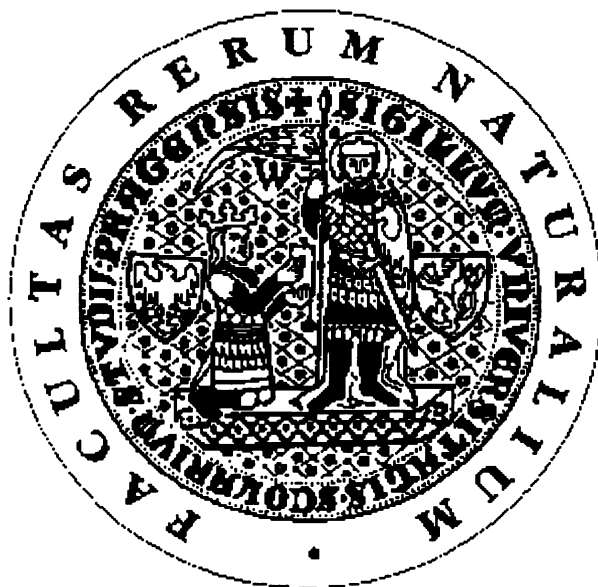


Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie



**Možnosti studia kinetiky redukce cytochromu P450
na spektrofotometru s diodovým polem -
experimentální "validace přístroje"**

Bakalářská práce
studijního oboru Klinická a toxikologická analýza

Monika Holušová
školitel: Doc. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Praha 2007

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně na katedře biochemie PŘF UK, pod vedením svého školitele Doc. RNDr. Jiřího Hudečka, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne.....⁶~~7~~.....2007

Holubová Aneta
.....
podpis

Ráda bych poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc. za vedení a ochotnou pomoc během mého vypracovávání bakalářské práce.

1. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	4
2. ÚVOD DO PROBLEMATIKY	6
2.1. Cytochrom P450.....	6
2.1.1. Struktura cytochromů P-450	7
2.1.2. Spinové formy	9
2.1.3. Funkce P-450.....	10
2.1.3.1. Biotransformace léčiv a jiných xenobiotik.....	10
2.1.3.2. Katalytický cyklus P-450	12
2.1.4. Vazba CO cytochromem P-450.....	16
2.1.4.1. Oxid uhelnatý v biochemii	16
2.1.4.2. Kinetika asociace a disociace P-450 s CO	17
2.1.5. Spektroskopické vlastnosti P-450	20
2.2. Spektrofotometry používané v absorpční spektroskopii	21
2.2.1. Tradiční spektrofotometr	21
2.2.2. Spektrofotometr s diodovým polem	22
2.3. Methylenová zeleň	25
2.3.1. Aerobní oxidace D-glukosy methylenovou zelení v alkalickém prostředí.....	26
3. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	28
4. METODY POKUSU	29
4.1. Použité přístroje.....	29
4.2. Použité programy	29
4.3. Použité chemikálie	29
5. POSTUP PRÁCE	30
5.1. Nastavení programu	30
5.2. Měření kinetiky	31
6. VÝSLEDKY	32
6.1. Vyhodnocení kinetických dat.....	32
6.2. Rychlost reakcí	34
7. DISKUSE	36
8. ZÁVĚR.....	37
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	38

1. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CPR	NADPH(NADH):cytochrom P450 reduktasa (FMN, FAD)
Cys	cystein
cytb5	cytochrom b 5
EPR	elektronová paramagnetická rezonance
ER	endoplazmatické retikulum
FAD	flavinadenindinukleotid
FdR	ferredoxinreduktasa (FAD)
Fdx	ferredoxin (Fe-S protein)
Fdx ^a	Fdx obsahující Fe-S protein typu: 2Fe-2S, 3Fe-4S, 4Fe-4S, 3Fe-4S/4Fe-4S
Fldx	flavodoxin (FMN)
FMN	flavinadeninmononukleotid
HO	hem oxygenasa (E.C. 1:14:99:3)
MFO	system monooxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxygenases)
MG	methylenová zeleň
NAD ⁺ (NADH)	nikotinamidadenindinukleotid (redukovaný)
NADP ⁺ (NADPH)	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukovaný)
OFOR	2-oxokyselina:ferredoxin oxidoreduktasa (thiaminpyrofosfát, 4Fe-4S protein)
P-450	cytochrom P450
P-450 _{CAM}	P-450 izolovaný z <i>Pseudomonas putida</i>
P-450 _{LM}	mikrosomální P-450 z jater králíka
P-450 SCC a P-450 11β	mitochondriální P-450 izolovaný z kůry nadledvinek
PFOR	"phthalate-family oxygenase reductase" (FMN, 2Fe-2S protein)
Thr	threonin

Cytochromy P-450 jsou důležitou skupinou enzymů. Podílejí se na detoxikaci řady xenobiotik (léčiv a environmentálních polutantů), jiné látky mohou být jejich působením metabolicky aktivovány (chemické kancerogeny). V neposlední řadě právě proto patří tyto enzymy k velmi často studovaným systémům.

