i profylaxi tuberkulózy. Často se chronicky podává vážně nemocným pacientům s další medikací. U člověka byla zaznamenána schopnost INH zvyšovat plazmatické koncentrace a tím i toxicitu současně

podávaných léčiv a to i léčiv s úzkou terapeutickou šíří (např. fenytoinu). INH je účinným inhibítozem cytochromu P 450, zejména jeho isoform 2C19 a 3A. INH tímto zpomaluje eliminaci současně podaných léčiv (např. fenytoinu, karbamazepinu, diazepamu). Rozsah inhibice je závislý na koncentraci (Desta se sp. 2001).

INH inhibuje např. dekarboxylasu aromatických L-aminokyselin a aspartátaminotransferasu, jak dokládají starší práce.

Palm (1958) ve své práci uvádí, že INH inhibuje aktivitu DAAK tím, že blokuje koenzym pyridoxalfosfát (PLP). Inkubací PLP s INH vzniká pyridoxalisonikotinoylhydrazon.

INH reaguje rychle s pyridoxalovou formou aspartátaminotransferasy. Jde o kompetitivní inhibici s aspartátem. Disociační konstanta komplexu enzym-INH závisí na pH. Kyselá forma enzymu má vyšší afinitu k INH než bazická forma. Ve fosfátovém pufru bylo možno pozorovat 2 typy inhibice INH, rychlou a plně reverzibilní a pomalou a ireverzibilní. Pomalá inhibice pravděpodobně vychází z přeskupení primárního komplexu enzym-INH (Jenkins se sp. 1959). Původní aktivita sérové aspartátaminotransferasy může být obnovena in vitro pomocí pyridoxalfosfátu (PLP). Prolongovaná inkubace s PLP před podáním INH umožňuje tímto získat zpět většinu původní aktivity (Yamada se sp. 1984). Vliv INH na sérovou aspartátaminotransferasu může zkreslovat klinicko-biochemické výsledky.

Carrington se sp. (1984) uvádí, že INH inaktivuje lisyloxidasu (EC 1. 4. 3. 13) in vivo. Tento enzym je zodpovědný za iniciaci tvorby crosslinků v kolagenu a elastinu. Navíc INH vyvolává pokles jaterního obsahu PLP. K depleci PLP v játrech dochází během několika hodin, k inhibici lisyloxidasy dochází pomaleji. Injekcí stechiometrického množství PLP může být vyvolán zvrát účinků isoniazidu. Pyridoxal slouží mj. jako kofaktor lisyloxidasy. Inhibice lisyloxidasy INH je pravděpodobně způsobena kompeticí o potřebný kofaktor, pyridoxalfosfát.

2. 4. Oxidační stres a ROS

Pro zpracování této části jsem čerpala informace z přednášky pro studenty 3. ročníku farmacie zpracované Mgr. Ivou Boušovou. Dále jsem využívala databázi Medline.

Oxidační stres vzniká v důsledku narušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS). K nadměrné tvorbě RONS může docházet za některých metabolických situací, v rámci reoxygenace tkáně po proběhlé ischemii nebo např.

příjmem redoxně působících xenobiotik. Může být poškozena také činnost antioxidantního systému organismu nebo mohou nastat obě situace najednou.

V současné době se při studiu některých patologických stavů připisuje značný vliv oxidačnímu stresu. Jde o tzv. nemoci z volných radikálů, onemocnění, která souvisí s oxidačním stresem (free radical diseases). Mezi ně lze zařadit zejména aterosklerózu a z ní vycházející onemocnění na podkladě ischemie, diabetes mellitus 1. i 2. typu, zhoubné nádory, revmatoidní artritida, Parkinsonovu chorobu, Alzheimerovu chorobu a řadu dalších.

Na rozvoji těchto onemocnění se podílí reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species, ROS). Pojem zahrnuje jak volné radikály, tak látky bez nepárového elektronu podílející se na metabolismu volných radikálů. Mají řadu fyziologických funkcí při přenosu energie, působí jako signální molekuly, dále se například peroxid vodíku uplatňuje při syntéze hormonů štítné žlázy. Také v souvislosti s oplodněním vajíčka se uplatňují ROS.

ROS mohou také působit toxicky.

Tab. 1 Reaktivní formy kyslíku

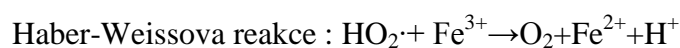
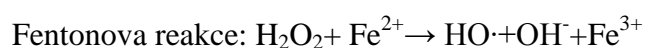
Volné radikály	Látky, které nejsou volnými radikály
Superoxid $O_2^{\cdot-}$	Ozon O_3
Hydroxyl HO^{\cdot}	Singletový kyslík 1O_2
Peroxyl ROO^{\cdot}	Peroxid vodíku H_2O_2
Alkoxy RO^{\cdot}	Kyselina chlorná $HClO$
Hydroperoxy HO_2^{\cdot}	

ROS se uplatňují také jako druzí poslové (second messengers) v buněčných signálních cestách. K indukci dochází změnou koncentrací ROS, které jsou nízké. Mechanismus jejich působení je založen na změnách aktivity transkripčních faktorů nuclear factor kappa B (NF- κ B) a activator protein 1 (AP-1).

Na vzniku a vzájemných přeměnách reaktivních forem kyslíku se podílí ionty přechodných kovů, zejména železa a mědi. V organismu jsou tyto prvky vázány v neaktivních formách (ferritin, transferin, ceruloplasmin).

Jelikož se na produkci reaktivních forem kyslíku, jak bylo již zmíněno, podílí železo a doposud se ze skupiny chelátorů železa v klinické praxi používá téměř výhradně deferoxamin, jsou na pozici chelátorů železa hledány nové struktury. Za vhodné kandidáty jsou považovány analogy pyridoxalisonikotinoylhydrazonu (PIH).

Při podávání kombinace redukované formy glutathionu a chelátorů železa byl pozorován pokles intracelulární hladiny reaktivních forem kyslíku (ROS) (Yun se sp. 2003). Efekt redukované formy glutathionu je připisován redukci ROS. Podávání chelátorů železa, deferoxaminu a aurintrikarboxylové kyseliny, vede k inhibici Fentonovy a Haber-Weissovy reakce podporující syntézu ROS.



Podávání kombinace glutathionu a chelátorů železa snižuje hladinu ROS účinněji ve srovnání s podáním těchto látek jednotlivě (Yun se sp. 2003).

Postižené buňky jsou vysoce citlivé k oxidačnímu stresu.

2. 5. Železo

Železo je prvkem nezbytným pro řadu esenciálních biologických funkcí jako je transport kyslíku, transfer elektronů a syntéza DNA. Pokud však není vázáno na specifické ligandy, hraje železo důležitou roli v tvorbě toxických kyslíkových radikálů a tím se podílí na oxidativním poškození buněčných struktur (aminokyselin, lipidů, proteinů, koenzymů atd.). Železo v organismu katalyzuje jednoelektronové redoxní reakce. Jejich nejreaktivnějším produktem je hydroxylový radikál, který poškozuje proteiny, nukleové kyseliny a lipidy (Buss se sp. 2002c).

U člověka dochází k omezeným výměnám železa s vnějším prostředím, dobře funguje reutilizace z vnitřních zdrojů. U vrozené poruchy, zahrnující vrozenou hemochromatózu, je třeba mobilizovat nadbytečné železo z postižených tkání pomocí flebotomie (Buss se sp. 2002b). Vzhledem k tomu, že organismus má omezené možnosti exkrece nadbytečného množství železa, může se nadbytek železa v organismu vyvinout také jako následek chronické

hyperabsorpce železa z diety a příjmu velkého množství železa parenterálně. Sekundární nadbytek železa se objevuje zejména po často opakovaných transfúzích, u pacientů s thalassemia major, aplastickou anemií a myelodysplastickým syndromem. U těchto pacientů nelze použít flebotomii. Jedinou možností léčby sekundárního overloadu železa je podání chelátorů železa (Buss se sp. 2002b).

Terapie pacientů trpících chorobami jako je thalassemia major vyžaduje hledání nových orálně účinných látek pro léčbu poruch s nadbytkem železa. Deferoxamin je doposud jedinou, běžně klinicky dostupnou látkou pro chelataci železa (Buss se sp. 2002b). Chelatační terapie deferoxaminem sice zlepšila vyhlídky pacientů s thalassemií, ale problém tohoto postupu představuje compliance pacientů. Deferoxamin se totiž podává ve formě dlouhodobých subkutánních infúzí. To je jedním z důvodů snah o vývoj orálně účinných chelátorů. Pro pacienty s nadbytkem železa navozeným transfúzemi, u nichž je nedostatečný účinek léčby deferoxaminem, je v současnosti k dispozici několik orálně účinných látek. Nejvýznamnější z nich je deferipron a ICL670. Deferipron lépe proniká membránami a má vyšší kardioprotektivní efekt než deferoxamin. Za optimální je považována kombinovaná chelatační terapie. Jde o použití slabého chelátoru, který dobře proniká buňkami, a silnějšího chelátoru s účinnou exkrecí močí. Tato kombinace vede k vylepšení terapeutického efektu, její účinek je aditivní. Zvyšuje pravděpodobnost úspěchu terapie u pacientů, u nichž nebyla účinná terapie deferoxaminem a deferipronem v monoterapii (Hershko se sp. 2005).

Bernhardt se sp. (2005) ve své práci uvádí, že v současnosti byly syntetizovány a charakterizovány další nové látky, látky ze skupiny N-aryl-N'-pikolinoylhydrazinových chelátorů. Ve všech případech byla pozorována N, N, O trojboká koordinace chelátoru se železem. Účinnost těchto látek při mobilizaci železa z buněk a inhibici uptake železa z transferinu byla větší než u deferoxaminu, který je v současnosti používán v běžné praxi, a podobná jako u orálně účinného chelátoru pyridoxalisonikotinoylhydrazonu (PIH). Nejúčinnější chelátory vykazovaly nízkou antiproliferativní aktivitu, která je podobná nebo nižší než u deferoxaminu, což je důležité z hlediska jejich potenciálního využití při léčbě nadbytku železa (Bernhardt se sp. 2005).

Za ideální jsou považovány chelátory potlačující poškození tkání způsobené volnými radikály a zároveň zachovávající dostupnost železa pro esenciální buněčné procesy. To není případ deferoxaminu. Deferoxamin sice potlačuje tvorbu volných radikálů, ale je také účinným

inhibitorem buněčné proliferace pravděpodobně proto, že odstraňuje železo potřebné pro buněčné procesy (Buss se sp. 2002b).

Mezi základní požadavky kladené na orálně podávaný chelátor železa patří dobrá absorpce z gastrointestinálního traktu a afinita k železu bez ovlivnění metabolismu jiných kovů. Nemělo by docházet ke kumulaci komplexu železo-chelátor ve tkáni.

Z výše uvedeného vyplývá, že je žádoucí zavedení orálně dostupných a levnějších chelátorů železa pro léčbu sekundárního nadbytku železa v organismu.

PIH a jeho analogy jsou slibnými kandidáty na pozici orálně dostupných chelátorů železa. Z důvodu specifity pro železo je PIH poměrně netoxický, jak in vitro, tak in vivo (Buss se sp. 2002b).

3. CÍL PRÁCE

Cíle této diplomové práce lze definovat v několika bodech:

1.) Prvním úkolem této práce bylo zpracovat rešerši o PIH a DAAK jako pyridoxalovém enzymu. V případě DAAK měla být zpracovaná rešerše obsáhlejší. Cílem bylo podat více informací o DAAK než jen informace bezprostředně související s inhibicí DAAK.

2.) Experimentální část práce byla zaměřena na sledování pyridoxalisonikotinoylhydrazonu. Cílem bylo zjistit, zda PIH může ovlivňovat aktivitu pyridoxalových enzymů. Vliv PIH na pyridoxalové enzymy byl studován na dekarboxylase aromatických aminokyselin získané z jater potkana se dvěma substráty značenými ^{14}C na karboxylu. Pro pokusy byl zvolen značený substrát L-tyrosin a nejvíce sledovaný značený substrát D,L-dihydroxyfenylalanin (dopa).

Výsledky této práce měly přispět ke sledování negativních účinků PIH jako chelátoru železa.

3.) Předpokládalo se, že PIH bude ovlivňovat aktivitu DAAK ve smyslu inhibice. Cílem bylo zjistit rozsah inhibičního vlivu a určit typ inhibice.

4.) Součástí práce bylo odhadnout základní kinetické parametry enzymové reakce za konkrétních experimentálních podmínek in vitro pro dva substráty, L-tyrosin-1- ^{14}C a D,L-dopu-1- ^{14}C . Cílem pokusů bylo ověřit Michaelisovu konstantu K_m a maximální rychlost reakce V_{\max} a určit afinitu jednotlivých substrátů k DAAK.

5.) Z podobnosti PIH a koenzymu DAAK pyridoxalfosfátu vycházel předpoklad o jejich vzájemné kompetici. Cílem bylo platnost tohoto předpokladu ověřit..

4. MATERIÁL A METODIKY

4. 1. Použité chemikálie

4. 1. 1. Substráty

L-(carboxyl-¹⁴C)tyrosin (Life Science, Amersham, Anglie) ředěný neznačeným L-tyrosinem (Merck) na specifickou aktivitu 113,6 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ a rozpuštěný v 0,02 M fosfátovém pufru pH 6,8 na koncentraci 0,4 mg/ml, uchovávaný ve zmrazeném stavu pod inertní atmosférou dusíku.

DL-3-(3,4-dihydroxyfenyl)alanin-1-¹⁴C (American Radiolabelled Chemicals, St. Louis, USA) ředěný neznačeným DL-dihydroxyfenylalaninem na specifickou aktivitu 53,19 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ a rozpuštěný v 0,02 M fosfátovém pufru pH 6,8 na koncentraci 1 mg/ml. K roztoku byla přidána kyselina L-askorbová v koncentraci 1 mg/ml a byl uchován ve zmraženém stavu pod inertní atmosférou argonu.

4. 1. 2. Chemikálie pro přípravu pufrů

dihydrogenfosforečnan sodný p. a. (Lachema Brno)

hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát p.a. (Penta Chrudim)

4. 1. 3. Chemikálie pro přípravu roztoků

hydroxid draselný (Litolab spol. s r.o., Litovel)

kyselina sírová, p. a. (Lachema Brno)

pyridoxal-5-fosfát (Koch Light Laboratories Ltd., Colnbrook Bucks, Anglie)

pyridoxalisonikotinoylhydrazon (dar od prof. Poňky, McGill University, Montreal, Kanada)
dimethylsulfoxid Chromasolv for high performance liquid chromatography (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo)

4. 1. 4. Chemikálie pro scintilační stanovení $^{14}\text{CO}_2$

Sigma-Fluor High performance LSC Cocktail for aqueous samples (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo)

4. 2. Přístroje

Potterův-Elvehjemův homogenizátor Potter S, B Braun Biotech. International (Německo)
centrifuga, Biofuge Stratos, Heraeus (Německo)

pH metr, WTW inoLab pH Level 2, Weilheim (Německo)

analytické váhy CP 225D Sartorius AG Göttingen (Německo)

předvážky BL 310 Sartorius AG Göttingen (Německo)

magnetická míchačka - IKA Color Squid (Německo)

- MM 2A Laboratorní přístroje Praha

ultrazvuková lázeň VWR Ultrasonic Cleaner (Leuven, Malajsie)

shaker, MS 2 Minishaker, IKA Works (USA)

upravená termostatovaná vodní lázeň typ U 10 (Německo)

kapalinový scintilační počítač 1219 Rackbeta (LKB Wallac), RIL FaF UK

4. 3. Enzym

4. 3. 1. Příprava enzymu

Dekarboxylasa aromatických L-aminokyselin

Vzhledem k tomu, že enzym není dostupný v čištěné podobě a předchozí pokusy o jeho purifikaci nebyly úspěšné, používala jsem pro pokusy s DAAK jako zdroj enzymu supernatant získaný centrifugací potkaních jater v potřebném množství čištěné vody .

4. 3. 2. Postup přípravy enzymu

Potkaní samci kmene Wistar z chovné stanice Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové, krmení standardní peletovanou potravou a chování za standardních podmínek, byli usmrceni dekapitací nůžkami v celkové anestezii navozené etherem. Pomocí nůžek jim byla vyjmuta játra a ta byla přenesena na misku chlazenou ledem. Játra byla zvážena, hmotnost jater se pohybovala kolem dvanácti gramů. Podle hmotnosti v gramech byl k játrům přidán čtyřnásobek vody v mililitrech. Jaterní tkáň byla nejprve rozstříhána nůžkami v kádince s vodou. Suspenze byla dále zpracována v Potter-Elvehjemově homogenizátoru běžným způsobem (cca 10-15 otáček pístu za vteřinu, pohyb pístu sedmkrát nahoru a dolů, přičemž veškerý obsah zkumavky vždy prošel mezi pístem a stěnou zkumavky). Zkumavka, ve které byla prováděna homogenizace, byla chlazená v nádobě s ledovou drtí a vodou. Homogenizace probíhala v chladicí místnosti při teplotě 5°C. Homogenát byl rozvážen do kyvet centrifugy a bylo provedeno odstředování při teplotě 1°C po dobu 33 minut při 20000g. Poté byl z kyvet sesbíráán supernatant zbavený zbytků buněčných membrán atd., které vytvořily peletu usazenou ve spodní části kyvety. Získaný supernatant byl rozpipetován po vhodných objemech podle očekávané spotřeby v připravovaných pokusech do lahviček a byl zamražen při teplotě -18°C do dalšího zpracování. Pro pokusy byl použit vždy čerstvě rozmrazený supernatant. Supernatant se neředil.

4. 4. Koenzym

4. 4. 1. Příprava roztoku pyridoxal-5-fosfátu

DAAK patří mezi pyridoxalové enzymy. Jednou ze složek inkubační směsi byl tudíž roztok pyridoxal-5-fosfátu.

4. 4. 2. Postup přípravy roztoku pyridoxal-5-fosfátu

Roztok pyridoxalfosfátu byl připraven navážením potřebného množství PLP a rozpuštěním ve vhodném pufru za míchání na magnetické míchače. Roztok byl připravován v čas potřeby.

4. 5. Inhibitor

4. 5. 1. Příprava roztoku inhibitoru

Pokusy byly provedeny s potenciálním inhibitorem DAAK, látkou ze skupiny aroylhydrazonů, pyridoxalisonikotinoylhydrazonem (PIH). S ohledem na problematickou rozpustnost PIH ve vodném prostředí a existující riziko zpětného vykrystalizování PIH v průběhu pokusu nebyly připravovány zásobní roztoky PIH, ale roztoky potřebné koncentrace byly získány ex tempore rozpuštěním navážky PIH. PIH bylo třeba nejprve rozpustit ve vhodném množství dimethylsulfoxidu (DMSO) a teprve po dokonalém rozpuštění v DMSO byl přidán pufr. Následným ředěním zpravidla geometrickou řadou byly připraveny roztoky potřebné koncentrace.

4. 5. 2. Postup přípravy roztoku inhibitoru

K navážce PIH v radiolahvičce byl nejprve přidán DMSO usnadňující rozpuštění ve vodném prostředí. Obsah radiolahvičky s PIH a 100 % DMSO byl dostatečně promíchán na shakeru. Toto většinou nevedlo k úplnému rozpuštění krystalů PIH. Rozpouštění bylo proto dále podpořeno pomocí ultrazvuku ponořením radiolahvičky do ultrazvukové lázně.

K jednomu dílu roztoku PIH ve 100 % DMSO bylo přidáno devět dílů pufru a byl získán roztok základní koncentrace v 10 % DMSO, ze kterého byly získány ředěním pufrům s 10 % DMSO další potřebné koncentrace PIH v 10 % DMSO. Složení inkubační směsi v pokusech bylo navrženo tak, aby výsledná koncentrace DMSO v inkubační směsi byla 5 %. Byl

proveden pokus, z jehož výsledků byla tato koncentrace DMSO určena jako optimální při srovnání rizika ovlivnění aktivity enzymu a případného zpětného vykrystalizování PIH v průběhu pokusu.

4. 6. Metoda stanovení aktivity dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin pomocí substrátu značeného isotopem ^{14}C na karboxylu

4. 6. 1. Princip stanovení

Metoda použitá pro stanovení aktivity DAAK byla popsána Dršatou a Haisem (1973).

Aktivita dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin odpovídá radioaktivitě uvolněného značeného oxidu uhličitého $^{14}\text{CO}_2$, který vzniká dekarboxylací sledovaných na karboxylu značených substrátů v přítomnosti exogenního kofaktoru pyridoxal-5-fosfátu.

Uvolněný $^{14}\text{CO}_2$ se po vytěsnění z inkubační směsi kyselinou sírovou zachycuje v roztoku hydroxidu draselného.

K měření uvolněné radioaktivity byl použit kapalinový scintilační počítač.

4. 6. 2. Reagencie

Substráty:

L-tyrosin-1- ^{14}C viz kapitola 4. 1. 1.

D,L-3-(3, 4-dihydroxyfenyl)alanin-1- ^{14}C viz kapitola 4. 1. 1.

Enzym:

Dekarboxylasa aromatických L-aminokyselin viz kapitola 4. 3.

Koenzym:

Pyridoxal-5-fosfát, vodný roztok různých výsledných koncentrací (řádově 10^{-5} M v případě substrátu L-tyrosin-1- ^{14}C , resp. 10^{-6} M v případě substrátu D,L-3-(3,4-dihydroxyfenyl)alanin-1- ^{14}C) ve vhodném pufru viz kapitola 4. 4.

Inhibitor:

Pyridoxalisonikotinoylhydrazon, vodný roztok s přidavkem DMSO různých koncentracích viz kapitola 4. 5.

3 M resp. 2 M roztok kyseliny sírové viz kapitola 4. 1. 3.

30 % resp. 40 % roztok hydroxidu draselného viz kapitola 4. 1. 3.

4. 6. 3. Postup stanovení aktivity DAAK

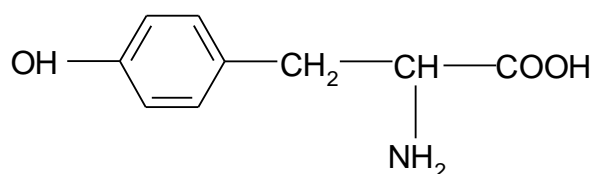
Pro stanovení byly použity speciálně pro tuto metodu zhotovené inkubační lahvičky připravené z radiolahviček opatřených ve šroubovacím uzávěru s pryžovým těsněním několika otvory. Středovým otvorem prochází drátek, na němž je zavěšen proužek chromatografického papíru (Whatman 31, rozměr 2,7 x 0,8 cm), který se před stanovením zvlhčí roztokem 30 %, resp. 40 % hydroxidu draselného. Další otvory jsou určeny pro injekci substrátu a kyseliny sírové a v případě použití dopy-1- ^{14}C jako substrátu pro jehly zajišťující přívod inertní atmosféry argonu a odvod vzduchu z lahvičky.