Jedním z nejběžnějších a nejčastějších úkonů při studiu cytochromu P-450 patří stanovení jeho koncentrace. Jednou z možností je stanovení enzymové aktivity pomocí specifických substrátů, nevýhodou takového přístupu může často být právě jeho specifická, daná absencí „univerzálního substrátu“ pro všechny cytochromy P-450.

Proto se v laboratoři častěji ke stanovení „celkového P-450“ využívá spektroskopických vlastností komplexu redukovaného cytochromu P-450 s oxidem uhelnatým. Tento komplex má charakteristické a význačné absorpční maximum při 450 nm. Zkušenost ovšem ukazuje, že vznik zmíněného komplexu (resp. redukce cytochromu P-450) není vždy stejně rychlý, a že kinetika jeho vzniku může záviset např. na pořadí přidávání reaktantů (redukce, CO), resp. na přítomnosti substrátů či inhibitoru v aktivním místě cytochromu P-450.

Protokoly pro stanovení P-450, používané v biochemických laboratořích, tento fakt zatím většinou ignorují. Jedním z důvodů je i to, že v reálných biologických vzorcích (např. mikrosomálních), v nichž stanovení cytochromu P-450 probíhá, se vedle zmíněné kinetiky tvorby CO aduktu mohou uplatnit i další časově závislé děje (např. sedimentace mikrosomů a s ní spojená změna rozptylujícího pozadí), které je na „klasickém“ skanujícím přístroji obtížné odlišit. V principu by tyto vlivy mělo být možné „odfiltrovat“ při použití spektrofotometru z detektorem typu diodového pole, který umožňuje ve velmi krátkých časových intervalech proměřit celé spektrum vzorku.

Tématem této bakalářské práce bylo ověřit, nakolik by obdobná měření byla realizovatelná na přístroji HP 8453, resp. zvládnout použití přídatného softwarového balíku „Biochemical Analysis“, který by měl podobné měření umožnit, a který byl k přístroji před nedávnem zakoupen.

2. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

2.1. Cytochrom P450

Historie cytochromu P450 sahá do poloviny 50. let minulého století. Studie Axelroda a Brodiho (1955) odhalily existenci enzymatického systému v endoplasmatickém retikulu jater, který byl schopen katalyzovat konverzi různých léčiv a aromatických směsí v polárnější produkty v přítomnosti NADPH, Mg^{2+} a glukosa-6-fosfát dehydrogenasy. Ve stejném roce poskytli Mason a Hayaishi důkaz o existenci enzymů schopných katalyzovat přenos kyslíku na substráty.

O tři roky později (1958) objevili Garfinkel a Klingenberg pigmenty vázající CO v mikrosomech jater prasat a potkanů, respektive ukázali, že tyto pigmenty jsou redukovatelné NADPH nebo dithioničitanem. Byli první, kdo popsali, že tento pigment jako komplex s CO vykazuje typické absorpční maximum při 450 nm. Nebyli ale schopní identifikovat hemový charakter pigmentu.

Hemoproteinovou povahu pigmentu vázajícího CO dokázali Omura a Sato v roce 1964. Identifikovali jej jako cytochrom b s atypickým **Soretovým maximem komplexu s CO při 450 nm**, a na základě toho jej pojmenovali **cytochrom P-450**.

V roce 1963 bylo experimentálně podloženo, že tento enzym je ve skutečnosti **terminální oxidasou v monooxygenasovém systému**.

Porovnáním různých thiolových komplexů odlišných hemoproteinů Bayer (v roce 1969) a Hill (v roce 1970) našli velkou podobnost jejich EPR spekter se spektry cytochromu P-450 a odvodili z toho, že jeden z axiálních ligandů P-450 je thiolátová skupina.⁽¹⁾

Cytochromy P-450 jsou v organismu zodpovědné především za reakce I. fáze biotransformace chemických látek, vedoucí k jejich detoxikaci a po reakcích II. fáze biotransformace k jejich eliminaci z buněk a exkreci z organismu. Jsou to enzymy, které katalyzují oxidační, peroxidační a redukční reakce začleněné do metabolické transformace léčiv, environmentálních chemikálií (sloučenin dostávajících se do životního prostředí především lidskou činností), ale i látek přírodních či endogenních.⁽²⁾

Enzymy P-450 jsou hlavními katalyzátory oxidace xenobiotik, tudíž jsou středem zájmu vědců v oblastech toxikologie, metabolismu drog a farmakologie.⁽³⁾