Do lahviček byly napipetovány jednotlivé složky inkubační směsi, které zahrnovaly enzym ve formě supernatantu potkaních jater, roztok pyridoxal-5-fosfátu a pufru, popřípadě roztok inhibitoru. Proužek chromatografického papíru byl navlhčen částečným ponořením do 30 % (v případě substrátu tyrosinu-1- ^{14}C), resp. 40 % (v případě substrátu dopy-1- ^{14}C) roztoku hydroxidu draselného tak, aby po uzavření lahvičky nedošlo k odkápnutí do reakční směsi. V případě substrátu dopy-1- ^{14}C bylo nutné vytěsnit vzduch z lahvičky pomocí argonu, jelikož tento substrát není na vzduchu stabilní.

Po uzavření lahviček byla provedena preinkubace pět minut vložení připravených lahviček do vodní lázně termostátované na 37 °C a třepáním ve vodní lázni. Následovala vlastní inkubace, která byla zahájena přidáním substrátu značeného ^{14}C na karboxylu. Do

jednotlivých lahviček byl substrát injikován v intervalu jedné minuty. Reakce v lahvičkách byla zastavena injekcí 3 M (v případě substrátu tyrosinu-1- ^{14}C), resp. 2 M (v případě substrátu dopy-1- ^{14}C) roztoku kyseliny sírové tak, aby ve všech lahvičkách probíhala inkubace přesně 30 minut. Kyselina sírová vytěsnila $^{14}\text{CO}_2$ vzniklý dekarboxylací Tyr ^{14}C nebo dopy-1- ^{14}C z roztoku. Lahvičky byly dále ponechány za stálého třepání v termostátované vodní lázni hodinu od zastavení reakce v první lahvičce. Poté byly postupně uzávěry lahviček odšroubovány a proužky chromatografického papíru připevněné na drátku po jednom opatrně vyjmuty pomocí pinzety bez jakéhokoliv dotyku proužku s pinzetou, stěnou lahvičky a pod. Proužky byly vloženy do připravených tapwalek s 1,3 ml scintilačního roztoku (Sigma-Aldrich). Obsah tapwalek tvořený proužkem chromatografického papíru ve scintilačním roztoku byl zamíchán na shakeru po dobu deseti vteřin a tapwalka byla vložena do čisté radiolahvičky. Radiolahvičky byly pevně zašroubovány, aby nedošlo k úniku radioaktivity, a označeny. Takto byly vzorky připraveny ke změření uvolněné aktivity pomocí kapalinového scintilačního počítače 1219 Rackbeta (LKB Wallac) v Radioisotopové laboratoři Faf UK HK.

4. 7. Pokusy se substrátem L-(karboxyl- ^{14}C)tyrosinem



Obr. 5 Vzorec aminokyseliny tyrosinu

4. 7. 1. Předběžné ověření substrátu Tyr ^{14}C

Předtím než bylo možno zahájit pokusy s radioaktivním substrátem tyrosinem-1- ^{14}C , byl proveden pokus, který ověřil použitelnost substrátu Tyr ^{14}C . Byly připraveny vzorky bez enzymu s měnící se koncentrací substrátu Tyr ^{14}C . Výsledná koncentrace koenzymu pyridoxal-5-fosfátu v pokusu byla $1,43 \cdot 10^{-5}$ M.

Pro množství substrátu Tyr¹⁴C 0,1 a 0,5 ml byly připraveny tři vzorky, pro 0,2 ml substrátu bylo připraveno pět vzorků.

Pokus byl proveden podle postupu uvedeného v kapitole 4. 6. 3. Postup stanovení aktivity DAAK.

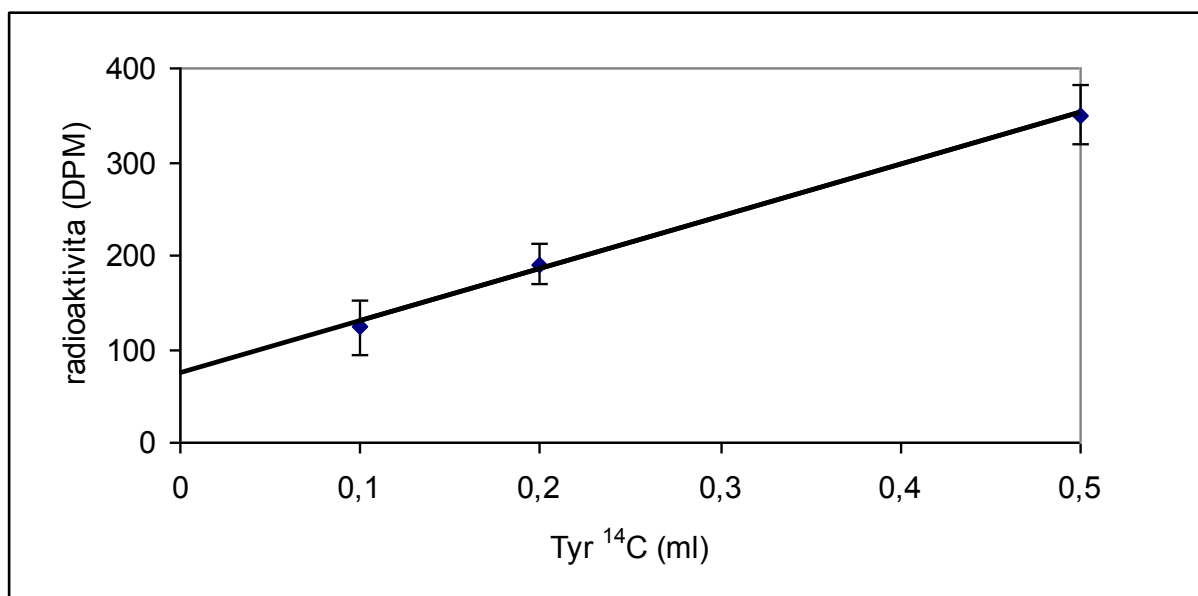
Množství jednotlivých složek v inkubační směsi a časové rozvržení pokusu uvádí tabulka 2.

Tab. 2 Složení inkubační směsi slepých vzorků (vzorků bez enzymu).

0,02 M pufr pH 6,8 (ml)	1,9	1,8	1,5
PLP v 0.1M pufru pH 7.2 (ml)	0,1	0,1	0,1
preinkubace 5 minut za stálého třepání ve vodní lázni při 37°C			
substrát Tyr ¹⁴ C (ml)	0,1	0,2	0,5
inkubace přesně 30 minut za stálého třepání ve vodní lázni při 37°C			
3M kyselina sírová (ml)	0,5	0,5	0,5
ponechání vzorků 60 minut za stálého třepání ve vodní lázni při 37°C, dále dle 4. 6. 3. Postup stanovení aktivity DAAK			

Tab. 3 Naměřené hodnoty radioaktivity vzorků se zachyceným produktem a katalytické aktivity pro měnící se množství substrátu Tyr¹⁴C.

Tyr ¹⁴ C (ml)	0,1	0,2	0,5
průměr aktivit (pkat)	0,24	0,38	0,69
průměr radioaktivit (DPM)	123,2	191,1	350,5
směrodatná odchylka	28,7	21,4	32,3



Obr. 6 Závislost radioaktivity uvolněné samovolně v průběhu inkubace na koncentraci substrátu (neenzymatický děj). Body znázorňují průměr ze tří hodnot. Pouze u množství substrátu 0,2 ml šlo o průměr z pěti hodnot.

Výsledky ukázaly lineární závislost uvolněné radioaktivity na koncentraci Tyr¹⁴C. Hodnoty uvolněné radioaktivity v nepřítomnosti enzymu byly nízké, substrát Tyr¹⁴C bylo možno použít.

4. 7. 2. Hodnoty naměřené radioaktivity slepých vzorků pro substrát tyrosin-1-¹⁴C.

V této kapitole jsou uvedeny hodnoty radioaktivity naměřené pro slepé vzorky, tzn. vzorky bez enzymu, pro představu o rozsahu neenzymatické dekarboxylace pro koncentrace tyrosinu-1-¹⁴C používané v jednotlivých pokusech s tímto substrátem.

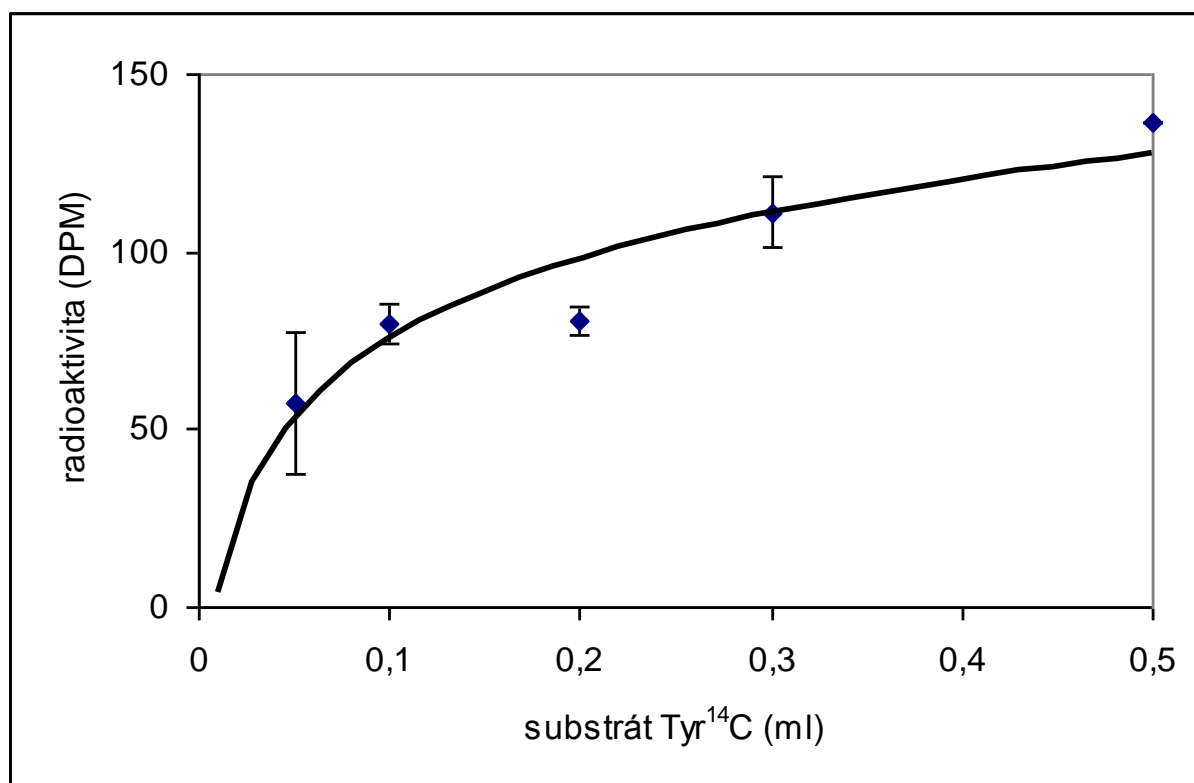
Jde o doplnění informací získaných z předchozího pokusu, jsou zde uvedeny hodnoty pro všechny koncentrace substrátu použité v jednotlivých pokusech. Hodnoty byly naměřeny v pokusu 4. 7. 6. Metodika sledování kinetiky inhibované a neinhibované reakce se substrátem Tyr¹⁴C pro koncentrace substrátu 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 a 0,5 ml. Množství jednotlivých složek v inkubační směsi slepých vzorků pro substrát Tyr¹⁴C je uvedeno v tabulce 4.

Tab. 4 Složení inkubační směsi vzorků bez enzymu pro substrát Tyr¹⁴C. Výsledná koncentrace koenzymu PLP v inkubační směsi byla $1,5 \cdot 10^{-5}$ M.

0,02M pufr pH 6,8 (ml)	0,45	0,4	0,3	0,2	0
PLP v 0,1 M pufru pH 7,2 (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
supernatant (ml)	0	0	0	0	0
substrát Tyr ¹⁴ C (ml)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,5
0,1 M pufr pH 7,2 (ml)	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3

Tab. 5 Naměřené radioaktivity vzorků se zachyceným produktem pro jednotlivé koncentrace substrátu Tyr¹⁴C.

substrát Tyr ¹⁴ C (ml)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,5
radioaktivita (DPM)	57,4	79,55	80,4	111,3	136,5
směrodatná odchylka	19,9	5,4	3,9	9,6	0,1
Aktivita (pkat)	0,11	0,16	0,16	0,22	0,27



Obr. 7 Závislost naměřené radioaktivity na koncentraci substrátu Tyr¹⁴C u slepých vzorků. Závislost uvádí rozsah neenzymatické dekarboxylace během inkubace pro různé koncentrace značeného substrátu Tyr¹⁴C.

4. 7. 3. Metodika stanovení enzymové aktivity dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin se substrátem Tyr¹⁴C.

Dalším úkolem bylo zjistit optimální koncentraci enzymu pro sledování kinetiky enzymové reakce. Protože šlo o první pokus (s výjimkou pokusu ověřující použitelnost substrátu) se substrátem L-tyrosinem-¹⁴C, který byl proveden, bylo potřeba optimalizovat podmínky reakce a zjistit koncentraci enzymu a substrátu, při které bude dosaženo vyhovující měřitelné aktivity enzymu.

Vzorky obsahovaly konstantní množství substrátu Tyr ¹⁴C 0,5 ml a různá množství supernatantu (enzymu). Výsledná koncentrace koenzymu PLP v inkubační směsi byla 2.10⁻⁵ M.

Pokus byl proveden podle postupu popsaného v kapitole 4. 6. 3. Postup stanovení aktivity DAAK.

Uspořádání pokusu je uvedeno v tabulce 6 včetně množství jednotlivých složek přidávaných do inkubační směsi a časového rozvržení.

Tab. 6 Složení inkubační směsi pro zjištění optimální koncentrace enzymu

0.02 M pufr pH 6.8 (ml)	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,9
PLP v 0.1M pufru pH 7.2 (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
supernatant (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0
	preinkubace 5 minut za stálého třepání ve vodní lázni při 37°C					
substrát Tyr ¹⁴ C (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	inkubace přesně 30 minut za stálého třepání ve vodní lázni při 37°C					
3M kyselina sírová (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	ponechání vzorků 60 minut za stálého třepání ve vodní lázni při 37°C, dále dle 4.					

6. 3. Postup stanovení aktivity DAAK

4. 7. 4. Metodika sledování enzymové kinetiky se substrátem Tyr¹⁴C

Narozdíl od předchozího stanovení byl tento pokus proveden s pěti různými koncentracemi substrátu Tyr¹⁴C k přesnější charakterizaci kinetiky dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin z jater potkana. Pokus byl opět proveden dříve popsanou metodou 4. 6. 3. Postup stanovení aktivity DAAK. Byl použit konstantní přídavek supernatantu 0,3 ml a různé koncentrace substrátu. Výsledná koncentrace PLP v pokusu byla $1,5 \cdot 10^{-5}$ M.

Cílem pokusu bylo ověřit Michaelisovu konstantu K_m . Tato hodnota charakterizuje afinitu substrátu k enzymu.

Uspořádání pokusu je uvedeno v tabulce 7.

Tab. 7 Složení inkubační směsi pro sledování kinetiky dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin pro substrát Tyr¹⁴C.

0.02 M pufr pH 6.8 (ml)	0,45	0,4	0,3	0,2	0
0.1 M pufr pH 7.2 (ml)	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
PLP v 0.1 M pufru pH 7.2 (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
supernatant (ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
preinkubace 5 minut za stálého třepání ve vodní lázni při 37°C					
substrát Tyr ¹⁴ C (ml)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,5
inkubace přesně 30 minut za stálého třepání ve vodní lázni při 37°C					
3M kyselina sírová (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
ponechání vzorků 60 minut za stálého třepání ve vodní lázni při 37°C, dále dle 4. 6. 3. Postup stanovení aktivity DAAK					

4. 7. 5. Metodika sledování inhibice dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin pyridoxalisonikotinoylhydrazonem (PIH)

Jedním z úkolů při vypracování této diplomové práce bylo zjistit, zda dochází k inhibici dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin PIH a v jakém rozsahu.

Pokus byl proveden obdobně jako v předchozích případech metodou 4. 6. 3. Postup stanovení aktivity DAAK. Navíc bylo potřeba připravit roztok potenciálního inhibitoru PIH a vnést jej do inkubační směsi.

Rozpuštění pevné substance PIH ve vodném pufru je obtížné a vyžadovalo použití DMSO, který usnadňuje jeho rozpouštění. Toto bylo podrobněji rozebráno v kapitole 4. 5.

Byly provedeny dvě inkubace, což umožnilo získat větší počet hodnot a sledovat vliv potenciálního inhibitoru ve více koncentracích. Pokusy byly provedeny pro tyto výsledné koncentrace roztoku inhibitoru: 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , $2,5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$ a 10^{-3} M. Ve vzorcích bylo použito konstantní množství supernatantu (0,3 ml) a substrátu (0,2 ml). Výsledná koncentrace PLP dosažená v inkubační směsi byla $1,5 \cdot 10^{-5}$ M.

Uspořádání pokusů a výsledné koncentrace PIH v prvním a druhém pokusu jsou uvedeny v tabulkách 8 a 9.

Tab. 8 Uspořádání prvního pokusu sledování inhibice DAAK PIH.

	10^{-3} M PIH	10^{-4} M PIH	10^{-5} M PIH	10^{-6} M PIH	0 M PIH	sl.
supernatant (ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0
0.02 M pufr pH 6.8 (ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
PLP v 0.1 M pufru pH 7.2 (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
PIH v pufru pH 7.2 s 10% DMSO	1	1	1	1	0	0
0.1 M pufr pH 7.2 (ml)	0	0	0	0	0	0,3
10%DMSO v 0.1	0	0	0	0	1	1

M pufru pH 7.2 (ml)						
preinkubace 5 minut za stálého třepání ve vodní lázni při 37°C						
substrát Tyr ¹⁴ C (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
inkubace přesně 30 minut za stálého třepání ve vodní lázni při 37°C						
3M kyselina sírová (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
ponechání vzorků 60 minut za stálého třepání ve vodní lázni při 37°C, dále dle 4. 6. 3. Postup stanovení aktivity DAAK						

Tab. 9 Uspořádání druhého pokusu sledování inhibice DAAK PIH.

	10 ⁻³ M PIH	5.10 ⁻⁴ M PIH	2.5.10 ⁻⁴ M PIH	10 ⁻⁴ M PIH	10 ⁻⁵ M PIH	0 M PIH	sl.
supernatant (ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0
0.02 M pufr pH 6.8 (ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
PLP v 0.1 M pufru pH 7.2 (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
PIH v pufru pH 7.2 s 10% DMSO	1	1	1	1	1	0	0
0.1 M pufr pH 7.2 (ml)	0	0	0	0	0	0	0,3
10%DMSO v 0.1 M pufru pH 7.2 (ml)	0	0	0	0	0	1	1
preinkubace 5 minut za stálého třepání ve vodní lázni při 37°C							
substrát Tyr ¹⁴ C (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
inkubace přesně 30 minut za stálého třepání ve vodní lázni při 37°C							
3M kyselina sírová (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
ponechání vzorků 60 minut za stálého třepání ve vodní lázni při 37°C, dále dle 4. 6. 3. Postup stanovení aktivity DAAK							

4. 7. 6. Metodika sledování kinetiky inhibované a neinhibované reakce se substrátem Tyr¹⁴C

V pokusu byla porovnávána kinetika inhibované a neinhibované reakce. Z výsledků předchozích pokusů bylo zjištěno, že hodnota IC_{50} je blízká, při výběru z koncentrací inhibitoru použitých v pokusech, výsledné koncentraci inhibitoru $2,5 \cdot 10^{-4}$ M.

Pokus byl uspořádán tak, aby ve vzorcích roztok inhibitoru zaujímal polovinu objemu, proto byl do lahvíček pipetován roztok PIH o koncentraci $5 \cdot 10^{-4}$ M (v 10 % DMSO). Pro množství substrátu 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 a 0,5 ml byly připraveny tři druhy vzorků, vzorek bez inhibitoru, s inhibitorem a slepý vzorek bez enzymu a bez inhibitoru. Kromě slepých vzorků obsahovaly všechny vzorky konstantní množství supernatantu (0,3 ml). Výsledná koncentrace PLP v pokusu byla $1,5 \cdot 10^{-5}$ M.

Tab. 10 Složení inkubační směsi pro sledování kinetiky inhibované a neinhibované reakce.

vzorek	bez I	s I	sl.	bez I	s I	sl.	bez I	s I
0,02M pufr pH 6,8 (ml)	0,45	0,45	0,45	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3
PLP v 0,1 M pufru pH 7,2 (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
supernatant (ml)	0,3	0,3	0	0,3	0,3	0	0,3	0,3
substrát Tyr ^{14}C (ml)	0,05	0,05	0,05	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
0,1 M pufr pH 7,2 (ml)	1 (1)	0	1,3(1)	1 (1)	0	1,3(1)	1 (1)	0
PIH v 0,1 M pufru pH 7,2 s 10% DMSO (ml)	0	1	0	0	1	0	0	1
vzorek	sl.	bez I	s I	sl.	bez I	s I	sl.	
0,02M pufr pH 6,8 (ml)	0,3	0,2	0,2	0,2	0	0	0	
PLP v 0,1 M pufru pH 7,2 (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	
supernatant (ml)	0	0,3	0,3	0	0,3	0,3	0	
substrát Tyr ^{14}C (ml)	0,2	0,3	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5	
0,1 M pufr pH 7,2 (ml)	1,3(1)	1 (1)	0	1,3(1)	1 (1)	0	1,3(1)	
PIH v 0,1 M pufru pH 7,2 s 10% DMSO (ml)	0	0	1	0	0	1	0	

Pozn.1: V závorce je uveden podíl 0,1 M pufru pH 7,2 s 10% DMSO z celkové množství pufru pH 7,2 uvedeného před závorkou. Tzn. vzorky bez inhibitoru obsahovaly 1 ml 0,1 M

pufu pH 7,2 s 10% DMSO. Slepé vzorky obsahovaly 1 ml 0,1 M pufu pH 7,2 s 10% DMSO a 0,3 ml 0,1 M pufu pH 7,2 bez 10% DMSO.

Pozn. 2: I = inhibitor

sl.= slepý vzorek (bez enzymu a bez inhibitoru)

4. 7. 7. Metodika sledování inhibice dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin pyridoxalisonikotinoylhydrazonem pro dvě rozdílné koncentrace substrátu Tyr¹⁴C.

Výše popsanou metodou 4. 6. 3. Postup stanovení aktivity DAAK použitou pro všechny pokusy s Tyr¹⁴C bylo provedeno také sledování inhibice pro dvě různé koncentrace substrátu. Cílem bylo potvrdit typ inhibice zjištěný z vynesení dle Lineweavera a Burka.

Pro pokus byla zvolena množství substrátu Tyr¹⁴C 0,1 a 0,5 ml, konstantní množství supernatantu 0,3 ml a koncentrace PIH 10^{-5} , 10^{-4} , $2,5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$ a 10^{-3} M. Výsledná koncentrace PLP dosažená v inkubační směsi byla $1,5 \cdot 10^{-5}$ M.

Množství jednotlivých složek v inkubační směsi vyjadřuje tabulka 11.

Tab. 11 Složení inkubační směsi pro sledování inhibice PIH pro dvě koncentrace substrátu Tyr¹⁴C.

	10^{-3} M PIH	$5 \cdot 10^{-4}$ M PIH	$2,5 \cdot 10^{-4}$ M PIH	10^{-4} M PIH	10^{-5} M PIH	0M PIH	sl.
supernatant (ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0
0,02M pufr pH 6,8 (ml)	0.4/0	0.4/0	0.4/0	0.4/0	0.4/0	0.4/0	0.4/0
PLP v 0,1 M pufru pH 7.2 (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
substrát Tyr ¹⁴ C (ml)	0,1/0,5	0,1/0,5	0,1/0,5	0,1/0,5	0,1/0,5	0,1/0,5	0,1/0,5
PIH v 0,1 M pufru pH 7.2 s 10%DMSO	1	1	1	1	1	0	0
0,1 M pufr pH 7.2 (ml)	0	0	0	0	0	0	0,3
10%DMSO v 0,1 M pufru pH 7.2	0	0	0	0	0	1	1

4. 7. 8. Pokus s měnicí se koncentrací pyridoxalfosfátu, koenzymu DAAK

Poslední pokus provedený se substrátem Tyr¹⁴C byl zaměřen na zjištění vlivu koncentrace pyridoxalfosfátu na aktivitu enzymu pro neinhibovanou reakci a pro reakci inhibovanou pyridoxalisonikotinoylhydrazonem (PIH) ve výsledné koncentraci $2,5 \cdot 10^{-4}$ M v 5 % DMSO. Byl vysloven předpoklad, že by na základě podobnosti struktury PIH s pyridoxalfosfátem mohlo docházet ke vzájemné kompetici a vytěsnění PIH nadbytkem PLP.

Složení inkubační směsi a postupné ředění roztoku pyridoxalfosfátu odpovídalo požadovaným výsledným koncentracím PLP ve vzorcích.

Byly zvoleny řádově se měnicí koncentrace PLP $1,5 \cdot 10^{-3}$, $1,5 \cdot 10^{-4}$, $1,5 \cdot 10^{-5}$, $1,5 \cdot 10^{-6}$ a $1,5 \cdot 10^{-7}$ M.

Koncentrace substrátu i supernatantu s výjimkou slepých vzorků bez supernatantu byla konstantní.

Praktické provedení pokusu bylo podobné jako ve všech uvedených případech viz 4. 6. 3. Postup stanovení aktivity DAAK.

Tab. 12 Složení inkubační směsi v pokusu s měnicí se koncentrací PLP pro neinhibovanou a inhibovanou reakci.

inhibovaná reakce							
	0 M PLP	$1,5 \cdot 10^{-7}$ M PLP	$1,5 \cdot 10^{-6}$ M PLP	$1,5 \cdot 10^{-5}$ M PLP	$1,5 \cdot 10^{-4}$ M PLP	$1,5 \cdot 10^{-3}$ M PLP	sl.
0,02M pufr pH 6,8 (ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
PLP v 0,1 M pufru pH 7.2 (ml)	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
substrát Tyr ¹⁴ C (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
supernatant (ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0
PIH v 0,1 M pufru pH 7.2 s 10%DMSO	1	1	1	1	1	1	0
0,1 M pufr pH 7.2 (ml)	0,2	0	0	0	0	0	1,3
neinhibovaná reakce							

	0 M PLP	$1.5 \cdot 10^{-7} \text{M}$ PLP	$1.5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ PLP	$1.5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ PLP	$1.5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ PLP	$1.5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ PLP	sl.
0,02M pufr pH 6,8 (ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
PLP v 0,1 M pufru pH 7.2 (ml)	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
substrát Tyr ¹⁴ C (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
supernatant (ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0
PIH v 0,1 M pufru pH 7.2 s 10%DMSO	0	0	0	0	0	0	0
0,1 M pufr pH 7.2 (ml)	1,2	1	1	1	1	1	1,3

4. 8. Pokusy se substrátem DL-3-(3,4-dihydroxyfenyl)alaninem-1-¹⁴C

4. 8. 1. Specifika pokusů se substrátem dopou-1-¹⁴C.

Pokusy provedené se substrátem dopou-1-¹⁴C byly v podstatě analogické pokusům provedeným s Tyr¹⁴C. V metodice pokusů s dopou-1-¹⁴C jsou však v porovnání s pokusy s Tyr¹⁴C některé důležité odlišné momenty.

Po napipetování potřebného množství pufru, roztoku pyridoxal-5-fosfátu, supernatantu a roztoku PIH u inhibované reakce byly proužky chromatografického papíru v uzávěrech inkubačních lahvíček navlhčeny 40 % roztokem KOH a lahvičky byly uzavřeny.

Z důvodu nestability dopy-1-¹⁴C na vzduchu bylo nezbytné ze všech vzorků, včetně vzorků slepých, odstranit vzduch a nahradit jej inertní atmosférou. V pokusech byl jako zdroj inertní atmosféry použit plynný argon.

Prakticky bylo odstraňování vzduchu provedeno tak, že přes jeden otvor v uzávěru bylo propíchnuto těsnění dutou jehlou s širším průměrem pro odvod vzduchu nad reakční směsí. Druhým otvorem procházela jehla napojená přes hadičku na tlakovou nádobu s argonem.

U každého vzorku včetně slepých vzorků byla atmosféra vyměňována po dobu jedné minuty, výměna atmosféry byla kontrolována ověřením odchodu proudu vzduchu z lahvičky.

Po „probublání“ všech vzorků následovala preinkubace 5 minut ve vodní lázni vytemperované na 37°C. Vlastní inkubace byla zahájena injekcí potřebného množství dopy-1-

^{14}C . Inkubace byla ukončena přesně po 30 minutách 0,5 ml 2 M kyseliny sírové. Vzorky byly ponechány v temperované vodní lázni za stálého třepání další hodinu od zastavení reakce v první lahvičce. Po hodině byly vzorky po jednom vyjmuty z temperované lázně, proužek chromatografického papíru na drátku procházející středem uzávěru byl opatrně vyjmut pomocí pinzety tak, aby nedošlo ke kontaktu papírku s okolním prostředím, a papírky byly postupně vloženy do připravených tapwalek s 1,3 ml scintilačního roztoku. Následovalo promíchání obsahu tapwalky po dobu 20 vteřin na shakeru a vložení tapwalky do prázdné radiolahvičky. Po uzavření a označení byly takto vzorky připraveny ke změření.

4. 8. 2. Hodnoty naměřené radioaktivity slepých vzorků pro substrát dopu-1- ^{14}C .

Stejně jako u substrátu tyrosinu-1- ^{14}C jsem i v případě dopy-1- ^{14}C zařadila kapitolu, která informuje o rozsahu neenzymatické dekarboxylace pro jednotlivé koncentrace substrátu dopy-1- ^{14}C . Hodnoty byly naměřeny v pokusu 4. 8. 7. Metodika sledování kinetiky inhibované a neinhibované reakce se substrátem dopou-1- ^{14}C pro množství substrátu 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 a 0,4 ml.

Množství jednotlivých složek v inkubační směsi slepých vzorků pro substrát dopu-1- ^{14}C je uvedeno v tabulce 13.

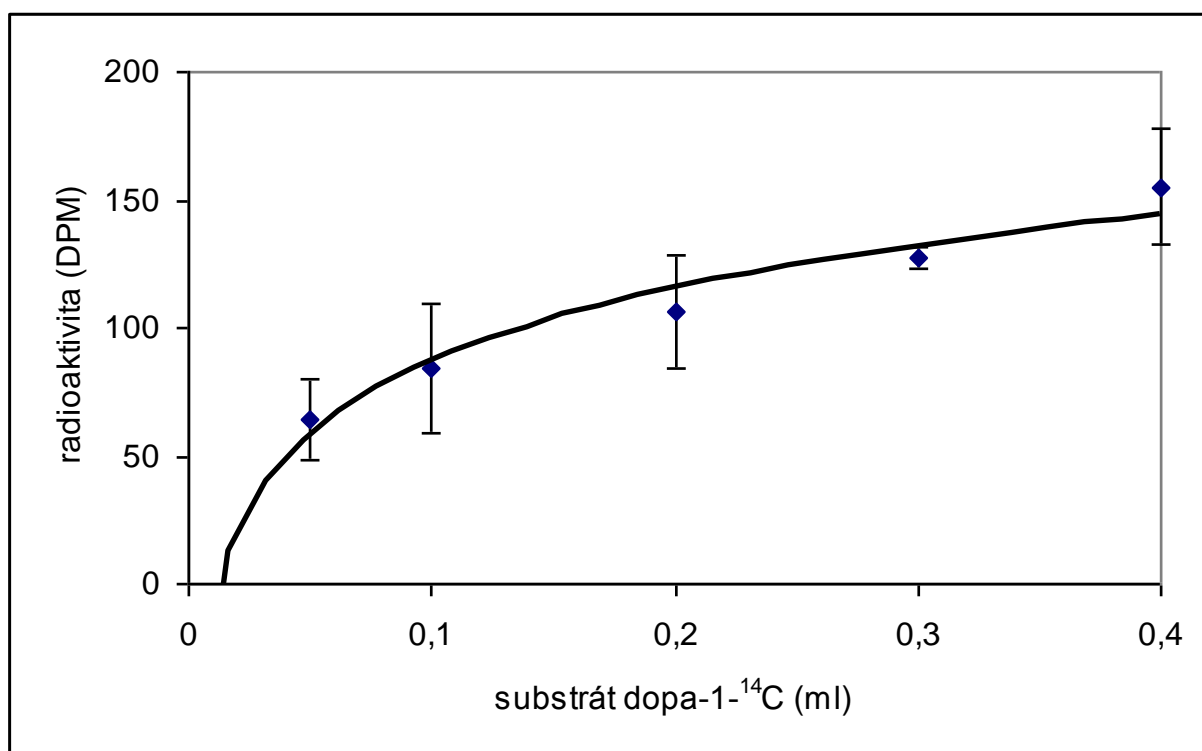
Tab. 13 Složení inkubační směsi slepých vzorků se substrátem dopou-1- ^{14}C . Výsledná koncentrace PLP v pokusu byla $1,26 \cdot 10^{-6}$ M.

PLP v 0,02M pufru pH 6,8 (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
0,02 M pufr pH 6,8 (ml)	1,45	1,4	1,3	1,2	1,1
supernatant (ml)	0	0	0	0	0
substrát dopa-1- ^{14}C (ml)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4

Tab. 14 Hodnoty aktivity odpovídající slepým vzorkům s měnící se koncentrací substrátu dopy-1- ^{14}C .

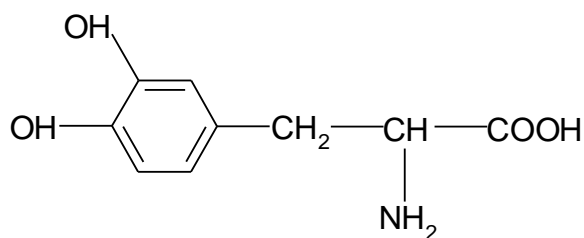
substrát dopa-1- ^{14}C (ml)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
radioaktivita (DPM)	64,1	84	106,3	127,1	155,2
směrodatná odchylka	15,8	25	21,9	4	22,2

aktivita (pkat)	0,80	1,05	1,33	1,59	1,94
-----------------	------	------	------	------	------



Obr. 8 Závislost uvolněné radioaktivity slepých vzorků pro jednotlivá množství substrátu dopa-1-¹⁴C. Rozsah neenzymatické dekarboxylace vzrůstá s rostoucím množstvím dopa-1-¹⁴C. Také v případě substrátu dopa-1-¹⁴C je k dekarboxylace v nepřítomnosti enzymu slabá.

4. 8. 3. Metodika stanovení enzymové aktivity dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin se substrátem dopa-1-¹⁴C.



Obr. 9 Vzorec dopy

Dříve než bylo možno zahájit pokusy se substrátem dopou-1-¹⁴C, bylo potřeba ověřit enzym a substrát a zjistit, jak se radioaktivita vzorků mění s rostoucí koncentrací enzymu a substrátu. Cílem bylo zjistit množství enzymu a substrátu, pro něž bude dosaženo vyhovující měřitelné radioaktivity.

V úvodním pokusu provedeném se substrátem dopou-1-¹⁴C byly připraveny vzorky se vzrůstajícím množstvím supernatantu potkaních jater, který byl připraven postupem popsáním výše viz kapitola 4. 3. 2. Postup přípravy enzymu.

Vzorky obsahovaly konstantní množství substrátu dopy-1-¹⁴C. Výsledná koncentrace koenzymu pyridoxalfosfátu použitá v tomto pokusu s L-dopou-1-¹⁴C byla $1,35 \cdot 10^{-6}$ M.

Pokus k ověření aktivity enzymu byl proveden podle následujícího schématu:

Tab. 15 Rozvržení pokusu k ověření enzymu.

0,02 M pufr pH 6,8 (ml)	1,1	1	0,9	0,8	0,6	0,1
PLP v 0,02 M pufru pH 6,8 (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
supernatant (ml)	0	0,1	0,2	0,3	0,5	1
odstraňování kyslíkové atmosféry ze vzorku po dobu jedné minuty						
preinkubace 5 minut za stálého třepání ve vodní lázni při 37°C						
substrát dopa-1- ¹⁴ C (ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
inkubace přesně 30 minut za stálého třepání ve vodní lázni při 37°C						
2 M kyselina sírová (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
ponechání vzorků 60 minut za stálého třepání ve vodní lázni 37°C, dále dle 4. 8. 1.						

4. 8. 4. Metodika ověření substrátu dopy-1-¹⁴C

V pokusu byla sledována závislost uvolněné radioaktivity na koncentraci substrátu dopy-1-¹⁴C.

Byla použita rozdílná množství značeného substrátu za účelem zjištění dosažených hodnot radioaktivit pro různá množství přidávaného substrátu a konstantní množství supernatantu

s výjimkou slepých vzorků. Výsledná koncentrace koenzymu pyridoxalfosfátu v tomto pokusu byla $1,35 \cdot 10^{-6}$ M.

Výsledky pokusu byly důležité pro uspořádání dalších pokusů se substrátem dopou-1- 14 C.

Množství jednotlivých složek v reakční směsi vyjadřuje tabulka 16.

Tab. 16 Složení inkubační směsi pro ověření substrátu dopou-1- 14 C.

0,02 M pufr pH 6,8 (ml)	1,2	1,25	1,2	1,1	1	0,8
PLP v 0,02 M pufru pH 6,8 (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
supernatant (ml)	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	odstraňování kyslíkové atmosféry ze vzorku po dobu jedné minuty					
	preinkubace 5 minut za stálého třepání ve vodní lázni při 37°C					
substrát dopa-1- 14 C (ml)	0,2	0,05	0,1	0,2	0,3	0,5
	inkubace přesně 30 minut za stálého třepání ve vodní lázni při 37°C					
2 M kyselina sírová (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	ponechání vzorků 60 minut za stálého třepání ve vodní lázni 37°C, dále dle 4. 8. 1.					

4. 8. 5. Metodika sledování enzymové kinetiky se substrátem dopou-1- 14 C

Ke zjištění Michaelisovy konstanty a maximální rychlosti reakce se běžně používá transformace dle Lineweavera a Burka, které bylo využito i v pokusu s Tyr 14 C (kapitola 4. 7. 4.). Lineweaverův a Burkův graf představuje závislost převrácené hodnoty katalytické aktivity (uvolněné radioaktivity) na převrácené hodnotě koncentrace (množství) substrátu. Pro vynesení závislosti byly použity hodnoty naměřené v přechodím pokusu po převedení na reciproké hodnoty. Uspořádání tohoto pokusu je uvedeno v tabulce 16.

4. 8. 6. Metodika sledování inhibice dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin pyridoxalisonikotinoylhydrazonem

Obdobně jako v případě substrátu Tyr¹⁴C, byla i u druhého sledovaného substrátu dopy-1-¹⁴C sledována inhibice DAAK PIH.

Byly použity podobné výsledné koncentrace PIH jako v případě substrátu Tyr¹⁴C - 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ a 10⁻³ M. Série roztoků inhibitoru řádově rozdílných koncentrací byla připravena ředěním ze základního roztoku připraveného v čas potřeby dříve popsáním způsobem (viz kapitola 4. 5.). Rozpouštění PIH ve vodném prostředí bylo opět usnadněno použitím DMSO. Za nejvhodnější výslednou koncentraci DMSO ve vzorcích byla zvolena koncentrace 5 %.

Ve vzorcích s výjimkou slepého vzorku bylo konstantní množství supernatantu (0,3 ml). Množství substrátu dopy-1-¹⁴C bylo také konstantní (0,3 ml).

Výsledná koncentrace koenzymu pyridoxalfosfátu v reakci byla 1,44.10⁻⁶ M.

Tab. 17 Uspořádání pokusu sledování inhibice dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin pyridoxalisonikotinoylhydrazonem.

	10 ⁻³ M PIH	10 ⁻⁴ M PIH	10 ⁻⁵ M PIH	10 ⁻⁶ M PIH	0M PIH	sl.
0,02 M pufr pH 6,8 (ml)	0	0	0	0	0,7	1,1
PLP v 0,02 M pufru pH 6,8 (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0
supernatant (ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0
PIH v 0,02 M pufru pH 6, 8 s 10 % DMSO (ml)	0,7	0,7	0,7	0,7	0	0
odstraňování kyslíkové atmosféry ze vzorku po dobu jedné minuty						
preinkubace 5 minut za stálého třepání ve vodní lázni při 37°C						
dopa-1- ¹⁴ C (ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
inkubace přesně 30 minut za stálého třepání ve vodní lázni 37°C						
2 M kyselina sírová (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
ponechání vzorků 60 minut za stálého třepání ve vodní lázni 37°C, dále dle 4. 8. 1.						

4. 8. 7. Metodika sledování kinetiky inhibované a neinhibované reakce se substrátem dopou-1-¹⁴C

Jako u substrátu Tyr¹⁴C bylo i u druhého substrátu dopa-1-¹⁴C provedeno sledování kinetiky inhibované a neinhibované reakce.

Výsledná koncentrace PIH ve vzorcích s inhibitorem byla 10⁻³ M. Výsledná koncentrace PLP ve všech vzorcích byla 1,26.10⁻⁶ M. Pro jednotlivá množství substrátu 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 a 0,4 ml byly připraveny tři druhy vzorků, vzorek bez inhibitoru, s inhibitorem a slepý vzorek bez enzymu a bez inhibitoru. Množství supernatantu ve vzorcích bylo konstantní s výjimkou slepých vzorků.

V tabulce 18 je uvedeno množství složek v inkubační směsi pro jednotlivé vzorky. Pokus byl proveden podle obecného postupu uvedeného v kapitole 4. 8. 1. Roztok inhibitoru potřebné koncentrace byl připraven v čas potřeby dříve popsáním způsobem (viz kapitola 4. 5.) tak, aby jeho výsledná koncentrace v inkubační směsi byla 10⁻³ M.

Byly provedeny dvě inkubace pro získání většího počtu hodnot katalytické aktivity. Naměřené hodnoty jsou potřebné pro odhad typu inhibice.

Tab. 18 Složení jednotlivých vzorků pro sledování kinetiky inhibované a neinhibované reakce.

vzorek	bez I	s I	sl.	bez I	s I	sl.	bez I	s I
PLP v 0,02M pufru pH 6,8 (ml)	0,1 1,15	0,1	0,1 1,45	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
0,02 M pufr pH 6,8 (ml)	(0,8)	0,35	(0,8)	1,1(0,8)	0,3	1,4(0,8)	1(0,8)	0,2
supernatant (ml)	0,3	0,3	0	0,3	0,3	0	0,3	0,3
substrát dopa-1- ¹⁴ C (ml)	0,05	0,05	0,05	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2
PIH v 0,02 M pufru pH 6,8 s 10 % DMSO (ml)	0	0,8	0	0	0,8	0	0	0,8
vzorek	sl.	bez I	s I	sl.	bez I	s I	sl.	
PLP v 0,02M pufru pH 6,8 (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
0,02 M pufr pH 6,8 (ml)	1,3(0,8)	0,9(0,8)	0,1	1,2(0,8)	0,8(0,8)	0	1,1(0,8)	
supernatant (ml)	0	0,3	0,3	0	0,3	0,3	0	
substrát dopa-1- ¹⁴ C (ml)	0,2	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	
PIH v 0,02 M pufru pH	0	0	0,8	0	0	0,8	0	

6,8 s 10 % DMSO (ml)							
----------------------	--	--	--	--	--	--	--

Pozn. 1: Údaje uvedené v závorkách udávají množství pufru pH 6,8 s 10 % DMSO z celkového množství tohoto pufru v jednotlivých vzorcích, jehož objem je uveden před závorkou.

Pozn. 2: I = inhibitor

sl.= slepý vzorek (bez enzymu a bez inhibitoru)

5. VÝSLEDKY

5. 1. Výsledky pokusů se substrátem L-(karboxyl-¹⁴C)tyrosinem

5. 1. 1. Výsledky stanovení aktivity dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin se substrátem L-tyrosinem-¹⁴C.

První pokus se substrátem tyrosinem-1-¹⁴C měl ověřit, zda byly správně zvoleny reakční podmínky a zda hodnoty aktivit budou dobře měřitelné a zpracovatelné. Protože tyrosin-1-¹⁴C je méně vhodným substrátem pro dekarboxylasu aromatických L-aminokyselin než dopa-1-¹⁴C, byly zvoleny poměrně vysoké koncentrace substrátu (množství přidávaného substrátu 0,5 ml). Při vyšších množstvích supernatantu bylo dosaženo značných aktivit.

Složení inkubační směsi je uvedeno v tabulce 6 (viz kapitola 4. 7. 3.).