Pro studium hemových proteinů se používá oxidu uhelnatého jako nepřírodního ligandu hemového železa, nebo oxidu dusnatého či kyslíku jako přírodních ligandů. Tyto malé molekuly (oproti aminokyselinám nebo hemu) slouží jako malé sondy, které je díky specifickým absorpčním spektrům možno sledovat relativně jednoduše. Každá změna v poloze vůči pyrolovému jádru vede k odlišnému spektru.⁽⁴⁾

Dnes je známo okolo 1000 různých genů pro enzymové formy P-450. Na základě podobností aminokyselinových sekvencí jsou P-450 rozděleny na rodiny (sekvenční homologie větší než 40%), podrodiny (sekvenční homologie větší než 60%) a jednotlivé P-450.

Superrodinu cytochromů P-450 označuje zkratka CYP, za ní se uvádí číslo označující rodinu, dále příp. písmeno označující příslušnost k dané podrodině a nakonec číslo jednotlivého enzymu; například CYP1A1, CYP1A2, CYP2B1, Protože počet dosud objevených a pojmenovaných P-450 není konečný, byla zřízena oficiální webová stránka standardizované nomenklatury P-450:

<http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>

Jsou zde neustále doplňovány nově objevené formy P-450 všech živočišných druhů.^(5,6)

Počet dosud známých genů P-450 v lidském těle je 57⁽⁷⁾, pro srovnání: v bakterii *Mycobacterium tuberculosis* je jich okolo 20, v rostlině *Arabidopsis thaliana* jich je popsáno 286, ale třeba kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* má jen 3 a bakterie *Escherichia coli* nemá žádné.⁽³⁾

Cytochromy P450 lze zhruba rozdělit:

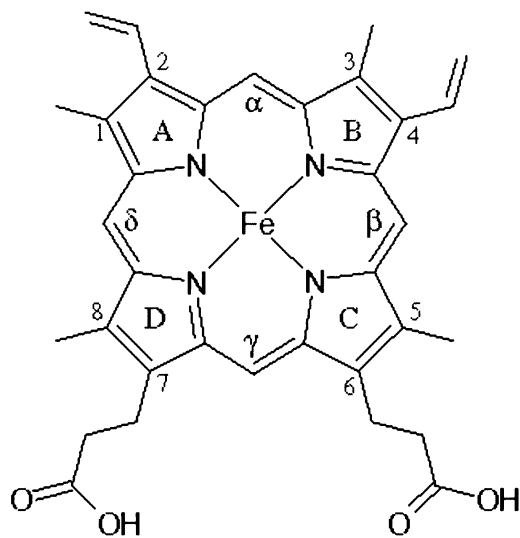
- membránově vázané (mikrosomální a mitochondriální)
- volné (součástí cytoplasmy)

2.1.1. Struktura cytochromů P-450

První trojrozměrná struktura P-450, a to bakteriálního CYP 101 (P-450_{CAM}), byla popsána Poulousem v roce 1987.⁽⁸⁾

P-450 patří mezi hemoproteiny, tudíž jeho **prostetickou skupinou je hem**, konkrétně **typu b** (obr.1).

Hem b je obvykle v proteinu ukotven pomocí axiální ligace jednoho nebo dvou aminokyselinových postranních řetězců na atom železa, v případě cytochromů P450 jde o jednu axiální vazbu, a to na thiolátovou síru z cysteinového aminokyselinového zbytku. Orientace hemové skupiny vůči samotnému proteinu je dána ne vazebnými interakcemi vinylových a propionátových postranní řetězců hemu s molekulou apoproteinu.⁽⁹⁾



Obrázek 1 Hem b⁽¹⁰⁾

Všechny struktury P-450 mají obdobnou sekundární strukturu, jejímiž základními částmi jsou α -helixy (označené A-L). Helixy I a L jsou v kontaktu s hemem. Zbytky v helixech B a I jsou také v kontaktu se substrátem a cílené mutace v těchto místech mohou mít dramatické výsledky. Dalším místem, které kontaktuje substrát, je helix F. Mutace na tomto helixu také mohou ovlivnit selektivnost katalýzy.

Nejvíce zachovávanou částí P-450 je oblast obsahující cystein, který působí jako thiolový ligand hemového železa. Tato sekvence je používána jako identifikátor P-450 v genových bankách.⁽³⁾ Další vysoce zachovaným zbytkem je threonin 252⁽¹¹⁾, u kterého se předpokládá rozmanitost funkcí. Thr může být například donorem protonu pro komplex $\text{Fe}^{2+}\text{O}_2^-$ pro ulehčení štěpení vazby O-O.⁽³⁾

2.1.2. Spinové formy ⁽⁶⁾

Hemové železo v P-450 se jakožto přechodný kov s částečně zaplněnými d-orbitaly může vyskytovat v závislosti na symetrii a síle ligandového pole v různých spinových formách. Základní charakteristiky dvou nejběžnějších forem shrnuje tabulka 1:

Tabulka 1 Spinové formy P-450 (převzato z ⁶)

Charakteristika	Forma		
		nízkospinová	vysokospinová
Spin	Fe ²⁺	0	2
	Fe ³⁺	1/2	5/2
Iontový poloměr	Fe ²⁺	0,61	0,77
	Fe ³⁺	0,55	0,64
Koordinační stav Fe		hexakoordinované	pentakoordinované
Ion Fe se nachází...		v rovině kruhu protoporfyrinu IX	mimo rovinu porfyrinového skeletu
Maximum absorpce (Soretův pás)		~ 418 nm	~ 390 nm

Ve většině případů jsou v molekulách P-450 v rovnováze různé spinové stavy. Tato rovnováha je ovlivněna různými faktory (teplota, rozpouštědlo), ale zejména povahou **axiálního ligandu** a rozložením náboje v okolí centrálního Fe. V klidovém stavu je obvykle většina (90%) molekul P-450 v nízkospinové formě. Poměr obou spinových forem se značně mění při **vazbě substrátu** do vazebného místa, kdy dochází k vytlačení šestého ligandu a nárůstu obsahu vysokospinové formy.

2.1.3. Funkce P-450

2.1.3.1. Biotransformace léčiv a jiných xenobiotik⁽¹⁾

P-450 hraje důležitou roli v biotransformaci mnoha xenobiotik, zahrnující léčiva, mutageny a karcinogeny stejně jako látky endogenní povahy, jako jsou steroidy a prostaglandiny.

Enzymový systém P-450 katalyzuje přeměnu lipofilních složek na více hydrofilní metabolity pro umožnění rychlejšího vyloučení ledvinami.

V mnoha případech se vytvoří toxické metabolity jako epoxidy a radikály. Mnoho z těchto meziproductů má mutagenní a (nebo) karcinogenní vlastnosti. V některých případech se vytvoří farmakodynamicky aktivní složky z neaktivních prekurzorů.

Biotransformací látek jsou vytvářeny více hydrofilní metabolity, což umožňuje rychlejší vyloučení ledvinami. Bez této přeměny by doba vyloučení lipofilních drog byla mnohonásobně delší v důsledku tabulární reabsorpce a enterohepatické cirkulace. Tyto vztahy jsou pro některé hypnotika s různou hydrofobitou ukázány v tabulce č.2.

Tabulka 2 Teoretické a skutečné poločasy vyloučení některých léčiv v organismu v závislosti na jejich rozpustnosti v lipidech (převzato z ¹⁾)

Droga	Rozpustnost v chloroformu [%]	Poločas vyloučení	
		Teoretický – bez metabolismu	Skutečný – s metabolismem
Barbital	40	55-75 hodin	55-75 hodin
Phenobarbital	60	10-20 dní	3-6 dní
Pentobarbital	100	2-5 měsíců	11-70 hodin
Glutethimide	100	2-5 měsíců	7-15 hodin
Hexobarbital	100	2-5 měsíců	5-6 hodin

Obecně jsou deriváty vytvořené biotransformací farmakodynamicky méně efektivní než původní složky (→ detoxifikace). Ale na druhé straně se z bezvýznamných látek mohou náhle stát biologicky aktivní metabolity (→ toxifikace). Je prokázáno, že mnoho metabolitů má cytotoxické, teratogenní, mutagenní nebo karcinogenní vlastnosti (viz tabulka 3 na další straně).

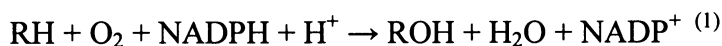
Tabulka 3 Příklady změn biologických aktivit léčiv a jiných látek enzymatickou biotransformací (podle ¹⁾)

Složka	Metabolit
<i>Metabolity jsou méně účinné než původní složka</i>	
barbituráty	hydroxybarbituráty
<i>Metabolity a původní složky jsou stejně účinné</i>	
aminopyrin	antipyrim
kodein	morfin
diazepam	oxazepam
<i>Metabolity jsou účinné, původní složky ne</i>	
parathion	paraaxon
prontosil	sulfanilamide
<i>Metabolity jsou toxické</i>	
benzo(a)pyren	aren oxid
vinylchlorid	epoxid
aflatoxin	furan epoxid