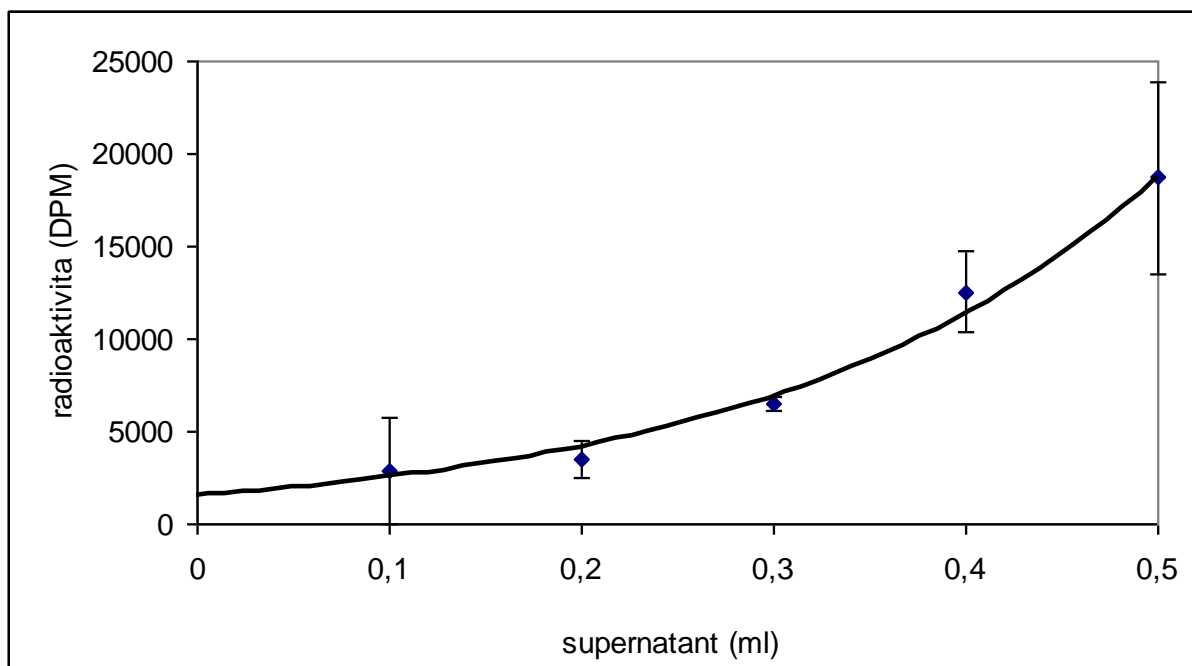
Hodnoty aktivit jsou zpracovány v tabulce 19. Jedná se o průměry aktivit tří vzorků.

Za optimální množství přidávaného supernatantu byla zvolena prostřední testovaná hodnota 0,3 ml. Ta byla také využívána v dalších pokusech.

Pozn. Pokud se v experimentální části této práce hovoří o radioaktivitě vzorků, je tím myšlena radioaktivita zachyceného produktu, která podává informaci o výtěžku reakce.

Tab. 19 Výsledky zjišťování optimální koncentrace supernatantu (enzymu)

supernatant (ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
průměr radioaktivit (DPM)	2881,5	3552	6475,5	12529,6	18704,1
směrodatná odchylka	2850,4	1008,5	363	2182,8	5233,3
průměr aktivit (pkat)	5,64	6,96	12,69	24,56	36,66



Obr. 10 Závislost naměřené radioaktivity (DPM) na množství supernatantu (ml).

Přidávané množství substrátu Tyr¹⁴C bylo konstantní (0,5 ml). Výsledná koncentrace koenzymu PLP v inkubační směsi byla $2 \cdot 10^{-5}$ M.

Body jsou průměrem hodnot naměřených pro tři vzorky.

Za optimální byla zvoleno množství supernatantu 0,3 ml. Při této koncentraci bylo dosaženo vhodné aktivity enzymu.

5. 1. 2. Výsledky sledování enzymové kinetiky se substrátem Tyr¹⁴C.

V pokusu bylo použito konstantní množství supernatantu 0,3 ml, které bylo podle výsledků předchozího pokusu označeno za optimální z hlediska dosahovaných hodnot radioaktivit, a

mění se množství značeného substrátu. Výsledná koncentrace PLP v pokusu byla $1,5 \cdot 10^{-5}$ M. Pokus byl proveden za účelem stanovení Michaelisovy konstanty K_m .

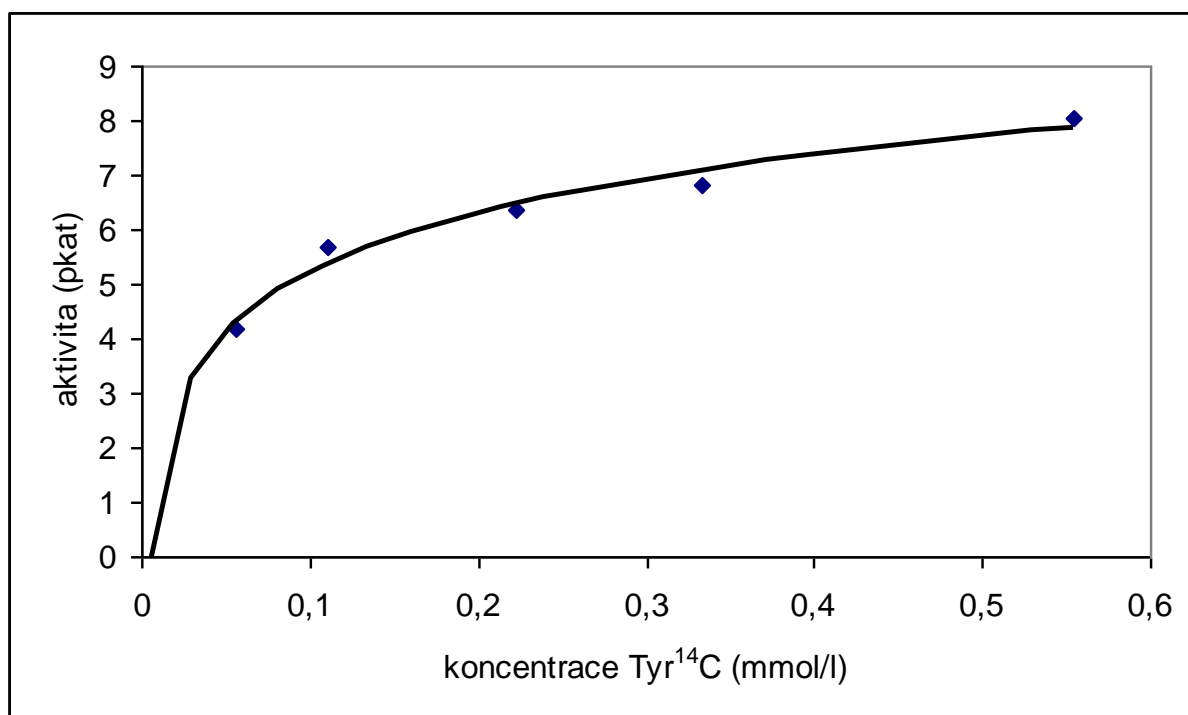
Pro jednotlivá množství substrátu byly připraveny vždy tři vzorky, výsledné hodnoty katalytické aktivity jsou tudíž průměrem ze tří hodnot.

Složení inkubační směsi je uvedeno v kapitole 4. 7. 4. v tabulce 7.

Průměrné hodnoty naměřené radioaktivity vzorků a katalytické aktivity enzymu pro jednotlivé koncentrace substrátu Tyr¹⁴C jsou uvedeny v tabulce 20.

Tab. 20 Výsledky sledování kinetiky enzymové reakce

množství Tyr ¹⁴ C (ml)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,5
koncentrace Tyr ¹⁴ C (mmol/l)	0,056	0,111	0,222	0,333	0,555
průměr radioaktivit (DPM)	2142,1	2890,9	3245	3479,1	4107,3
směrodatná odchylka	445,4	302,7	168,4	218,6	323,9
průměr aktivit (pkat)	4,2	5,67	6,36	6,82	8,05

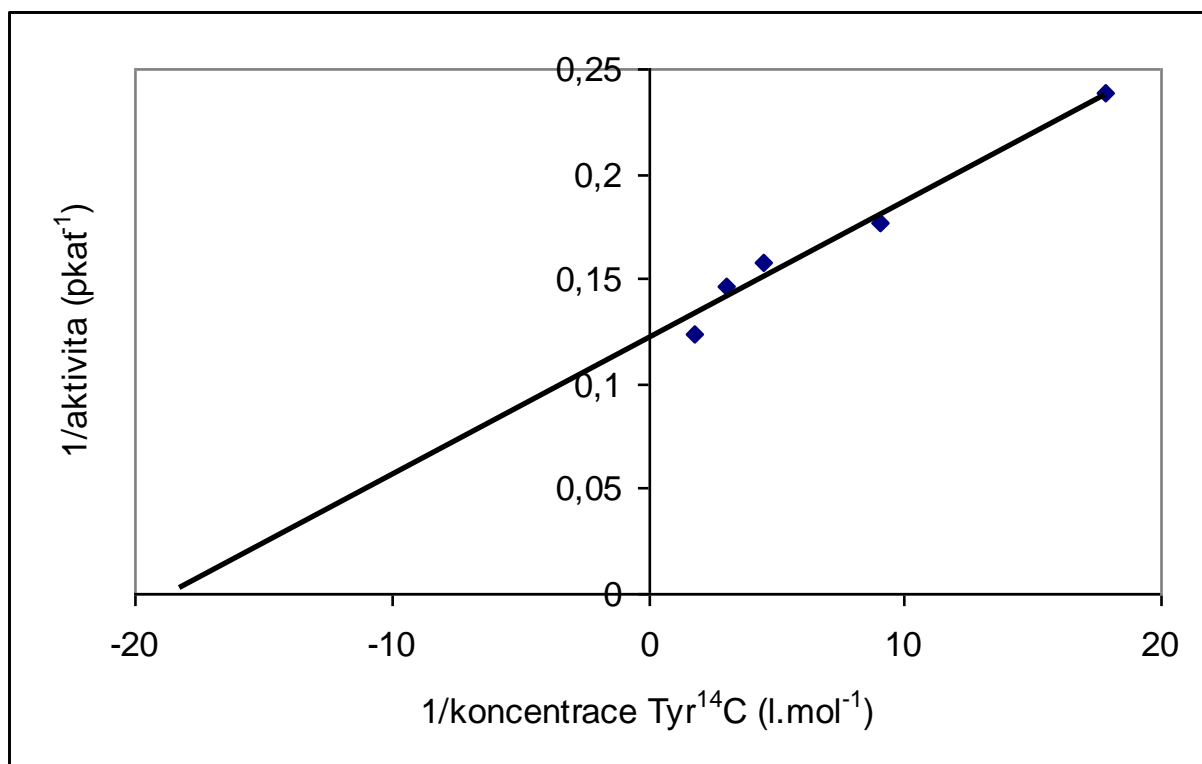


Obr. 11 Netransformovaná závislost katalytické aktivity v pkat na koncentraci substrátu v mol/l.

Pro ověření Michaelisovy konstanty K_m je vhodné provést transformaci dle Lineweavera a Burka. Pro sestavení grafu a odečtení potřebných hodnot je nezbytné získat převrácené hodnoty aktivit a koncentrací substrátu Tyr¹⁴C a provést dvojitě reciproké vynesení.

Tab. 21 Reciproké hodnoty koncentrace substrátu a aktivity pro vynesení dle Lineweavera a Burka.

1/koncentrace Tyr ¹⁴ C (l.mol ⁻¹)	17,86	9,01	4,50	3,00	1,80
1/aktivita (pkat ⁻¹)	0,238	0,176	0,157	0,147	0,124



Obr. 12 Transformace dle Lineweavera a Burka vyjadřující závislost 1/aktivita na 1/koncentrace substrátu.

Pro substrát Tyr¹⁴C byla vypočtena Michaelisova konstanta $K_m = 0,055$ mmol/l.

5. 1. 3. Výsledky sledování inhibice dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin pyridoxalisonikotinoylhydrazonem.

Všechny vzorky obsahovaly konstantní množství enzymu (0,3 ml supernatantu), s výjimkou slepých vzorků. Reakce byla nastartována postupně ve všech vzorcích přidáním konstantního množství substrátu Tyr¹⁴C (0,2 ml). Proměnlivé byly koncentrace PIH v jednotlivých vzorcích. Výsledná koncentrace PLP v inkubační směsi byla $1,5 \cdot 10^{-5}$ M.

Pokusy byly provedeny podle postupu 4. 6. 3. Postup stanovení aktivity DAAK.

Byly provedeny dvě inkubace. Naměřené hodnoty byly nejprve zpracovány pro každou inkubaci zvlášť, poté byly všechny výsledky spojeny.

Složení vzorků včetně časového rozvržení pokusu je v tabulce 8 a 9 v kapitole 4. 7. 5.

Výsledky získané po změření vzorků z první inkubace jsou v tabulce 22. Další tabulka je analogická, ale týká se druhé inkubace.

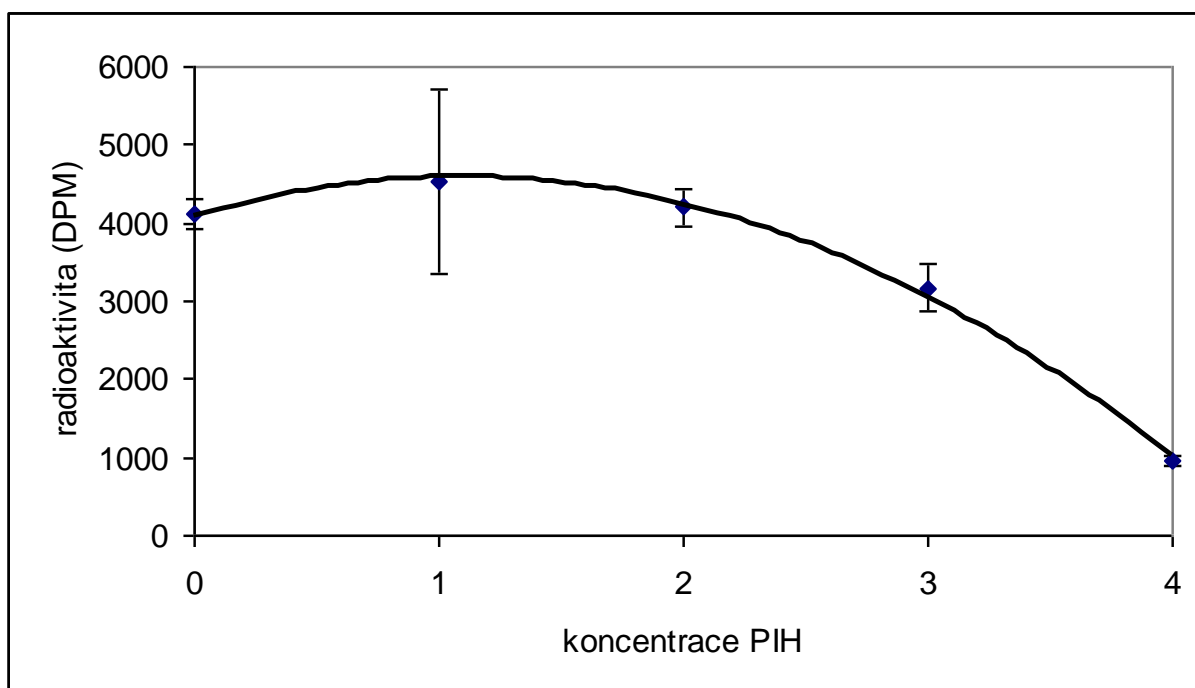
Obr. 13, 14 a 15 vyjadřují závislost naměřené radioaktivity v DPM na koncentraci inhibitoru pro konstantní množství supernatantu a substrátu.

Uvolněná a změřená radioaktivita klesá s rostoucí koncentrací inhibitoru, pouze u vzorků bez inhibitoru byla radioaktivita nižší se předpokládalo (v případě výsledků první inkubace a spojených výsledků).

5. 1. 3. 1. Výsledky první inkubace

Tab. 22 Výsledky prvního pokusu sledování inhibice DAAK PIH.

koncentrace PIH (M)	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	0
průměr radioaktivit (DPM)	971,5	3168	4198,7	4531	4115,8
směrodatná odchylka	65,6	299,1	247,7	1177,7	199,1
průměr aktivit (pkat)	1,90	6,21	8,23	8,88	8,07



Obr. 13 Závislost naměřených hodnot radioaktivity na koncentraci inhibitoru. Čísla **0, 1, 2, 3** a **4** odpovídají výsledným koncentracím roztoku inhibitoru **0, 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4}** a **10^{-3} M**. Všechny body v grafu jsou průměrem ze tří hodnot naměřených radioaktivit, hodnoty směrodatných odchylek a odpovídajících hodnot katalytických aktivit v pkat jsou uvedeny v tabulce 22.

5. 1. 3. 2. Výsledky druhé inkubace

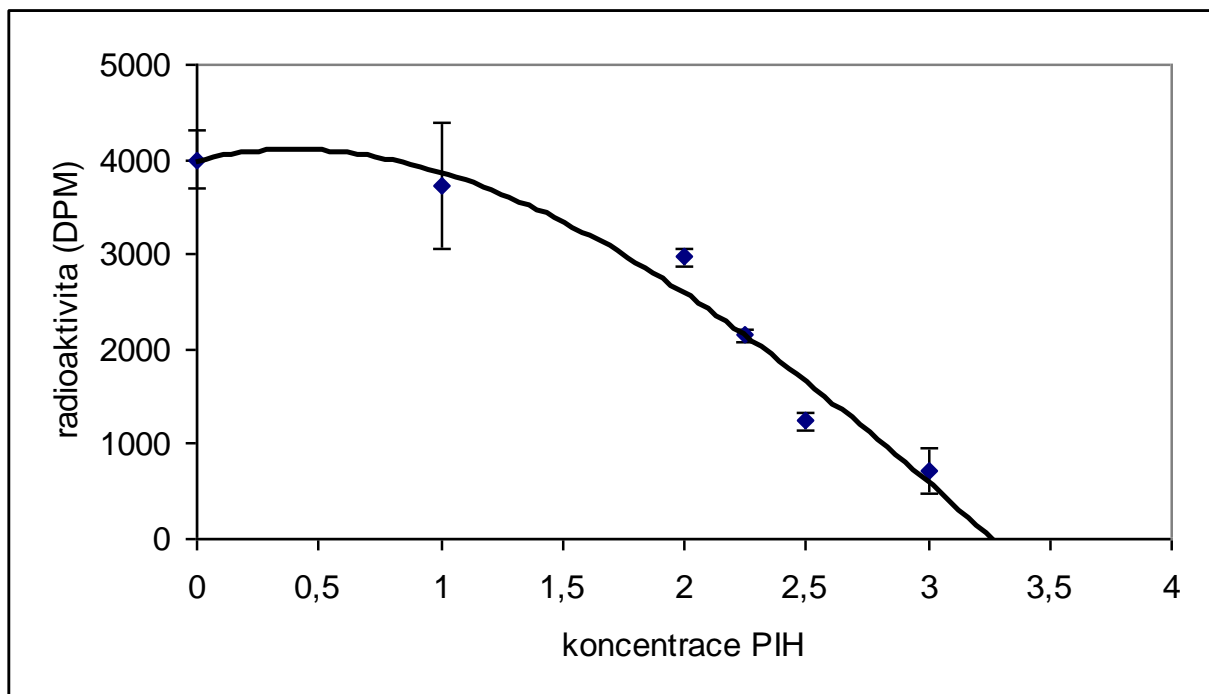
Pro druhou inkubaci se ukázalo jako vhodné zvolit některé další koncentrace inhibitoru z rozmezí 10^{-4} až 10^{-3} M. Byla vynechána koncentrace 10^{-6} M. Množství supernatantu a substrátu bylo opět konstantní.

Uspořádání pokusu je uvedeno v tabulce 9.

Tab. 23 Výsledky druhého pokusu sledování inhibice DAAK PIH.

koncentrace PIH (M)	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	$2.5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}	10^{-5}	0
průměr radioaktivit (DPM)	726,2	1240,6	2150,1	2975,4	3727,9	4001,4

směrodatná odchylka	238,4	88,7	70,5	93,6	667,3	304,2
průměr aktivit (pkat)	1,42	2,43	4,21	5,83	7,31	7,84



Obr. 14 Závislost naměřené radioaktivity na koncentraci inhibitoru. Čísla **0, 1, 2, 2,25, 2,5 a 3** odpovídají koncentracím roztoku inhibitoru **0, 10^{-5} , 10^{-4} , $2,5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$ a 10^{-3} M.**

Všechny body v grafu jsou průměrem ze tří naměřených hodnot radioaktivit, hodnoty směrodatných odchylek a odpovídajících hodnot katalytických aktivit v pkat jsou uvedeny v tabulce 23.

5. 1. 3. 3. Spojení výsledků první a druhé inkubace

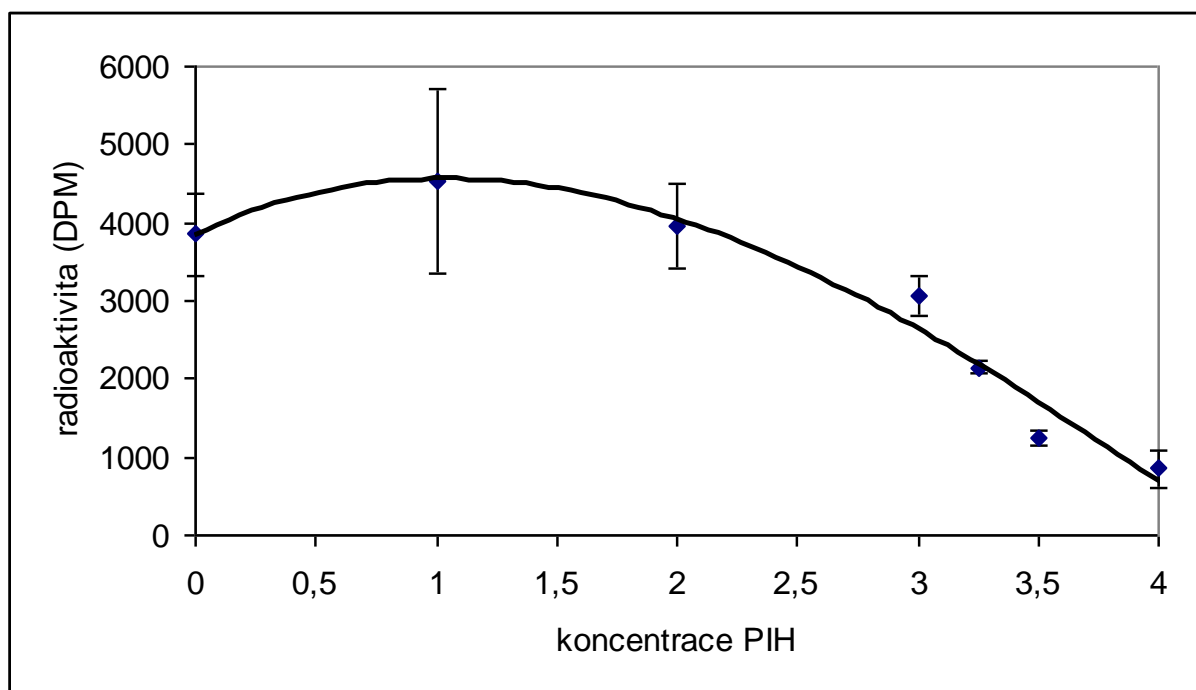
Z důvodu většího počtu změřených hodnot radioaktivit pro některé koncentrace inhibitoru a tudíž reprezentativnější průměry a většího počtu použitých koncentrací inhibitoru bylo vhodné spojit výsledky prvního a druhého pokusu stanovení inhibice DAAK PIH.

V prvním pokusu byly použity koncentrace roztoku inhibitoru 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} a 10^{-6} M. Dále byly do pokusu zařazeny vzorky bez inhibitoru a slepé vzorky bez enzymu a bez inhibitoru. Do druhého pokusu byly zařazeny koncentrace 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-4}$, $2,5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-4} , 10^{-5} M a opět

vzorky bez inhibitoru a slepé vzorky bez enzymu a inhibitoru. Pro výsledné koncentrace roztoku inhibitoru 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} a 0 M bylo tudíž k dispozici šest naměřených hodnot radioaktivit, ze kterých byla vypočtena průměrná hodnota. Pro zbývající koncentrace, které se v obou pokusech neopakovaly, byly naměřeny tři hodnoty. Tyto hodnoty byly zpracovány do tabulky 24 a použity k sestrojení závislosti.