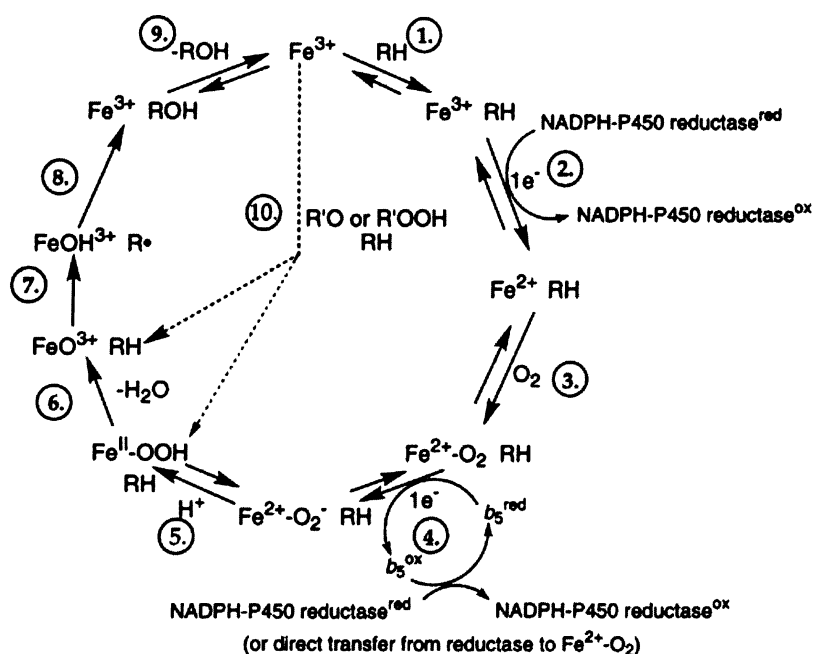
Většina experimentů byla prováděna s jaterním MFO. Přestože hlavním orgánem pro biotransformaci xenobiotik jsou játra, $\frac{1}{3}$ biotransformační aktivity probíhá v jiných orgánech, jako jsou plíce, ledviny, kůže a střeva. Mimoto, P-450 a jeho příslušné enzymatické aktivity byly pozorovány také v průdušnici, pankreatu, pankreatické trubičce, tlustém střevě, mozku, aortě, kostní dřeni, monocytech a lymfocytech, trombocytech, chámovodu a placentě. P-450 z kůry nadledvinek, vaječnicků a varlat přeměňuje steroidní hormony a jejich prekurzory.

2.1.3.2. Katalytický cyklus P-450

Souhrnné schéma reakce katalyzované cytochromem P-450 bylo poprvé postulováno Masonem v roce 1957:



Od té doby bylo prozkoumání reakčního schématu cytochromu P450 věnováno mnoho experimentálních i teoretických studií a současné představy o reakčním cyklu a jeho dílčích reakcích jsou shrnuty na obrázku 2.



Obrázek 2 Celkové schéma katalytického cyklu P-450 ⁽³⁾

V klidovém stavu (resting state) je železo v cytochromu P-450 formálně trojmocné. V prvním reakčním kroku dochází k **vazbě substrátu** na enzym, někde v blízkosti distální oblasti hemu. Tento krok může i nemusí zahrnovat změnu spinového stavu železa. První krok může usnadňovat krok druhý (záleží na typu P-450); krok 1 je znázorněn před krokem 2, protože je rychlejší. Elektronů přecházejí z NADPH prostřednictvím flavoproteinu NADPH-P-450 reductasy. Proud elektronů jde z prosthetické skupiny FAD na FMN reductasy a odtud na P-450.

Redukované P-450 (formálně dvojmocné železo) váže O_2 (krok 3). Tento komplex je nestabilní a může se rozštěpit za vzniku Fe^{3+} a anionu superoxidu $O_2^{\cdot-}$. Komplex $Fe^{2+} \cdot O_2$ byl pozorován na mikrosomálním P-450, ale kromě tohoto kroku je charakter meziproduktů málo jistý. Druhý elektron vstupuje do systému ve čtvrtém kroku. Může pocházet z NADPH-P-450 reduktasy, nebo v některých případech z cytochromu b_5 .

V pátém kroku se váže **proton**. Vazba O-O je rozštěpená v kroku 6 za doprovodu tvorby H_2O a FeO^{3+} . Tento vysokovalenční komplex může být také psán jako $Fe^V=O$, ale přesná elektronická konfigurace není známa.