Tab. 24 Spojené výsledky obou pokusů sledování inhibice DAAK PIH.

koncentrace PIH (M)	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	0
průměr radioaktivit (DPM)	848,9	1240,6	2150,1	3071,7	3963,3	4531	3849,3
směrodatná odchylka	227,1	88,7	70,5	247,9	549,9	1177,7	532
průměr aktivit (pkat)	1,66	2,43	4,21	6,02	7,77	8,88	7,54



Obr. 15 Závislost naměřené radioaktivitě na koncentraci inhibitoru. Čísla 0, 1, 2, 3, 3,25, 3,5 a 4 odpovídají koncentracím roztoku inhibitoru 0, 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , $2,5 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$ a 10^{-3} M.

5. 1. 4. Výsledky sledování kinetiky inhibované a neinhibované reakce

V pokusu byly zpracovány tři typy vzorků, vzorky s inhibátorem, bez inhibátoru a slepé vzorky bez enzymu a bez inhibátoru. S výjimkou slepých vzorků obsahovaly vzorky konstantní množství supernatantu (0,3 ml).

Pro pokus byla zvolena výsledná koncentrace inhibátoru $2,5 \cdot 10^{-4}$ M (v 5 % DMSO).

Výsledná koncentrace PLP v inkubační směsi byla $1,5 \cdot 10^{-5}$ M. Co se týče praktického provedení vzhledem k velkému počtu vzorků v pokusu byly vzorky připraveny v duplikátech. Pro každou koncentraci substrátu byl připraven slepý vzorek. Pokus byl proveden podle postupu 4. 6. 3. Postup stanovení aktivity DAAK.

Tab. 25 Katalytické aktivity vzorků bez inhibátoru a s inhibátorem pro jednotlivé koncentrace substrátu Tyr¹⁴C.

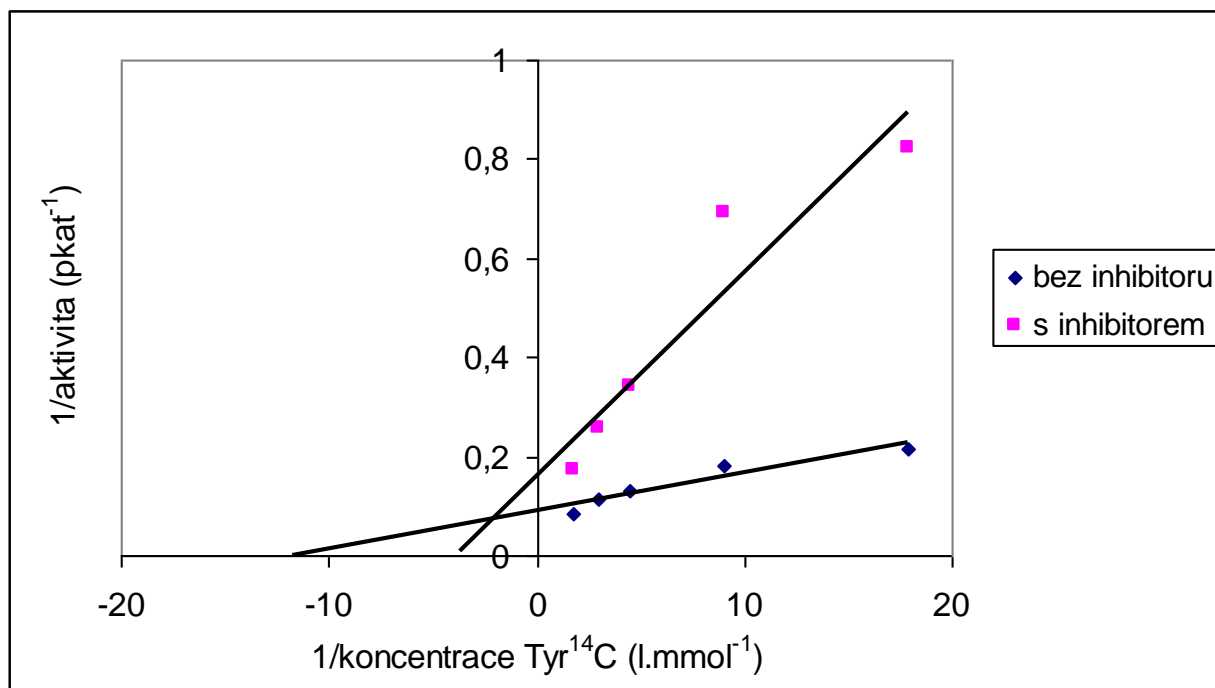
substrát Tyr ¹⁴ C (ml)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,5
koncentrace Tyr ¹⁴ C (mmol/l)	0,055	0,111	0,222	0,333	0,555
radioaktivita vz. bez inhibátoru (DPM)	2364,3	2837,2	3940,2	4473,8	5923
radioaktivita vz. s inhibátorem (DPM)	620,5	737,7	1494,2	1992,4	2962,3
aktivita vz. bez inhibátoru (pkat)	4,63	5,56	7,72	8,77	11,61
aktivita vz. s inhibátorem (pkat)	1,22	1,45	2,93	3,91	5,81

Pro odhad typu inhibice bylo provedeno grafické vynesení dle Lineweavera a Burka, tzn. linearizace grafu. Pro transformaci dle Lineweavera a Burka byly použity reciproké hodnoty koncentrace substrátu a katalytické aktivity.

Tab. 26 Reciproké hodnoty koncentrace substrátu a katalytických aktivit

1/koncentrace Tyr ¹⁴ C (l.mol ⁻¹)	17,86	9,01	4,50	3,00	1,80
--	-------	------	------	------	------

1/aktivita vz. bez inhibitoru (pkat^{-1})	0,216	0,180	0,130	0,114	0,086
1/aktivita vz. s inhibitorem (pkat^{-1})	0,822	0,692	0,341	0,256	0,172



Obr. 16 Transformace dle Lineweavera a Burka. Závislost reciprokých hodnot aktivity a koncentrace substrátu umožňuje odhad typu inhibice. Formálně se v tomto případě jedná o smíšenou inhibici. Lze ale také uvažovat o kompetitivní inhibici, pro kterou je při vynesení dle Lineweavera a Burka typické protnutí obou přímek na ose y.

Pro smíšenou inhibici byla vypočtena inhibiční konstanta $K_i = 3,01 \cdot 10^{-4}$ M.

5. 1. 5. Výsledky sledování inhibice dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin pyridoxalisonikotinoylhydrazonem pro dvě rozdílné koncentrace substrátu Tyr¹⁴C

Pro odhad typu inhibice z Dixonova grafu byl proveden pokus dříve popsáním způsobem viz 4. 6. 3. Postup stanovení aktivity DAAK pro 0,1 a 0,5 ml substrátu.

Množství supernatantu ve vzorcích bylo konstantní (0,3 ml) s výjimkou slepých vzorků bez enzymu, u nichž byl objem supernatantu nahrazen 0,1 M puforem pH 7,2.

Byly připraveny vzorky s výslednou koncentrací PIH 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-4}$, $2,5 \cdot 10^{-4}$, 10^{-4} , 10^{-5} a vzorky bez inhibitoru. Výsledná koncentrace koenzymu PLP ve vzorcích byla $1,5 \cdot 10^{-5}$ M.

Vzorky byly připraveny v triplikátech kromě slepých vzorků pro 0,1 a 0,5 ml substrátu, které byly připraveny v duplikátech.

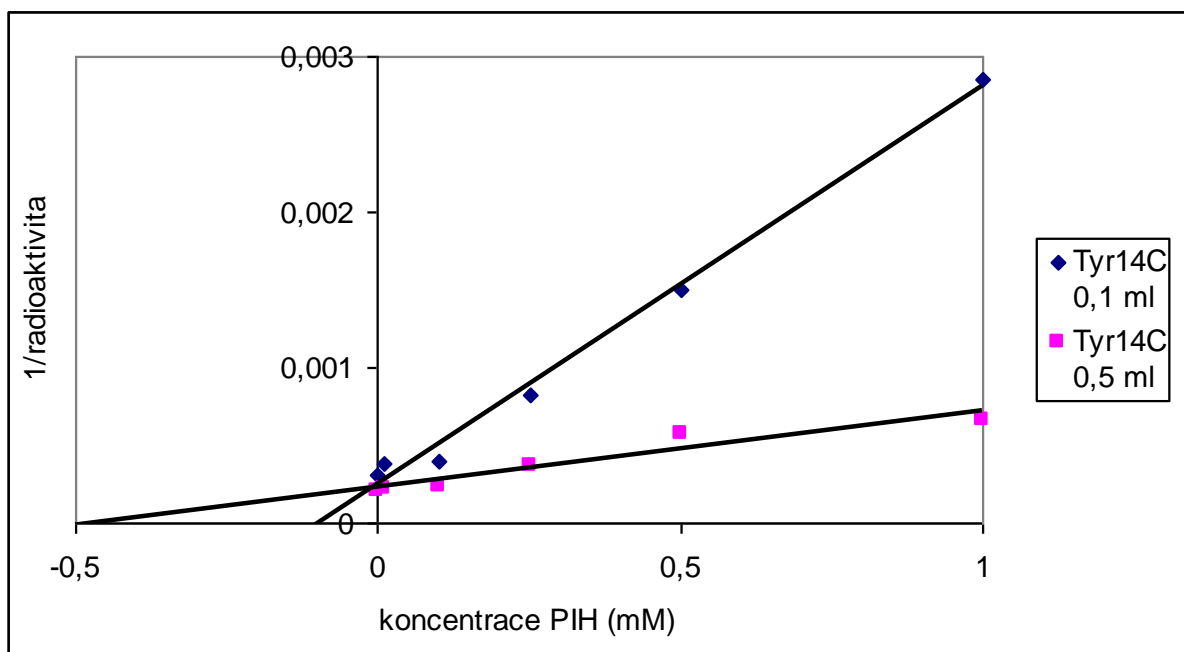
Tab. 27 Hodnoty katalytické aktivity vzorků pro 0,1 a 0,5 ml substrátu Tyr¹⁴C a příslušnou koncentraci inhibitoru.

koncentrace PIH (M)	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}	10^{-5}	0
radioaktivita (DPM) pro 0,1 ml Tyr ¹⁴ C	351,1	664,7	1205,2	2502,3	2631,8	3238,5
radioaktivita (DPM) pro 0,5 ml Tyr ¹⁴ C	1515,2	1730	2755,7	4227,4	4562,1	4816,6
aktivita (pkat) pro 0,1 ml Tyr ¹⁴ C	0,69	1,30	2,36	4,91	5,16	6,35
aktivita (pkat) pro 0,5 ml Tyr ¹⁴ C	2,97	3,39	5,40	8,29	8,94	9,44

Dixonovo vynesení představuje závislost převrácené hodnoty naměřené radioaktivity na koncentraci inhibitoru. Změřené hodnoty bylo tudíž potřeba převést na převrácené hodnoty viz tabulka 28.

Tab. 28 Reciproké hodnoty naměřené radioaktivity odpovídající množství Tyr¹⁴C 0,1 a 0,5 ml a příslušné koncentraci inhibitoru.

koncentrace PIH (M)	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	10^{-4}	10^{-5}	0
koncentrace PIH (mM)	1	0,5	0,25	0,1	0,01	0
1/radioaktivita pro 0,1 ml Tyr ¹⁴ C	0,002848	0,001504	0,000830	0,000400	0,000380	0,000309
1/radioaktivita pro 0,5 ml Tyr ¹⁴ C	0,000660	0,000578	0,000363	0,000237	0,000219	0,000208



Obr. 17 Dixonovo vynesení sestrojené jako závislost převrácené hodnoty naměřené radioaktivity na koncentraci inhibitoru.

Protnutí přímek na ose y formálně odpovídá kompetitivní inhibici (v případě smíšené inhibice by mělo dojít k protnutí mimo osu).

5. 1. 6. Výsledky pokusu s měnící se koncentrací PLP

Pokus s měnící se koncentrací PLP byl zaměřen na zjištění vlivu koncentrace koenzymu DAAK pyridoxalfosfátu na aktivitu tohoto enzymu v přítomnosti inhibitoru a v neinhibované reakci. Ze struktury obou látek vyplývá, že by na základě jejich podobnosti mohlo docházet ke vzájemné kompetici.

V inhibované reakci byla koncentrace inhibitoru $2,5 \cdot 10^{-4}$ M v 5 % DMSO. Ve všech vzorcích bylo konstantní množství supernatantu (0,3 ml) a substrátu Tyr¹⁴C (0,2 ml). Výjimku tvořily slepé vzorky, ve kterých byl supernatant nahrazen 0,1 M puforem pH 7,2.

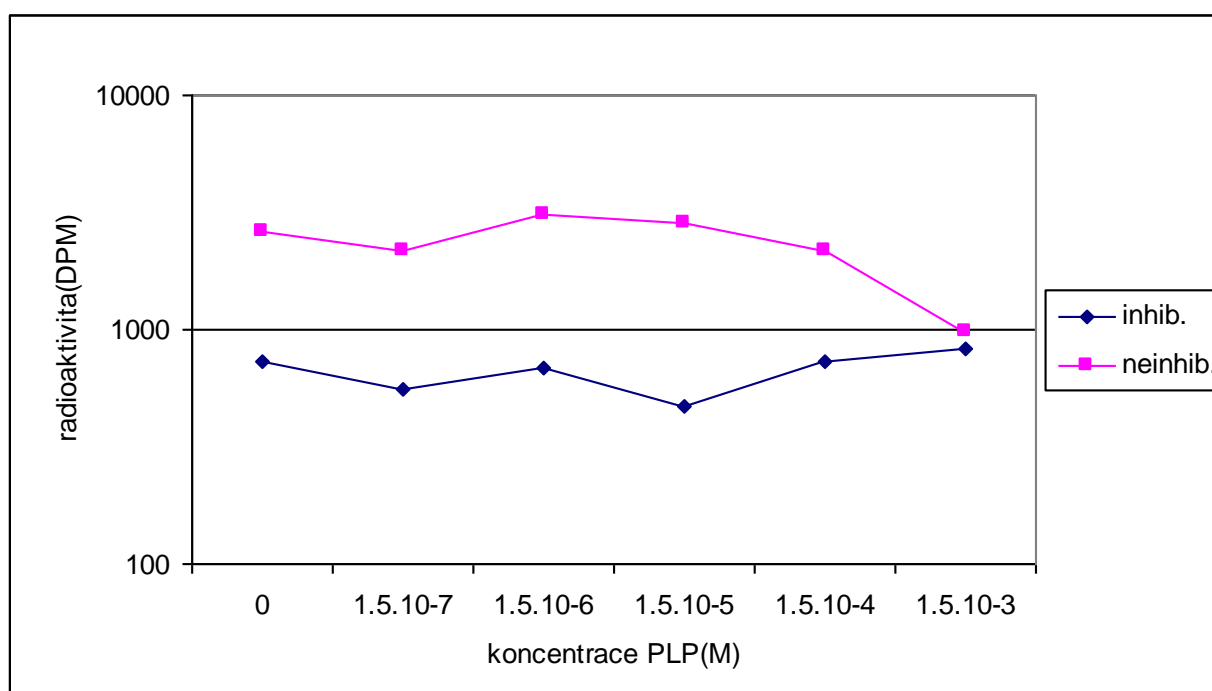
Pro pokus byly použity koncentrace pyridoxalfosfátu $1,5 \cdot 10^{-3}$, $1,5 \cdot 10^{-4}$, $1,5 \cdot 10^{-5}$, $1,5 \cdot 10^{-6}$ a $1,5 \cdot 10^{-7}$ M.

Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 12.

Naměřené hodnoty radioaktivity a katalytické aktivity jsou v tabulce 29.

Tab. 29 Výsledné hodnoty radioaktivity a katalytické aktivity vzorků s měnící se koncentrací PLP.

inhibovaná reakce						
koncentrace PLP (M)	0	$1.5 \cdot 10^{-7}$	$1.5 \cdot 10^{-6}$	$1.5 \cdot 10^{-5}$	$1.5 \cdot 10^{-4}$	$1.5 \cdot 10^{-3}$
radioaktivita (DPM)	730,3	553,7	690,7	467,3	734,8	830,8
aktivita (pkat)	1,43	1,09	1,35	0,92	1,44	1,63
neinhibovaná reakce						
koncentrace PLP (M)	0	$1.5 \cdot 10^{-7}$	$1.5 \cdot 10^{-6}$	$1.5 \cdot 10^{-5}$	$1.5 \cdot 10^{-4}$	$1.5 \cdot 10^{-3}$
radioaktivita (DPM)	2598,0	2179,9	3119,1	2833,6	2183,2	973,4
aktivita (pkat)	5,09	4,27	6,11	5,55	4,28	1,91



Obr. 18 Závislost výtěžku reakce na koncentraci koenzymu PLP pro neinhibovanou a inhibovanou reakci. Z grafu vyplývá, že inhibici nebylo možno zvrátit zvyšováním koncentrace koenzymu. Nejvyšší použitá koncentrace koenzymu naopak inhibovala enzym.

5. 2. Výsledky pokusů se substrátem DL-3-(3,4-dihydroxyfenyl)alaninem-1-¹⁴C (dopou-1-¹⁴C).

Pro možnost porovnání výsledků s výsledky pokusů se substrátem tyrosinem-1-¹⁴C byly naměřené hodnoty radioaktivity přepočítány na jednotky katalytické aktivity enzymu pmol/s (pkat).

5. 2. 1. Výsledky pokusu k ověření dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin se substrátem dopou-1-¹⁴C.

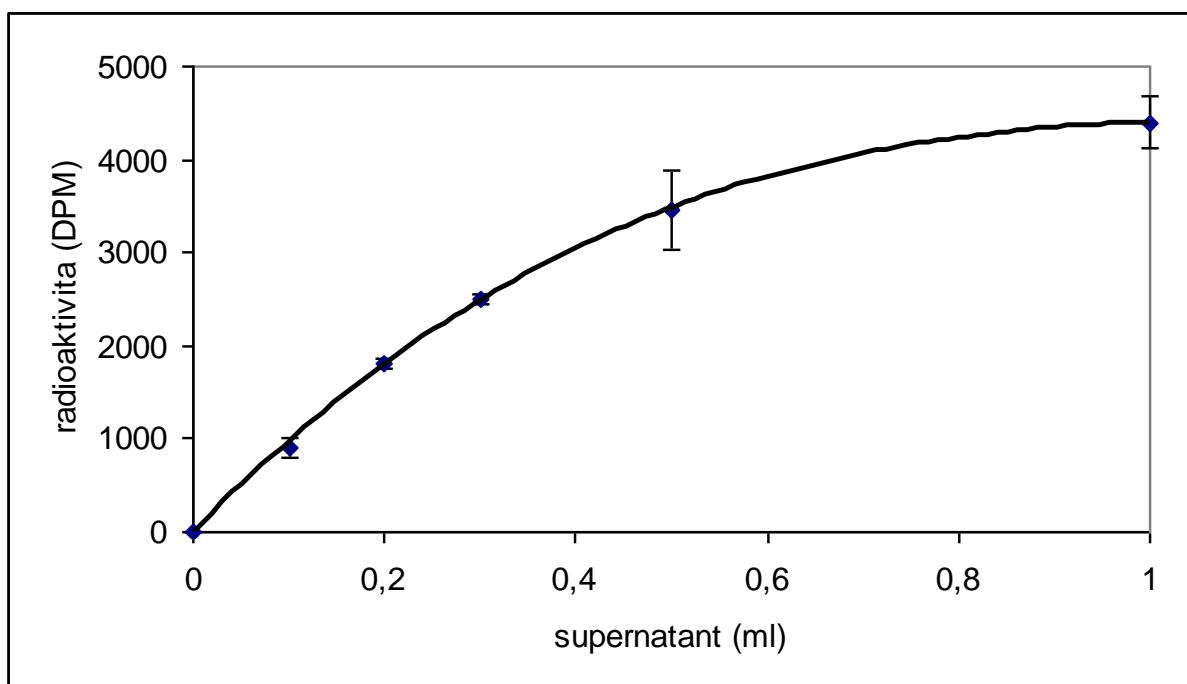
Pokus byl proveden podle základního postupu uvedeného v kapitole 4. 8. 1., který uvádí modifikace postupu uvedeného v kapitole 4. 6. 3. pro substrát dopu-1-¹⁴C. Jedná se zejména o potřebu odstranění vzduchu nad reakční směsí v případě dopu-1-¹⁴C.

Ve vzorcích byla použita konstantní množství substrátu dopu-1-¹⁴C (0,3 ml), rozdíly mezi jednotlivými vzorky byly v množství supernatantu. Slepý vzorek neobsahoval supernatant. Výsledná koncentrace koenzymu pyridoxalfosfátu v pokusu byla $1,35 \cdot 10^{-6}$ M.

Výsledky pokusu jsou uvedeny v tabulce 30.

Tab. 30 Hodnoty naměřené radioaktivity a katalytické aktivity pro jednotlivá množství enzymu.

supernatant (ml)	0,1	0,2	0,3	0,5	1
radioaktivita (DPM)	906	1820	2495,8	3460,2	4399,4
směrodatná odchylka	90,3	53,5	54,0	417,4	278,8
aktivita (pkat)	11,33	22,75	31,20	43,25	54,99



Obr. 19 Závislost naměřené radioaktivity v DPM na množství supernatantu v ml.

Body v grafu odpovídají průměru ze tří hodnot naměřených radioaktivit.

Z grafu vyplývá, že enzym je možné použít pro další pokusy. Hodnoty naměřené radioaktivity vzrůstají s rostoucím množstvím supernatantu. Během reakce se vyčerpává substrát, proto není závislost lineární.

5. 2. 2. Výsledky pokusu k ověření substrátu dopy-1-¹⁴C.

Výsledky pokusu tvoří hodnoty katalytických aktivit vzorků pro jednotlivé koncentrace použitého substrátu dopy-1-¹⁴C. Tyto hodnoty byly důležité pro volbu množství substrátu pro další pokusy s dopou-1-¹⁴C.