V sedmém kroku tento komplex s nedostatkem elektronů vytáhne atom vodíku nebo elektron ze substrátu. Následné zhroucení meziproduktu nebo páru meziproduktů v kroku 8 vytvoří produkt. V kroku 9 je **produkt oddělen** od enzymu.⁽³⁾

Zdroj elektronů je závislý na typu P-450. V mitochondriálních a většině bakteriálních P-450 je elektron přenášen z NADH nebo NADPH na ferredoxin pomocí FAD dependentní reduktasy. Ale v mikrosomálních cytochromech je elektron přenášen z NADPH pomocí FAD- a FMN- flavoproteinů, cytochromu P-450 oxidoreduktasy, bez přítomnosti ferredoxinu. Někdy může být také donorem druhého elektronu cytochrom b_5 .⁽⁴⁾

Tabulka 4 Třídy systémů P450 klasifikované podle topologie komponent zapojených v přenosu elektronu na enzym P450 (převzato z ¹²⁾)

Třída	Zdroj	Řetězec přenosu elektronu	Lokalizace / pozn.
I.	bakterie	NAD(P)H→FdR→Fdx ^a →P450	cytosol, rozpustné
	mitochondrie	NADPH→FdR→Fdx→P450	P450: vnitřní mitochondriální membrána FdR perif. membr. Fdx: mitoch. matrix rozpustné
II.	bakterie	NADH→CPR→P450	cytosol, rozpustné <i>Streptomyces carbophilus</i>
	mitochondrie A	NADPH→CPR→P450	ER, integr. memb.
	mitochondrie B	NADPH→CPR→cytb5→P450	ER, integr. memb.
	mitochondrie C	NADH→cytb5Red→cytb5→P450	ER, integr. memb.
III.	bakterie	NAD(P)H→FdR→Fldx→P450	cytosol, rozpustné <i>Citrobacter braakii</i>
IV.	bakterie	pyruvát, CoA→ OFOR→Fdx→P450	cytosol, rozpustné <i>Sulfolobus tokadaii</i>
V.	bakterie	NADH→FdR→Fdx-P450	cytosol, rozpustné <i>Methylococcus capsulatus</i>
VI.	bakterie	NAD(P)H→FdR→Fldx-P450	cytosol, rozpustné <i>Rhodococcus rhodochrous</i> (druh 11Y)
VII.	bakterie	NADH→PFOR-P450	cytosol, rozpustné <i>Rhodococcus sp.</i> (druh NCIMB 9784) <i>Burkholderia sp.</i> <i>Ralstonia metallidurans</i>

VIII.	bakterie, houby	NADPH→CPR-P450	cytosol, rozpustné <i>Bacillus megaterium</i> <i>Fusarium oxysporum</i>
IX.	NADH-závislé houby	NADH→P450	cytosol, rozpustné <i>Fusarium oxysporum</i>
X.	rostliny, živočichové	P450	ER, membránově vázané

Vysvětlivky:

Fdx – ferredoxin (Fe-S protein)

FdR – ferredoxinreduktasa (FAD)

Fldx – flavodoxin (FMN)

CPR – NADPH(NADH):cytochrom P450 reduktasa (FMN, FAD)

OFOR – 2-oxokyselina:ferredoxin oxidoreduktasa (thiaminpyrofosfát,
4Fe-4S protein)

PFOR – "phthalate-family oxygenase reductase" (FMN, 2Fe-2S protein)

Fdx^a – Fdx obsahující Fe-S protein typu: 2Fe-2S, 3Fe-4S, 4Fe-4S, 3Fe-4S/4Fe-4S

cytb5 – cytochrom b 5

2.1.4. Vazba CO cytochromem P-450

2.1.4.1. Oxid uhelnatý v biochemii ⁽¹³⁾

Oxid uhelnatý (CO), produkt procesů organické oxidace, vzniká in vivo během buněčných metabolismů, nejčastěji degradací hemu. CO se váže na hemové železo většiny hemoproteinů.

První objevy v druhé polovině 18.století označily CO jako toxickou molekulu, schopnou vytěsnit molekulu kyslíku v krvi a tím způsobit tkáňovou hypoxii. CO se tvoří oxidací nebo spalování organických látek jako jsou dřevo, tabák, uhlí, koks a zemní plyn. Některé fyzikální charakteristiky tohoto bezbarvého plynu bez zápachu jsou ukázány v tabulce 5.

Tabulka 5 Fyzikální vlastnosti oxidu uhelnatého (převzato z ¹³)

Fyzikální vlastnost	Hodnota
Molekulární váha	28,01
Bod varu	-191,5°C
Bod tání	-205°C
Bod samovznícení	606°C
Rozpustnost (H ₂ O)	3,3 ml/100 ml (0°C) 2,3 ml/100 ml (20°C)
Specifická váha	1,250 g/l (0°C)
Převodní faktor koncentrace	1 ppm = 1,25 mg/m ⁻³ při 25°C

Buňky a tkáně produkují významné množství CO jako odštěpený produkt buněčných metabolismů, hlavně odbouráváním hemu, které je katalyzované mikrosomální hemovou oxygenasou (HO; E.C. 1:14:99:3). Hem slouží jako důležitý kofaktor v proteinech transportujících kyslík (hemoglobin, myoglobin) a v enzymech zapojených v důležitých buněčných procesech jako jsou dýchání, záněty nebo metabolismus léčiv.