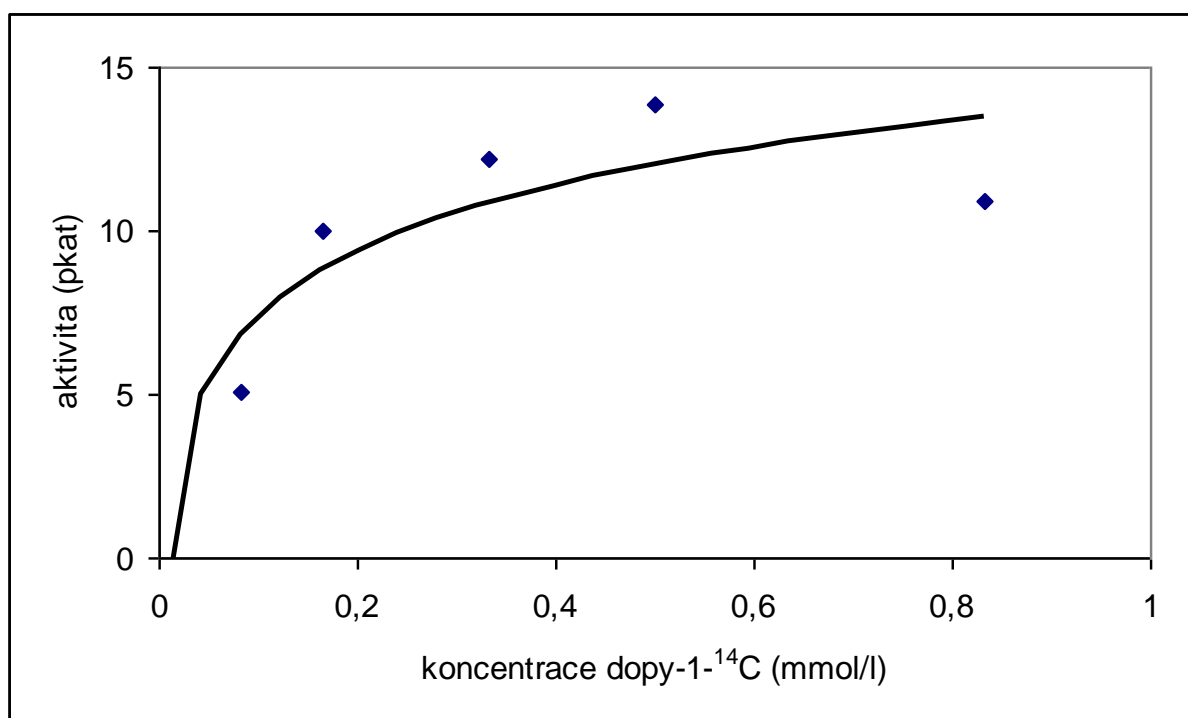
Pro pokus byla použita množství substrátu 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 a 0,5 ml.

Množství supernatantu ve vzorcích s výjimkou slepých vzorků bylo konstantní (0,1 ml). Konstantní byla také výsledná koncentrace koenzymu pyridoxalfosfátu ve všech vzorcích, $1,35 \cdot 10^{-6}$ M.

Výsledky pokusu jsou uvedeny v tabulce 31.

Tab. 31 Hodnoty radioaktivity vzorků a katalytické aktivity pro uvedené koncentrace substrátu dopy-1-¹⁴C.

substrát dopy-1- ¹⁴ C (ml)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,5
koncentrace dopy-1- ¹⁴ C (mmol/l)	0,083	0,166	0,333	0,5	0,833
radioaktivita (DPM)	408,8	798,2	977,8	1107	870,1
směrodatná odchylka	97,84	2,69	126,81	127,71	140,62
aktivita (pkat)	5,11	9,98	12,22	13,84	10,88



Obr. 20 Závislost katalytické aktivity v pkat na koncentraci dopy-1-¹⁴C v mmol/l. Každý bod je průměrem ze tří naměřených hodnot.

Při koncentraci dopy-1-¹⁴C 0,833 mmol/l (odpovídá množství substrátu 0,5 ml) dochází pravděpodobně k inhibici enzymu nadbytkem substrátu. Z toho vyplývá, že pro další pokusy bylo vhodné použít množství substrátu nižší než 0,5 ml (do 0,4 ml).

5. 2. 3. Výsledky sledování enzymové kinetiky pro substrát dopu-1-¹⁴C.

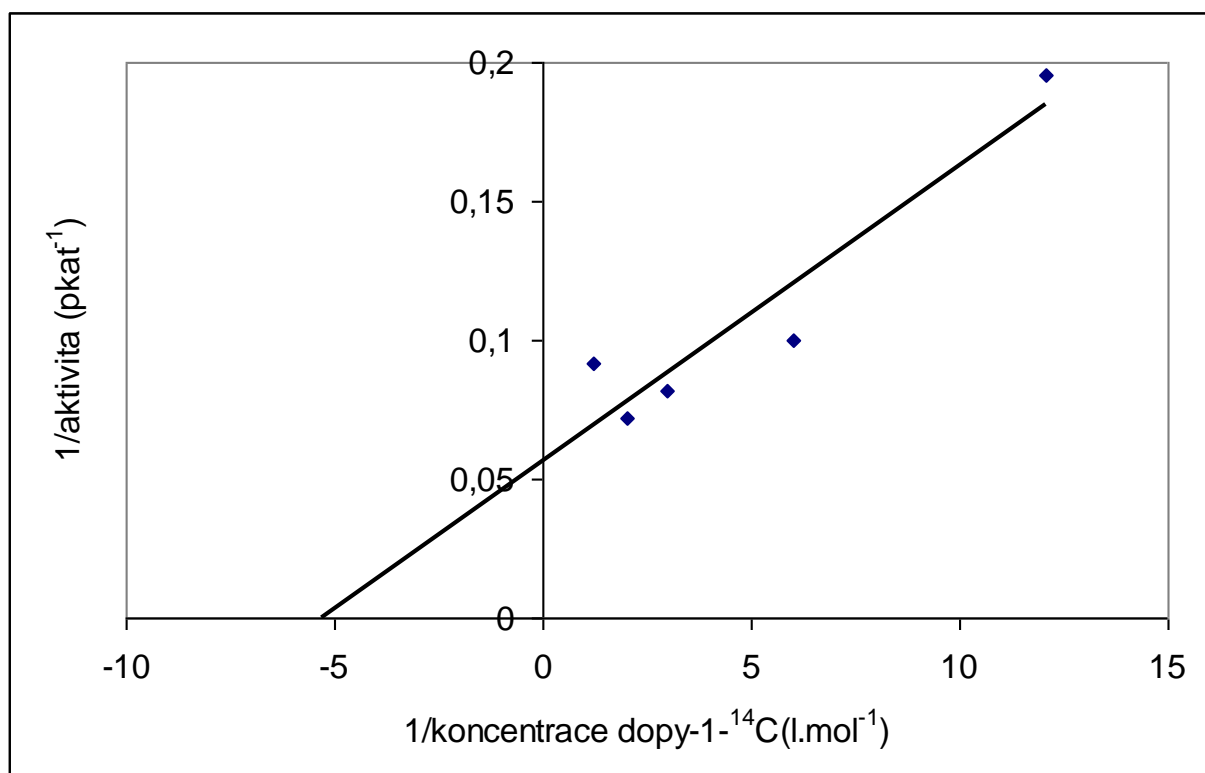
Pro přesnější určení průběhu reakce katalyzované dekarboxylasou aromatických L-aminokyselin se substrátem dopou-1-¹⁴C byl proveden pokus, jehož cílem bylo zjistit Michaelisovu konstantu K_m . Výsledky tohoto pokusu vychází z hodnot katalytických aktivit zjištěných pro jednotlivá množství substrátu dopu-1-¹⁴C v předchozím pokusu viz tabulka 31. Pokus byl proveden pro pět hodnot množství substrátu 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 a 0,5 ml, jak vyplývá z tabulky 16.

Množství supernatantu ve vzorcích bylo konstantní (0,1 ml), s výjimkou slepých vzorků bez enzymu.

Pro vynesení dle Lineweavera a Burka, ze kterého lze snadno vypočítat hodnotu K_m , bylo nutné převést koncentraci substrátu a katalytickou aktivitu enzymu na převrácené hodnoty. Tabulka, z jejichž hodnot vychází přepočítání, je uvedena jako tabulka 31 ve výsledcích předchozího pokusu a tabulka s výslednými hodnotami je uvedena níže jako tabulka 32.

Tab. 32 Reciproké hodnoty koncentrace substrátu a katalytické aktivity potřebné pro vynesení dle Lineweavera a Burka.

1/koncentrace dopu-1- ¹⁴ C (l.mol ⁻¹)	12,05	6,02	3	2	1,21
1/aktivita (pkat ⁻¹)	0,196	0,1	0,082	0,072	0,092



Obr. 21 Enzymová kinetika dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin v transformaci dle Lineweavera a Burka umožňující odečtení hodnot K_m a V_{max} .

Byla vypočtena Michaelisova konstanta pro substrát dopu-1-¹⁴C $K_m = 0,186$ mmol/l.

5. 2. 4. Výsledky sledování inhibice dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin pyridoxalisonikotinoylhydrazonem.

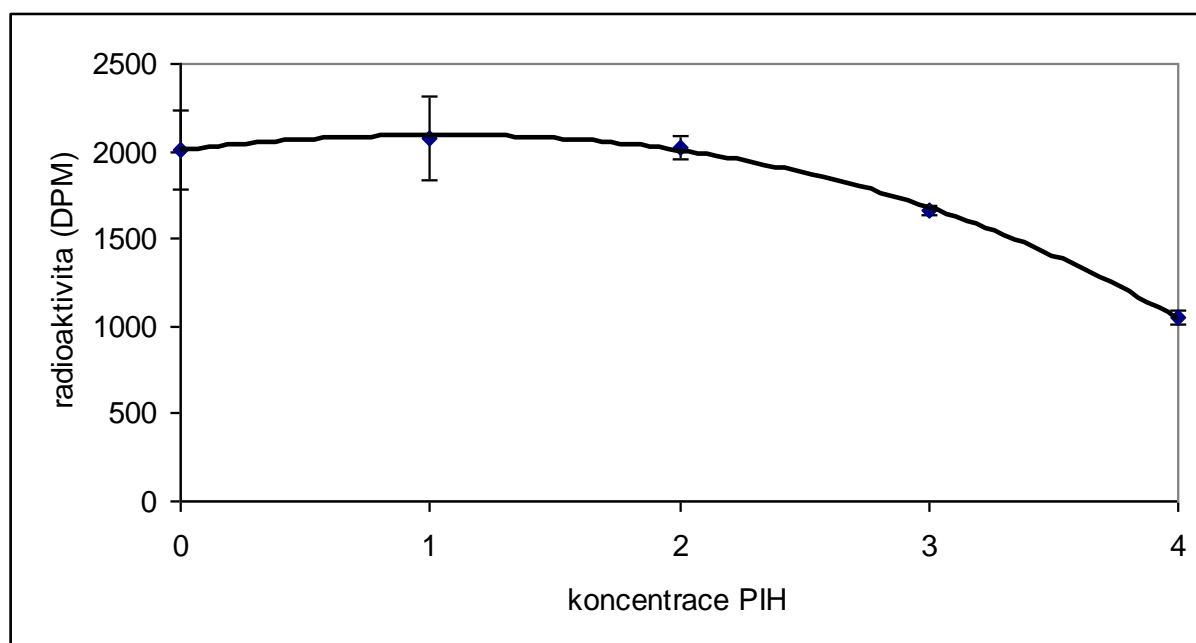
Pro sledování inhibice pyridoxalisonikotinoylhydrazonem byly připraveny vzorky obsahující konstantní množství substrátu dopu-1-¹⁴C (0,3 ml) a konstantní množství supernatantu (0,3 ml) s výjimkou slepých vzorků bez enzymu. Proměnlivou hodnotou byla koncentrace PIH. Byly připraveny vzorky s výslednou koncentrací PIH 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} a vzorky bez inhibitoru.

Výsledná koncentrace koenzymu PLP ve vzorcích byla $1,44 \cdot 10^{-6}$ M.

Pokus byl proveden podle obecného postupu uvedeného v kapitole 4. 8. 1. Roztoky inhibitoru různých koncentrací byly připraveny ředěním základního roztoku připraveného v čas potřeby podle postupu v kapitole 4. 5. tak, aby bylo po vnesení do inkubační směsi dosaženo požadovaných koncentrací uvedených výše.

Tab. 33 Hodnoty naměřené radioaktivity a katalytické aktivity enzymu pro uvedené výsledné koncentrace PIH.

koncentrace PIH (M)	0M	10^{-6} M	10^{-5} M	10^{-4} M	10^{-3} M
radioaktivita (DPM)	2007,1	2072,5	2024	1660,5	1046,6
směrodatná odchylka	230,1	243	64,8	31,3	39,6
aktivita (pkat)	25,09	25,91	25,3	20,76	13,1



Obr. 22 Závislost naměřené radioaktivity na koncentraci inhibitoru pro koncentraci substrátu 0, 3 ml a množství supernatantu 0,3 ml. Hodnoty **0, 1, 2, 3 a 4** na ose x odpovídají vzorku **bez inhibitoru** a koncentracím PIH 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} a 10^{-3} M v uvedeném pořadí. Každý bod je

průměrem ze tří naměřených hodnot radioaktivity, hodnoty směrodatných odchylek jsou uvedeny v tabulce 33. Z grafu je patrný pokles hodnot radioaktivity se vzrůstající koncentrací inhibitoru PIH. Naměřená hodnota radioaktivity pro vzorky bez inhibitoru byla nižší než u vzorků s výslednou koncentrací PIH 10^{-6} M a 10^{-5} M.

5. 2. 5. Výsledky sledování kinetiky inhibované a neinhibované reakce

Pro pokus byla zvolena výsledná koncentrace inhibitoru 10^{-3} M. Kromě slepých vzorků obsahovaly všechny vzorky 0,3 ml supernatantu.

Pro každou koncentraci dopy-1- ^{14}C byly připraveny tři typy vzorků, vzorek bez inhibitoru, s inhibitorem a slepý vzorek. Byla použita množství dopy-1- ^{14}C 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 a 0,4 ml. Výsledná koncentrace PLP ve vzorcích byla $1,26 \cdot 10^{-6}$ M.

Protože byly provedeny dvě inkubace, pro každý typ vzorku byly k dispozici čtyři naměřené hodnoty radioaktivity s výjimkou slepých vzorků, u kterých byly k dispozici dvě hodnoty.

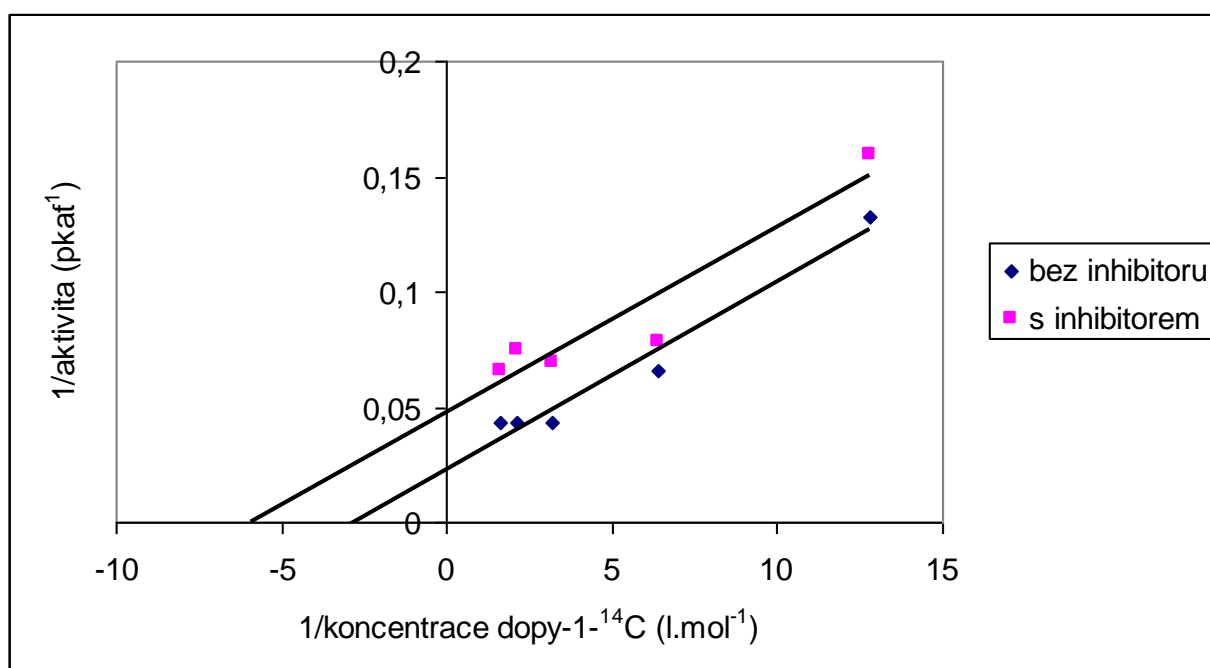
Tab. 34 Naměřené hodnoty radioaktivity a katalytické aktivity vzorků s inhibitorem a bez inhibitoru pro použité koncentrace dopy-1- ^{14}C a příslušné směrodatné odchylky.

substrát dopy-1- ^{14}C (ml)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
koncentrace dopy-1- ^{14}C (mmol/l)	0,078	0,156	0,313	0,469	0,625
radioaktivita vz. bez inhibitoru (DPM)	605,6	1224,1	1859,0	1840,6	1840,6
radioaktivita vz. s inhibitorem (DPM)	501,4	1024,8	1151,1	1074,7	1220,3
směrodatná odchylka radioaktivit vz. bez I	112,7	149,2	195,9	355,5	462,2
směrodatná odchylka radioaktivit vz. s I	62,2	99,9	139,8	339,4	216,0
aktivita vz. bez inhibitoru (pkat)	7,6	15,3	23,2	23,0	23,0
aktivita vz.s inhibitorem (pkat)	6,3	12,8	14,4	13,4	15,3

Pro transformaci dle Lineweavera a Burka je nezbytné převést hodnoty koncentrace značeného substrátu a katalytické aktivity na převrácené hodnoty. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce 35.

Tab. 35 Reciproké hodnoty použitých koncentrací substrátu dopy-1-¹⁴C a jim odpovídajících hodnot aktivit pro uvedené koncentrace substrátu v případě inhibované a neinhibované reakce.

1/koncentrace dopy-1- ¹⁴ C	12,82	6,41	3,19	2,13	1,6
1/aktivita vz. bez inhibitoru	0,132	0,065	0,043	0,043	0,043
1/aktivita vz. s inhibitorem	0,160	0,078	0,069	0,074	0,066



Obr. 23 Závislost převrácené hodnoty katalytické aktivity enzymu na převrácené hodnotě koncentrace substrátu ve vynesení dle Lineweavera a Burka. Každá hodnota aktivity je průměrem čtyř hodnot získaných během dvou inkubací.

Přímky proložené body jsou přibližně rovnoběžné. Rovnoběžnost přímek formálně odpovídá akompetitivní inhibici.

Byla vypočtena inhibiční konstanta K_i , která vyjadřuje afinitu inhibitoru k enzymu.

Inhibiční konstanta $K_i = 7,69 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

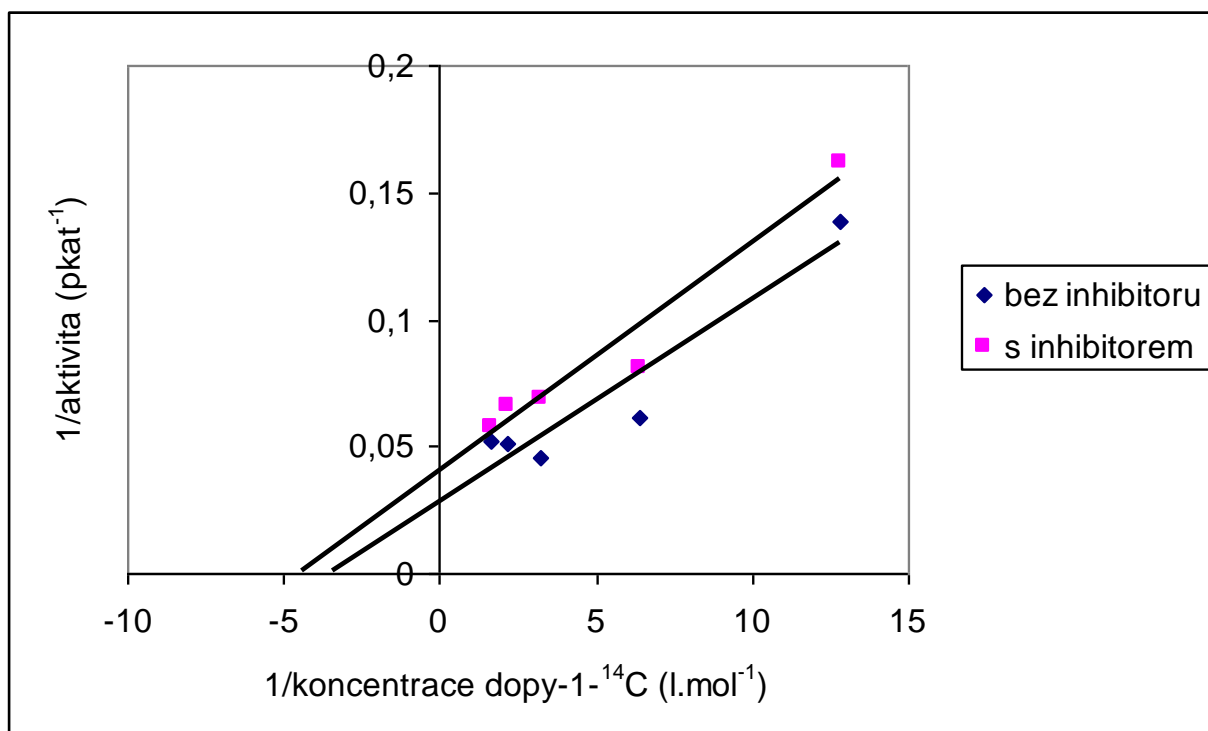
Pokud se závislost vytvoří pro výsledky každé inkubace zvlášť, je orientace přímek obdobná jako v tomto souhrnném grafu (vzorky z jedné inkubace zatíženy stejnou chybou).

Tab. 36 Hodnoty naměřených radioaktivit a katalytických aktivit vzorků z první inkubace.

substrát dopa-1- ¹⁴ C (ml)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
koncentrace dopy-1- ¹⁴ C (mmol/l)	0,078	0,156	0,313	0,469	0,625
aktivita bez inhibitoru (DPM)	575,6	1300,8	1767,2	1557,5	1543,3
aktivita s inhibitorem (DPM)	495,1	983,4	1155,1	1203,1	1395,3
směrodatná odchylka radioaktivit vz. bez I	152,3	65,6	111,3	224,4	474,8
směrodatná odchylka radioaktivit vz. s I	5,4	63,3	53,4	279,4	126,4
aktivita vz. bez inhibitoru (pkat)	7,2	16,3	22,1	19,5	19,3
aktivita vz.s inhibitorem (pkat)	6,2	12,3	14,4	15,0	17,4

Tab. 37 Reciproké hodnoty koncentrací substrátu a katalytických aktivit vzorků z první inkubace

1/koncentrace dopy-1- ¹⁴ C	12,82	6,41	3,19	2,13	1,6
1/aktivita vz. bez inhibitoru	0,138985	0,061501	0,045269	0,051364	0,051837
1/aktivita vz. s inhibitorem	0,161584	0,081350	0,069258	0,066495	0,057335



Obr. 24 Závislost recipročních hodnot katalytických aktivit a koncentrací substrátu vzorků z první inkubace. Každý bod představuje průměr ze dvou hodnot.

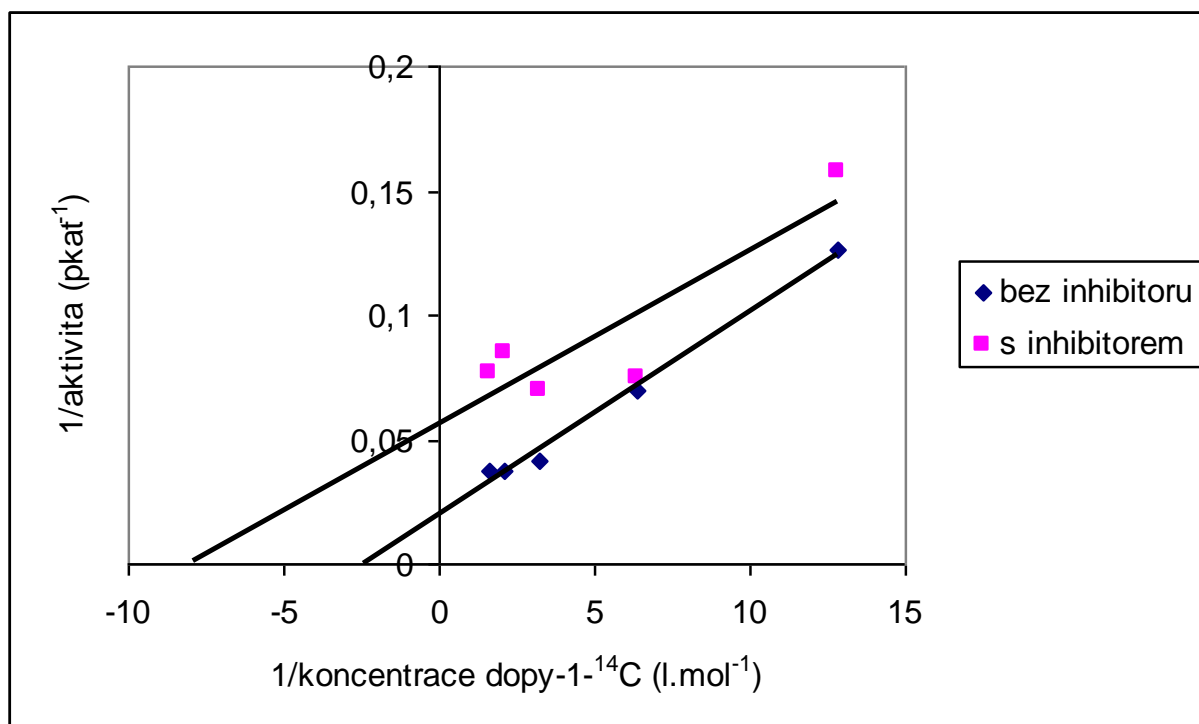
Inhibiční konstanta $K_i = 2,38 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

Tab. 38 Hodnoty naměřených radioaktivit a katalytických aktivit vzorků z druhé inkubace.

koncentrace L-dopy-1- ¹⁴ C	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
koncentrace dopy-1- ¹⁴ C (mmol/l)	0,078	0,156	0,313	0,469	0,625
aktivita bez inhibitoru (DPM)	635,6	1147,5	1950,7	2123,7	2138,0
aktivita s inhibitorem (DPM)	507,8	1066,2	1147,1	946,3	1045,2
směrodatná odchylka radioaktivit vz. bez I	106,3	197,4	262,8	90,7	248,3
směrodatná odchylka radioaktivit vz. s I	106,8	138,0	236,1	448,9	37,3
aktivita vz. bez inhibitoru (pkat)	7,9	14,3	24,4	26,5	26,7
aktivita vz.s inhibitorem (pkat)	6,3	13,3	14,3	11,8	13,1

Tab. 39 Reciproké hodnoty koncentrací substrátu a katalytických aktivit vzorků z druhé inkubace

1/koncentrace dopy-1- ¹⁴ C	12,82	6,41	3,19	2,13	1,6
1/aktivita vz. bez inhibitoru	0,125865	0,069717	0,041011	0,037670	0,037418
1/aktivita vz. s inhibitorem	0,157542	0,075033	0,069741	0,084540	0,076540



Obr. 25 Transformace dle Lineweavera a Burka podle výsledků druhé inkubace. Přímky jsou opět přibližně rovnoběžné, což by poukazovalo na akompetitivní inhibici. Jednotlivé body jsou průměrem ze dvou hodnot.

Inhibiční konstanta $K_i = 5,4 \cdot 10^{-4}$ M

6. DISKUSE

V rámci diplomové práce byla ke stanovení aktivity dekarboxylasy aromatických aminokyselin použita metoda popsaná Dršatou a Haisem (1973). Metoda spočívá v dekarboxylaci substrátů značených ^{14}C na karboxylu a detekci uvolněného $^{14}\text{CO}_2$. K pokusům byly použity dva substráty značené ^{14}C na karboxylu, tyrosin-1- ^{14}C a dopa-1- ^{14}C . Modifikace metody byla provedena z hlediska objemů a koncentrací složek inkubační směsi. Výsledné koncentrace koenzymu pyridoxalfosfátu se mírně lišily v jednotlivých pokusech, ale obecně v pokusech se substrátem tyrosinem-1- ^{14}C se jeho koncentrace pohybovala v řádu 10^{-5} a v případě druhého substrátu dopy-1- ^{14}C byla koncentrace o řád nižší, 10^{-6} M. Tato koncentrace je vhodná, jak plyne z práce Dršaty a Haise (1973) i z dřívějších pokusů provedených na katedře (Kreuzigerová 1998). V případě tyrosinu-1- ^{14}C byla zvolena vyšší koncentrace, aby bylo zajištěno nasycení enzymu koenzymem.

K pokusům bylo v případě substrátu dopy-1- ^{14}C zvoleno pH 6,8 nastavené 0,02 M fosfátovým pufrům, které je považováno za pH optimum pro dekarboxylaci dopy podle Dršaty a Haise (1973) i dalších autorů (Lovenberg se sp. 1962). Pro reakce s tyrosinem-1- ^{14}C bylo nastaveno pH optimum 7,2.

Při všech pokusech byla dodržena teplota inkubace 37°C , délka inkubace 30 minut a ponechání vzorků za stálého třepání ve vodní lázni 60 minut od zastavení reakce injekcí kyseliny sírové, která vytěsňuje z roztoku uvolněný $^{14}\text{CO}_2$.

Co se týče afinity substrátů k dekarboxylase aromatických aminokyselin (EC 4. 1. 1. 28), literatura uvádí, že nejvyšší afinitou k uvedenému enzymu se vyznačují substráty L-dihydroxyfenylalanin (L-dopa) a 5-hydroxytryptofan (Weissbach se sp. 1960). Ze substrátů používaných pro pokusy v rámci této práce byla tudíž očekávána nižší afinita tyrosinu k DAAK.

Pokusy, jejichž cílem bylo stanovit základní parametr enzymové reakce, Michaelisovu konstantu, byly provedeny u obou substrátů za podobných nikoliv však shodných podmínek (délka inkubace, inkubační teplota shodné, ale rozdílné množství enzymu, pro tyrosin 0,3 ml a pro dopu 0,1 ml supernatantu a rozdílné pH).

Jaterní supernatant jako zdroj enzymu byl pro všechny pokusy získán centrifugací homogenátu potkaních jater s čtyřnásobkem čišťené vody 30 min při 20000g.

K vypočtení hodnoty Michalisovy konstanty K_m byla provedena linearizace závislosti katalytické aktivity enzymu v pkat (pmol/s) na koncentraci substrátu vyjádřené v mmol/l. Linearizace závislosti bylo dosaženo dvojité reciprocím vynesemím uvedených hodnot dle Lineweavera a Burka.

Předpokládalo se, že dopa je vhodnějším substrátem pro DAAK než tyrosin, jak udává literatura (Weissbach 1960). Z porovnání vypočtených hodnot Michaelisovy konstanty pro substráty tyrosin-1- ^{14}C a dopu-1- ^{14}C však vyplývá opak.

Porovnání maximálních rychlostí reakce V_{\max} za podmínek, kdy nebyly použity stejné koncentrace enzymu, bylo zbytečné, proto příslušné hodnoty V_{\max} nejsou uvedeny.

Tab. 40 Hodnoty Michaelisovy konstanty pro použité substráty

substrát	tyrosin-1- ^{14}C	dopa-1- ^{14}C
Michaelisova konstanta K_m (mmol/l)	0,055	0,186

Poněkud překvapivě výsledky poukazují na vyšší afinitu tyrosinu-1- ^{14}C k dekarboxylase aromatických L-aminokyselin. Toto je v rozporu se známými poznatky, ale i v diplomové práci Kreuzigerové (1998) jsou zaznamenány údaje o vyšší afinitě tyrosinu-1- ^{14}C k DAAK než v případě dopu-1- ^{14}C .

Hlavním cílem diplomové práce bylo sledovat vliv pyridoxalisonikotinoylhydrazonu (PIH) na aktivitu dekarboxylasy aromatických aminokyselin (DAAK). PIH je strukturou Schiffova baze, která vzniká reakcí mezi pyridoxalem a isoniazidem. Kvůli těmto dvěma částem má PIH potenciál interagovat s pyridoxalovými enzymy.

Uvažuje se o zavedení této látky do klinické praxe jako chelátoru železa. PIH má také potenciál chránit před kardiotoxicitou antracyklinových antibiotik (Šimůnek se sp. 2005).

U nově zaváděného léčiva je potřeba zjistit jeho nežádoucí účinky, interakce s enzymy atd. Cílem práce bylo přispět ke sledování negativních účinků PIH, konkrétně vlivu na aktivitu DAAK.

Očekávalo se, že PIH vzhledem ke své struktuře bude interagovat s DAAK. Úkolem bylo zjistit, jestli PIH inhibuje DAAK, případně jak silným je inhibitorem DAAK.

Byla vytvořena závislost dle Lineweavera a Burka pro inhibovanou a neinhibovanou reakci. Podle vzájemné orientace přímek odpovídajících neinhibované a inhibované reakci ve vynesení dle Lineweavera a Burka byl odhadnut typ inhibice. V případě tyrosinu-1-¹⁴C bylo navíc provedeno vynesení dle Dixona, které vyjadřuje závislost reciproké hodnoty rychlosti reakce na koncentraci inhibitoru. Bylo třeba použít hodnoty pro dvě různé koncentrace substrátu a ze vzájemné orientace přímek těmito body proložených bylo možno odhadnout typ inhibice. Výsledky plynoucí z Dixonova grafu měly potvrdit nebo vyvrátit závěry získané z vynesení dle Lineweavera a Burka.

Pokusy pro oba substráty byly opět provedeny za podobných podmínek (stejně množství supernatantu, stejně dlouhá doba inkubace, inkubační teplota, pH bylo rozdílné). Podobná byla i množství přidávaného substrátu. 0,05, 0,1, 0,2 a 0,3 ml bylo shodné pro oba substráty. Rozdíl byl v nejvyšších hodnotách přidávaného substrátu. V případě tyrosinu-1-¹⁴C bylo použito nejvyšší množství 0,5 ml. U dopy-1-¹⁴C bylo podle výsledku provedeného pokusu s měnícím se koncentrací substrátu zjištěno, že pro 0,5 ml substrátu dochází patrně k inhibici enzymu nadbytkem substrátu, proto bylo jako nejvyšší zvoleno množství substrátu 0,4 ml.

Pro oba substráty byla zvolena rozdílná výsledná koncentrace PIH. V případě tyrosinu-1-¹⁴C šlo o koncentraci $2,5 \cdot 10^{-4}$ M, u dopy-1-¹⁴C byla použita vyšší koncentrace 10^{-3} M.

Odlíšná byla také koncentrace koenzymu pyridoxalfosfátu v inkubační směsi. V případě tyrosinu-1-¹⁴C šlo o koncentraci $1,5 \cdot 10^{-5}$ M, u dopy-1-¹⁴C byla výsledná koncentrace PLP $1,26 \cdot 10^{-6}$ M.

Byly vypočteny inhibiční konstanty K_i pro oba substráty.

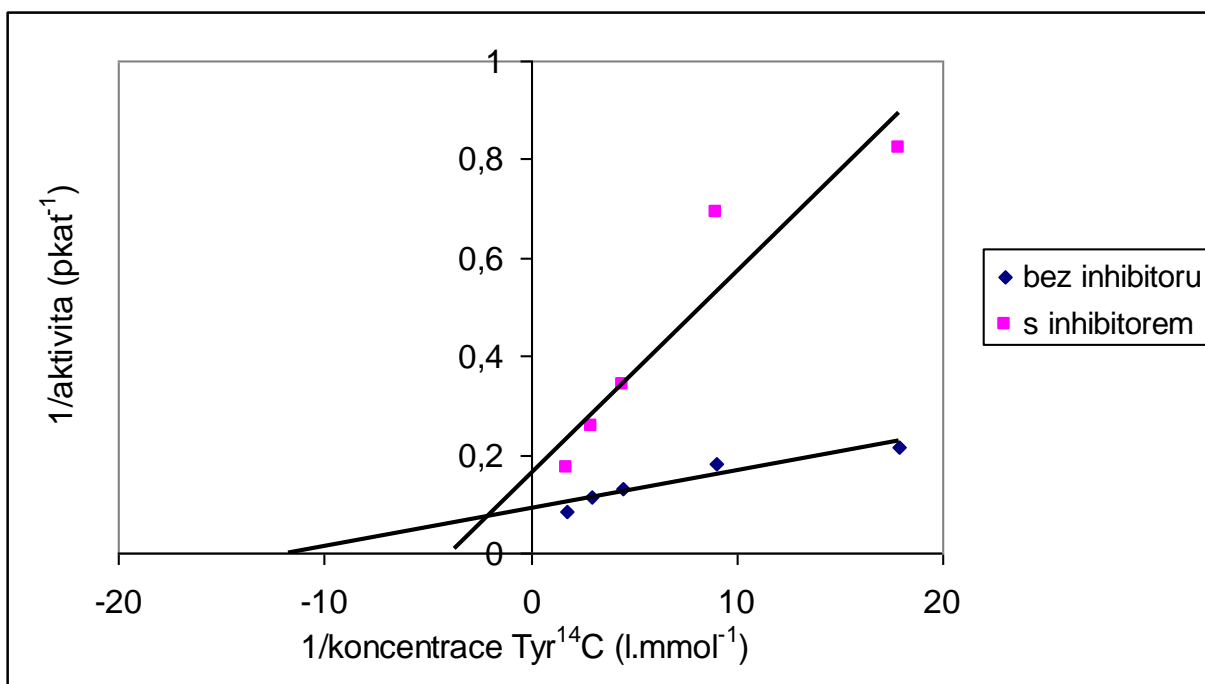
Tab. 41 Zjištěné hodnoty inhibičních konstant K_i

substrát	tyrosin-1- ¹⁴ C	dopa-1- ¹⁴ C
inhibiční konstanta K_i (M)	$3,01 \cdot 10^{-4}$	$7,69 \cdot 10^{-4}$

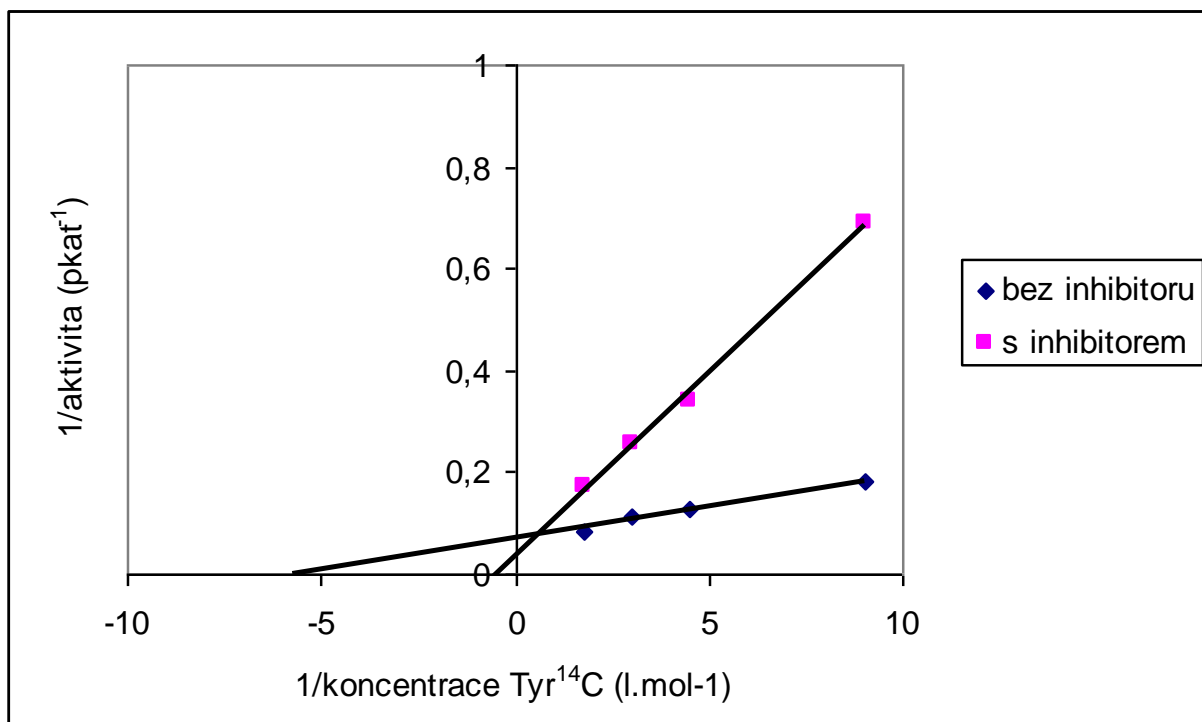
Z tabulky 41 plyne, že silnější inhibice byla pozorována v případě tyrosinu-1-¹⁴C. Nejedná se však o výrazný rozdíl, hodnoty inhibičních konstant jsou řádově stejné.

Pro substrát tyrosin-1-¹⁴C průběh přímek ve vynesení dle Lineweavera a Burka formálně odpovídal smíšené inhibici. Lze však spekulovat o tom, jestli se nedá vyloučit bod, který má

ze statistického hlediska nejmenší váhu, a nelze přímku body proložit jinak, než jak ukazuje obrázek obr. 16 (26). Ve vynesení podle Dixona jsou přímky protínající body odpovídající dvěma koncentracím substrátu orientovány navzájem tak, jak formálně odpovídá kompetitivní inhibici. Tento fakt dále podporuje úvahy o kompetitivním typu inhibice pro substrát tyrosin- $1\text{-}^{14}\text{C}$.



Obr. 26 Transformace dle Lineweavera a Burka. Vzájemná orientace přímek odpovídá smíšené inhibici.



Obr. 27 Transformace dle Lineweavera a Burka po vynechání nejvzdálenějšího bodu odpovídajícího koncentraci substrátu 0,056 mmol/l (množství substrátu v reakční směsi 0,05 ml). Průsečík obou přímek se přiblížil ose y, což může být pravděpodobně považováno za kompetitivní inhibici.

Inhibiční konstanta $K_i = 1,67 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

Poněkud překvapivý byl však zjištěný typ inhibice v případě substrátu dopy-1-¹⁴C. Z rovnoběžnosti obou přímek v grafu dle Lineweavera a Burka by formálně vyplývalo, že jde o akompetitivní inhibici.

U akompetitivní inhibice vazba substrátu na enzym pozmění vazebné poměry tak, že teprve po navázání substrátu se může vázat inhibitor. Literatura uvádí, že výskyt akompetitivní inhibice u jednosubstrátových reakcí je pravděpodobně zvláštností, ale u vícesubstrátových reakcí je zcela běžná (Kotyk a Horák 1977).

Nicméně byly provedeny dva pokusy za shodných podmínek a výsledky obou poukazují na akompetitivní typ inhibice. I při spojení všech výsledků dohromady pro získání většího počtu naměřených hodnot pro jednotlivé koncentrace substrátu byl zjištěn stejný typ inhibice.

Problematika inhibice DAAK PIH nebyla doposud zpracována v literatuře, nebylo proto možné výsledky zkonfrontovat s výsledky jiných autorů.

Byl také zkoumán vliv měnící se koncentrace koenzymu pyridoxalfosfátu na aktivitu dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin v přítomnosti inhibitoru a v neinhibované reakci. Na základě podobnosti struktury bylo možno předpokládat, že bude existovat kompetice mezi PIH a koenzymem.

Pokus byl proveden pro substrát tyrosin-1-¹⁴C, koncentrace inhibitoru v inhibované reakci byla $2,5 \cdot 10^{-4}$ M. Koncentrace koenzymu se měnila řádově od 10^{-7} do 10^{-3} M (viz kapitola 4. 7. 8.).

Výsledky pokusu ukázaly, že ke kompetici nedochází, inhibici nebylo možno zvrátit zvyšováním koncentrace koenzymu až do nejvyšší použité koncentrace $1,5 \cdot 10^{-3}$ M. Naopak byla pozorována inhibice enzymu nejvyšší koncentrací PLP. V literatuře nebyla nalezena práce, která by se touto problematikou zabývala, proto nebylo možno porovnat získané výsledky.

7. SOUHRN

V diplomové práci byl sledován vliv derivátu koenzymu pyridoxalových enzymů na aktivitu dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin *in vitro*.

Pyridoxalisonikotinoylhydrazon (PIH) je výrazným představitelem skupiny aroylhydrazonů. Látky této skupiny mají chelatační schopnosti a z toho důvodu se uvažuje o zavedení PIH do klinické praxe jako chelátoru železa. Studuje se také schopnost PIH chránit před kardiotoxicitou anthracyklinových antibiotik.

Byl sledován vliv PIH na aktivitu dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin za využití dvou substrátů značených ^{14}C na karboxylu, L-tyrosinu-1- ^{14}C a D,L-dopy-1- ^{14}C . Všechny pokusy byly provedeny metodou popsanou Dršatou a Haisem (1973). Jedná se o metodu využívající substráty značené na karboxylu. Uvolněná radioaktivita, která je měřena, odpovídá rozsahu dekarboxylace. Plynný $^{14}\text{CO}_2$ je v průběhu reakce zachycován na proužku chromatografického papíru zvlhčeném roztokem hydroxidu draselného. Je měřena radioaktivita tohoto proužku.

Ve všech pokusech byla dodržena teplota inkubace 37°C a délka inkubace 30 minut. Vzorčky byly vždy ponechány 60 minut po zastavení reakce při teplotě 37°C za stálého třepání.

V případě obou uvedených substrátů byla pozorována inhibice DAAK PIH. Pokusy pro substráty byly provedeny za podobných podmínek (teplota, délka inkubace, množství supernatantu 0,3 ml v reakční směsi shodné). Rozdílná byla koncentrace inhibitoru. Pro pokus s tyrosinem-1- ^{14}C byla použita koncentrace $2,5 \cdot 10^{-4}$ M, s dopou-1- ^{14}C 10^{-3} M. Koncentrace koenzymu v pokusech s tyrosinem-1- ^{14}C byla v řádu 10^{-5} , pro pokusy s dopou-1- ^{14}C 10^{-6} M. Byly spočítány inhibiční konstanty pro oba substráty. Pro inhibovanou reakci PIH v případě tyrosinu-1- ^{14}C byla zjištěna inhibiční konstanta K_i $3,01 \cdot 10^{-4}$ M, u dopy-1- ^{14}C $7,69 \cdot 10^{-4}$ M. Co se týče využití PIH v klinické praxi, zatím jsou k dispozici pouze přibližné hodnoty předpokládaných terapeutických koncentrací získané z pokusů na zvířatech (řádově 10^{-5} až 10^{-4} M). Zjištěné inhibiční konstanty pro oba substráty byly v řádu 10^{-4} M. To, že se tyto hodnoty blíží hodnotám inhibičních konstant, které vypovídají o afinitě inhibitoru k enzymu, není příznivé z pohledu potenciálního klinického využití PIH.

Rovněž byl zjišťován typ inhibice z grafu dle Lineweavera a Burka. Pro substrát tyrosin-1- ^{14}C byla pozorována kompetitivní inhibice. Poněkud překvapivý byl výsledek se substrátem

dopu- $1\text{-}^{14}\text{C}$, pro který byla zjištěna akompetitivní inhibice. Pokus byl zopakován se stejným výsledkem.

Pro jednotlivé substráty byl odhadnut základní kinetický parametr enzymové reakce.

Michaelisova konstanta byla zjištěna z vynesení dle Lineweavera a Burka. Pokusy pro oba substráty nebyly provedeny za shodných podmínek (různé koncentrace enzymu), což omezuje vzájemné porovnávání maximálních rychlostí reakce V_{\max} . V případě tyrosinu $1\text{-}^{14}\text{C}$ byla vypočtena Michaelisova konstanta $0,055\text{ mmol/l}$, pro dopu $1\text{-}^{14}\text{C}$ $0,186\text{ mmol/l}$. Z uvedeného vyplývá, že vyšší afinitu k enzymu vykazoval substrát tyrosin $1\text{-}^{14}\text{C}$, což je v rozporu se známými údaji o afinitě substrátů k DAAK. Stejných výsledků jako v rámci této práce bylo dosaženo při dřívějších pokusech na katedře (Kreuzigerová 1998).

Ve vzorci PIH jsou patrné části, které odpovídají pyridoxalu a isoniazidu. Byl proveden pokus, jehož úkolem bylo zjistit, jestli dochází ke kompetici mezi koenzymem dekarboxylasy pyridoxal-5-fosfátem a PIH, derivátem pyridoxalu. Byly použity různé koncentrace PLP ($1,5 \cdot 10^{-7}$ až $1,5 \cdot 10^{-3}\text{ M}$), konstantní množství supernatantu $0,3\text{ ml}$, substrátu tyrosinu- $1\text{-}^{14}\text{C}$ $0,2\text{ ml}$, popř. konstantní koncentrace PIH $2,5 \cdot 10^{-4}\text{ M}$. Výsledky pokusu ukazují, že ke kompetici nedochází. Koenzym ani ve vysoké koncentraci nevytěsnil PIH. Naopak nadbytek koenzymu v nejvyšší koncentraci inhiboval aktivitu enzymu.

8. ZÁVĚR

Závěry diplomové práce byly vyvozeny na základě stanovených cílů.

- 1.) Byla zjištěna inhibice dekarboxylasy aromatických L-aminokyselin pyridoxalisonikotinoylhydrazonem. Pro oba substráty byla inhibice přibližně stejně silná, o něco silnější byla v případě substrátu tyrosinu-1-¹⁴C.
- 2.) Pro jednotlivé substráty byl určen typ inhibice. Inhibice DAAK PIH se substrátem tyrosinem-1-¹⁴C byla kompetitivní, se substrátem dopou-1-¹⁴C formálně akompetitivní.
- 3.) Přes strukturní podobnost nebyla inhibice DAAK PIH kompetitivní s koenzymem pyridoxalfosfátem.
- 4.) Inhibice DAAK PIH nebyla zanedbatelná. Předpokládané plazmatické koncentrace pro terapii se blíží hodnotám zjištěných inhibičních konstant, což není příznivé s ohledem na potenciální terapeutické využití PIH.

9. SEZNAM LITERATURY

Boušová I. (2004) : Oxidační stres a choroby z volných radikálů. Přednáška pro studenty 3. ročníku Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové.

www.faf.cuni.cz/exchange→veřejné složky→ útvary fakulty→160 katedra biochemických věd→patobiochemie (13.3.06)

Brus R. (1975) : Activity of some enzymes which synthesize and metabolize catecholamines in the brain and peripheral organs in developing rats. Arch. Immunol. Ther. Exp. Warsz **23**, 449-457

Davison A. N. (1956) : The mechanism of inhibition of decarboxylases by isonicotinoyl hydrazide. Biochem. Biophys. Acta **19**, 131- 140, citováno z Schröterová L., Kaiserová H., Baliharová V., Velík J., Geršl V.a Kvasničková E. (2004) : The effect of new lipophilic chelators on the activities of cytosolic reductases and P450 cytochromes involved in the metabolism of anthracycline antibiotics : Studies in vitro. Physiol. Res. **53**, 683-691

Jaffe M. E. (1973) : Clinical studies of carbidopa and L-dopa in the treatment of Parkinson's disease. Adv. Neurol. **2**, 161-172

Kopin I. J. (1993) : Parkinson's disease : past, present, and the future. Neuropsychopharmacol. **9**, 1-12

Kreuzigerová I. (1998) : Inhibice dekarboxylas aminokyselin. Diplomová práce. FaF UK HK, Katedra biochemických věd.

Nagatsu T. (1991) : Genes for human catecholamine-synthesizing enzymes. Neurosci. Res. **12**, 315-345

Palm D. (1958) : Inhibition of dopa-decarboxylase by isonicotinic acid hydrazide. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. **234**, 206-209

Udenfriend S. (1964) : Amino acid decarboxylation steps in the biosynthesis of norepinephrine, serotonin, and histamine. *Vitam. Horm.* **22**, 445-450

Vodrážka Z. (1996) : Klasifikace a názvosloví (3. 1. 3.)

Buněčný pool aminokyselin a přehled jejich metabolismu (4. 6. 3.) - *in* Academia (ed.) : *Biochemie*. 2. upravené vydání, Praha, Kniha první - Obdivuhodné katalyzátory-enzymy, 121-124, Kniha druhá- Živý systém jako chemický stroj, 88- 89

Wexler L. H. (1998) : Ameliorating anthracycline cardiotoxicity in children with cancer: clinical trials with dexrazoxane. *Semin. Oncol.* **25**, 86-92

Bender D. A. a Coulson W. F. (1972) : Variations in aromatic amino acids decarboxylase activity towards dopa and 5-hydroxytryptophan caused by pH changes and denaturation. *J. Neurochem.* **19**, 2801-2810

Birkmayer W. a Hornykiewicz O. (1961) : Der L-3,4 – dioxyphenylalanin (L-dopa) –Effekt bei der Parkinsonakinese. *Wiener Klinische Wochenschrift* **73**, 787-788

Buss J. L. a Poňka P. (2003) : Hydrolysis of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogs. *Biochim. Biophys. Acta* **1619**, 177-186

Dršata J. a Hais I. M. (1973) : Metoda stanovení aktivity dekarboxylasy aromatických aminokyselin v mozku. *Chem. Listy* **67**, 853-859

Hyland K. a Clayton P. T. (1990) : Aromatic amino acid decarboxylase deficiency in twins. *J. Inherit. Metab. Dis.* **13**, 301-304

Kang U. J. a Joh T. H. (1990) : Deduced amino acid sequence of bovine aromatic L-amino acid decarboxylase: homology to other decarboxylases. *Brain Res.* **8**, 83-87

Kemp B. E. a Pearson R. B. (1990) : Protein kinase recognition sequence motifs. Trends Biochem. Sci. **15**, 342-346

Kotyk A. a Horák J. (1977) : Inhibice - in Academia (ed.) : *Enzymová kinetika*. Praha, 38, 119

Lloyd K. G. a Hornykiewicz O. (1972) : Occurrence and distribution of aromatic L-amino acid (L-dopa) decarboxylase in human brain. J. Neurochem. **19**, 1549-1559

Olney J. W. a Farber N. B. (1995): Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. Arch. Gen. Psychiat. **52**, 998-1007

Randrup A. a Munkvad I. (1972) : Evidence indicating an association between schizophrenia and dopaminergic hyperactivity in the brain. Orthomol. Psychiat. **1**, 2-7

Sedvall G. a Farde L. (1995) : Chemical brain anatomy in schizophrenia. Lancet **346** , 743-749

Zhu M.-Y. a Juorio A. V. (1995) : Aromatic L-amino acid decarboxylase: Biological characterization and functional role. Gen. Pharmac. Vol. **26**, No. 4, 681-696

Abercrombie E. D., Bonatz A. E. a Zigmond M.-J. (1990) : Effects of L-dopa on extracellular dopamine in striatum of normal and 6-hydroxydopamine-treated rats. Brain Res. **525**, 36-44

Baker E., Richardson D., Gross S. a Poňka P. (1992) : Evaluation of the iron chelation potential of hydrazones of pyridoxal, salicylaldehyde and 2-hydroxy-1-naphthylaldehyde using the hepatocyte in culture. Hepatology **15**, 492-501

Bernhardt P. V., Chin P., Sharpe P. C., Wang J. Y. a Richardson D. R. (2005) : Novel diarylhydrazine ligands as iron chelators: coordination chemistry and biological activity. J. Biol. Inorg. Chem. **10**, 761-77

Berry M. D., Juorio A. V., Li X.-M. a Boulton A. A. (1996) : Aromatic L-amino acid decarboxylase : A neglected and misunderstood enzyme. *Neuroch. Res.*, Vol. **21**, No. 9, 1075-1087

Bláha K., Cikrt M., Nerudová J., Fornusková H. a Poňka P.(1998) : Biliary iron excretion in rats following treatment with analogs of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone. *Blood* **91**, 4368-4372

Buckland P. R., Spurlock G. a McGuffin P. (1996) : Amphetamine and vigabatrin down regulate aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA levels. *Mol. Brain Res.* **35**, 69-76

Buss J. L., Arduini E. a Poňka P. (2002a) : Mobilization of intracellular iron by analogs of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) is determined by the membrane permeability of the Fe-chelator complexes. *Biochem. Pharmacol.* **64**, 1689-1701

Buss J. L., Hermes-Lima M., Poňka P. (2002b) : Pyridoxal isonikotinoyl hydrazone and its analogues. *Adv. Exp. Med. Biol.* **509**, 205-229

Buss J. L., Neužil J. a Poňka P.(2002c) : The role of oxidative stress in the toxicity of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) analogues. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 755-7

Carrington M. J., Bird T. A. a Levene C. I. (1984) : The inhibition of lysyl oxidase in vivo by isoniazid and its reversal by pyridoxal. Effect on collagen cross-linking in the chick embryo. *Biochem. J.* **221**, 837-43

Coge F., Krieger-Poullet M., Gros F. a Thibault J. (1990): Comparative and quantitative study of L-dopa decarboxylase mRNA in rat neuronal and non-neuronal tissues. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **170**, 1006-1021

Creese I., Hamblin M. W., Leff S. E. a Sibley D. R. (1983) : CNS dopamine receptors. *Handb. Psychopharmacol.* **17**, 81-138

Dairman W., Christenson J. G. a Udenfriend S. (1972) : Changes in tyrosine hydroxylase and dopa decarboxylase induced by pharmacological agents. *Pharmacol. Rev.* **24**, 269-289

Davis K. L., Kahn R. S., Ko G. a Davidson M. (1991) : Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am. J. Psychiat.* **148**, 1474-1486

Desta Z., Soukhova N. V. a Flockhart D. A. (2001): Inhibition of cytochrome P450 (CYP450) isoforms by isoniazid: potent inhibition of CYP2C19 and CYP3A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 382-92

Dominici P., Maras B., Mei G. a Borri Voltattorni C. (1991) : Affinity labeling of pig kidney 3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa) decarboxylase with N-(bromoacetyl) pyridoxamine-5'-phosphate. Modification of an active-site cysteine. *Eur. J. Biochem.* **201**, 393-397

Dršata J., Ulrichová J. a Walterová D. (1996) : Sanguinarine and chelerythrine as inhibitors of aromatic amino acid decarboxylase. *J. Enz. Inhib.* **10**, 231-237

Duhault J., Gonnard P. a Fenard S. (1967) : Study of heterocyclic hydrazones of pyridoxal phosphate. Coenzymic action. *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)* **49**, 177-190

Eaton M. J., Gudehithlu K. P., Quach T., Silvia C. P., Hadjiconstantinou M. a Neff N. H. (1993) : Distribution of aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA in mouse brain by in situ hybridization histology. *J. Comp. Neurol.* **337**, 640-654

Edward J.T., Poňka P. a Richardson D.R. (1995) : Partition coefficients of the iron (III) complexes of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogs and the correlation to iron chelation efficacy. *BioMetals* **8**, 209-217, citováno z Buss J. L. a Poňka P. (2003) : Hydrolysis of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogs. *Biochim. Biophys. Acta* **1619**, 177-186

Edward J.T., Chubb F. L. a Sangster J. (1997) : Iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class. Relationship of the lipophilicity of the apochelator to its ability to mobilize iron from reticulocytes in vitro: reappraisal of reported partition coefficients. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **75**, 1362-1368

Gilbert J. A., Bates L. A. a Ames M. M. (1995) : Elevated aromatic L-amino acid decarboxylase in human carcinoid tumors. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 845-850

Gjedde A., Léger G. C, Cumming P., Yasuhara Y., Evans A. C., Guttman M. a Kuwabara H. (1993) : Striatal L-dopa decarboxylase activity in Parkinson's disease in vivo : implications for the regulation of dopamine synthesis. *J. Neurochem.* **61**, 1538-1541

Hayashi M., Yamaji Y., Kitajami W. a Saruta T. (1990) : Aromatic L-amino acid decarboxylase activity along the rat nephron. *Am. J. Physiol.* **258**, 28-33

Hershko C. M., Link G. M., Konijn A. M. a Cabantchik Z. I. (2005) : Objectives and mechanism of iron chelation therapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1054**, 124-35

Hökfelt T., Fuxe K. a Goldstein M.(1973) : Immunohistochemical localization of aromatic L-amino acid decarboxylase (dopa decarboxylase) in central dopamine and 5-hydroxytryptamine nerve cell bodies of the rat. *Brain Res.* **53**, 175-180

Holtz P., Heise R. a Luedtke K. (1938) : Enzymic destruction of L-dopa by the kidney. *Arch. exp. Path. Pharmacol.* **191**, 87-94, citováno z Zhu M.-Y. a Juorio A. V. (1995) : Aromatic L-amino acid decarboxylase: Biological characterization and functional role. *Gen. Pharmacol.* Vol. **26**, No. 4, 681-696

Horáčková M., Poňka P. a Byczko Z. (2000) : The antioxidant effects of a novel iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone in the prevention of H₂O₂ injury in adult cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* **47**, 529-536

Hoy T., Humphrys J., Jacobs A., Williams A. a Poňka P. (1979) : Effective iron chelation following oral administration of an isoniazid-pyridoxal hydrazone. *Br. J. Haematol.* **43**, 443-449

Ichinose H., Sumi-Ichinose C., Ohye T., Hagino Y., Fujita K. a Nagatsu T. (1992) : Tissue-specific alternative splicing of the first exon generates two types of mRNAs in human aromatic L-amino acid decarboxylase. *Biochemistry* **31**, 11546-11550

Isaac J., Berndt T. J., Chinnow S. L., Tyce G. M., Dousa T. P. a Knox F. G. (1992) : Dopamine enhances the phosphaturic response to parathyroid hormone in phosphate-deprived rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2**, 1423-1429

Jäger C. B., Teitelman G., Joh T. H., Albert V. R., Park D. H. a Reis D. J. (1983) : Some neurons of the rat central nervous system contain AADC but not monoamines. *Science* **219**, 1233-1235

Jäger C. B., Ruggiero D. A., Albert V. R., Joh T. H. a Reis D. J. (1984): Aromatic L-amino acid decarboxylase in the rat brain: immunocytochemical localization in neurons of the brain stem. *Neuroscience* **11**, 691-713

Jenkins W. T., Orłowski S. a Sizer I. W. (1959) : Glutamic-aspartic transaminase. Inhibition by isoniazid. *J. Biol. Chem.* **234**, 2657-2660

Kovaříková P., Mokřý M., Klimeš J. a Vávrová K. (2005) : HPLC study on stability of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40**, 105-112

Li X.-M., Juorio A. V., Paterson I. A., Zhu M.-Y. a Buolton A. A. (1992) : Specific irreversible MAO B inhibitors stimulate gene expression of aromatic L-amino acid decarboxylase in PC12 cells. *J. Neurochem.* **59**, 2324-2327

Lombardo T., Ferro G., Frontini V. a Percolla S. (1996) : High-dose intravenous desferrioxamine (DFO) delivery in four thalassemic patients allergic to subcutaneous DFO administration. *Am. J. Hematol.* **51**, 90-92

Lovenberg W., Weissbach H. a Udenfried S. (1962) : Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J. Biol. Res.* **237**, 89-93

Nagatsu I., Sakai M., Yoshida M. a Nagatsu T. (1988) : Aromatic L-amino acid decarboxylase-immunoreactive neurons in and around the cerebrospinal fluid-contacting neurons of the central canal do not contain dopamine or serotonin in the mouse and rat spinal cord. *Brain Res.* **475**, 91-102

Nakamura K., Ahmed M., Barr E., Leiden J. M. a Kang U. J. (2000) : The localization and functional contribution of striatal aromatic L-amino acid decarboxylase to L-3,4-dihydroxyphenylalanine decarboxylation in rodent parkinsonian models. *Cell Transplant.* **9**, 567-576

O'Malley K. L., Harmon S., Moffat M., Uhland-Smith A. a Wong S. (1995) : The human aromatic L-amino acid decarboxylase gene can be alternatively spliced to generate unique protein isoforms. *J. Neurochem.* **65**, 2409-2416

Poňka P., Borová J., Neuwirt J. a Fuchs O. (1979) : Mobilization of iron from reticulocytes. Identification of pyridoxal isonikotinoyl hydrazone as a new iron chelating agent. *FEBS Lett.* **97**, 317-321

Poňka P., Richardson D., Baker E., Schulman H. M. a Edward J. T. (1988) : Effect of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and other hydrazones on iron release from macrophages, reticulocytes and hepatocytes . *Biochim. Biophys. Acta* **967**, 122-129

Pons R., Ford B., Chiriboga C. A., Clayton P. T., Hinton V., Hyland K., Sharma R. a De Vivo D. C. (2004) : Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: clinical features, treatment, and prognosis. *Neurol.* **62**, 1058-65

Příbová M., Gregorová J. a Dršata J. (1991) : Inhibition of aromatic amino acid decarboxylase by a group of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Pharmacol. Res.* Vol. **25**, No. 3, 271-277

Rahman M. K., Nagatsu T., Sakuri T., Hori S., Abe M. a Matsuda M. (1982) : Effect of pyridoxal phosphate deficiency on AADC activity with dopa and 5-HTP as substrates in rats. *Jpn. J. Pharmac.* **32**, 803-811

Reith J., Benkelfat C., Sherwin A., Yasuhara Y., Kuwabara H., Andermann F., Bachneff S., Cumming P., Diksic M., Dyve S. E., Etienne P., Evans A. C., Lal S., Shevel M., Savard G., Wong D. F., Chouinard G. a Gjedde A. (1994) : Elevated dopa decarboxylase activity in living brain of patients with psychosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 11651-11654

Richardson D., Vitolo L. W., Baker E. a Webb J. (1989) : Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and analogues. Study of their stability in acidic, neutral and basic aqueous solutions by ultraviolet-visible spectrophotometry. *Biol. Met.* **2**, 69-76

Richardson D.R., Tran E.H. a Poňka P. (1995) : The potential of iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class as effective antiproliferative agents. *Blood* Vol. **86**, No 11, 4295-4306

Schröterová L., Kaiserová H., Baliharová V., Velík J., Geršl V. a Kvasničková E. (2004) : The effect of new lipophilic chelators on the activities of cytosolic reductases and P450 cytochromes involved in the metabolism of anthracycline antibiotics : Studies in vitro. *Physiol. Res.* **53**, 683-691

Schulman H. M., Hermes-Lima M., Wang E. M. a Poňka P. (1995) : In vitro antioxidant properties of the chelators pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and some of its analogs. *Redox Report* **1**: 373-378

Sumi-Ichinose C., Ichinose H., Takahashi E., Hori T. a Nagatsu T. (1992) : Molecular cloning of genomic DNA and chromosomal assignment of the gene for human aromatic L-amino acid decarboxylase, the enzyme for catecholamine and serotonin biosynthesis. *Biochemistry* **31**, 2229-2238.

Swoboda K. J., Saul J. P., Mc Kenna C. E., Speller N. B. a Hyland K. (2003): Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. Overview of clinical features and outcomes. *Ann. Neurol.* **54** (suppl 6), 49-55

Šimůnek T., Klimentová I., Kaplanová J., Štěřba M., Mazurová Y., Adamcová M., Hrdina R., Geršl V. a Poňka P. (2005) : Study of daunorubicin cardiotoxicity prevention with pyridoxal isonicotinoyl hydrazone in rabbits. *Pharmacol. Res.* **51**, 223-31

Tsafack A., Loyevsky M., Poňka P. a Cabanthik Z. I. (1996) : Mode of action of iron (III) chelators as antimalarials. Potentiation of desferal action by benzoyl and isonicotinoyl hydrazone derivatives. *J. Lab. Clin. Med.* **127**, 574-82

Vogel W. H., McFarland H. a Prince L. N. (1970) : Decarboxylation of dopa in various human adult and fetal tissues. *Biochem. Pharmac.* **19**, 618-620

Watanabe H., Imaizumi M., Ojika T., Abe T., Hida T. a Kato K. (1994) : Evaluation of biological characteristics of lung cancer by the human 28 kDa vitamin D-dependent calcium binding protein, calbindin-D28k. *Jap. J. Clin. Oncol.* **24**, 121-127

Weissbach H., Lovenberg W. a Udenfriend S. (1960) : Enzymic decarboxylation of α -methyl amino acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **3**, 225-227.

Yamada R. H., Wakabayashi Y. a Iwashima A. (1984) : Inhibition of serum aspartate aminotransferase induced by isoniazid administration in mice. *Acta Vitaminol. Enzymol.* **6**, 289-93

Yun Z., Takagi M., Yoshida T. (2003) : Combined addition of glutathione and iron chelators for decrease of intracellular level of reactive oxygen species and death of chinese hamster ovary cells. *J. Biosci. Bioeng.* **95**, 124-7

Zhu M.-Y., Juorio A. V., Paterson I. A. a Boulton A. A. (1994) : Regulation of aromatic L-amino acid decarboxylase in rat striatal synaptosomes: Effects of dopamine receptor agonists and antagonists. *Br. J. Pharmac.* **112**, 23-30

Brenda, internetová databáze <http://brenda.bc.uni-koeln.de/>, květen 2006