Klinické příznaky otravy oxidem uhelnatým zahrnují závrať, těžké dýchání, bolest hlavy. S 245-krát vyšší afinitou než O₂, CO konkuruje kyslíku při vazbě na železo hemoglobinu a tvoří karboxyhemoglobin (Co-Hb).

CO se váže (a inhibuje aktivitu) také na další hemoproteiny jako jsou cytochrom c-oxidasa a cytochrom P-450.

Ve srovnání s podobným plynem oxidem dusnatým je CO relativně inertní. CO a NO sdílí důležitou podobnost v biochemické reaktivitě: oba vystupují jako hemové ligandy a tvoří komplexy s hemoproteiny v centrálním železu atomu hemu. CO se váže jen na Fe^{2+} , zatímco NO i na Fe^{3+} . Jako následek vazby na hem ovlivňuje intracelulární CO aktivitu hemoproteinů. S P-450 tvoří CO komplex s A_{max} při 450 nm, jehož vznik vždy vede k inhibici enzymatické aktivity.

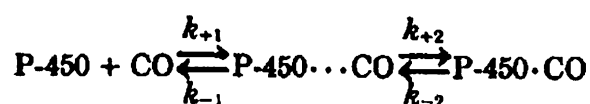
2.1.4.2. Kinetika asociace a disociace P-450 s CO ⁽¹⁴⁾

Vazba CO slouží jako experimentálně vhodný model pro fyziologicky zajímavější ligand, kyslík, protože CO po navázání nepodléhá redukcí. Takto je jednodušší zkoumat mechanismus vazby ligandu na atom železa v hemu.⁽¹⁴⁾ CO je rovněž vázán do 6. pozice komplexu železa a tam působí jako kompetitivní inhibitor enzymového systému.⁽¹⁾

Kinetika vazby CO je zajímavá, neboť tento ligand byl využit v předcházejících studiích týkajících se kinetiky a mechanismu redukce Fe^{3+} cytochromu P-450 pomocí NADPH zprostředkované NADPH-cytochrom P-450 reduktasou. V těchto experimentech slouží CO jako „chytač“ redukovaného cytochromu a pro vyjádření rychlosti redukční reakce.

Jsou popsány dva mechanismy interakce mezi proteinem a ligandem:

- dvoustavový mechanismus, ve kterém proteiny existují s nedostatkem ligandu ve dvou konformačních stavech s rozdílnou afinitou k ligandu. Tento mechanismus určuje, že k_s vzrůstá s klesající koncentrací ligandu.
- mechanismus vazby ligandu, ve kterém je počáteční asociace ligandu následována isomerizací nebo konformačními změnami, ve kterých dochází ke zvýšení afinity proteinu k ligandu, jako je ukázáno níže:

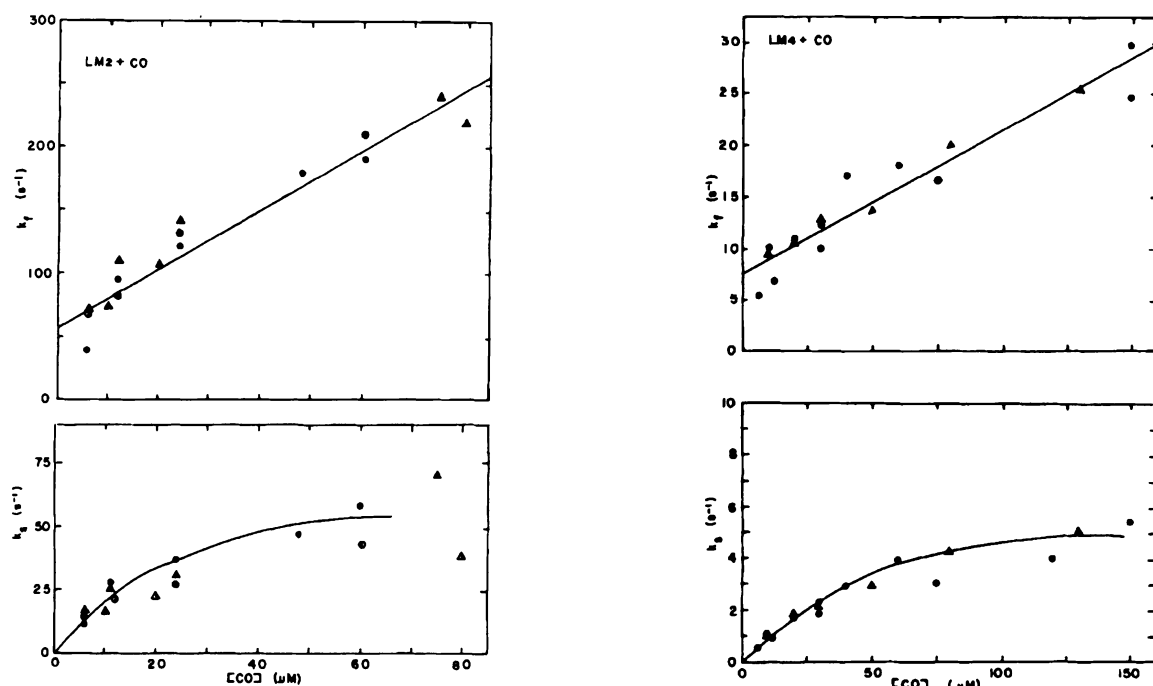


Obrázek 3 Dvofázový mechanismus vazby CO na P-450 (převzato z ¹⁴⁾)

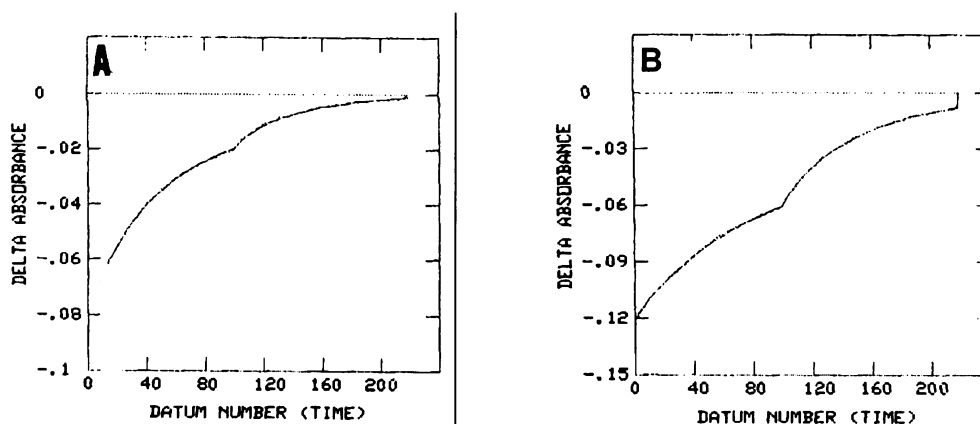
kde P-450...CO představuje meziprodukt s menší CO afinitou než rovnovážný komplex P-450.CO.

KINETIKA ASOCIACE CO

Vazba CO na P-450 probíhá kinetikou pseudo-prvního řádu. Časový průběh vazby ligandu (měřeno při vlnových délkách blízko 450 nm) může být rozdělen na dvě relativně rychlé fáze exponenciálně závislé na koncentraci CO s rychlostními konstantami k_f a k_s a jednu nebo dvě pomalejší fáze. Rychlostní konstanta k_s je hyperbolickou funkcí koncentrace CO a k_f je lineární funkce [CO].



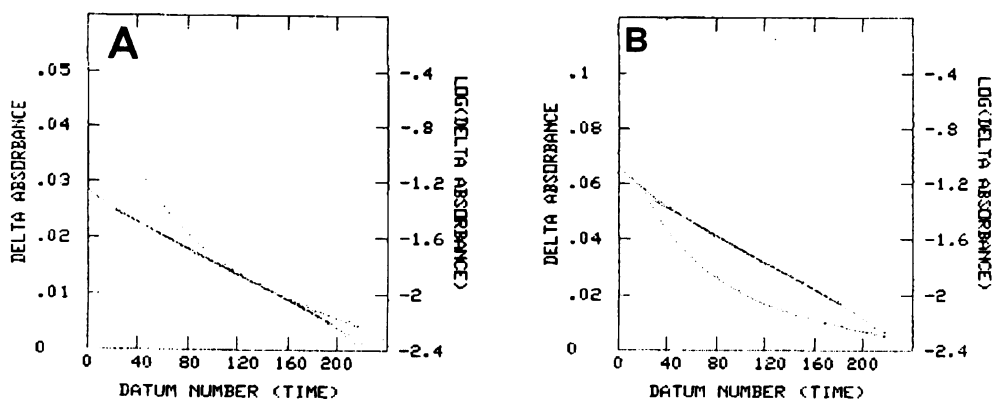
Obrázek 4 Závislosti k_f a k_s na [CO], vlevo pro P-450_{LM2} a vpravo pro P-450_{LM4} (převzato z¹⁴)



Obrázek 5 Křivky vazby CO na rozpuštěný P-450_{LM2} (A) a P-450_{LM4} (B, podle¹⁴)
Obr. A: Prvních 100 bodů představuje 20 ms a zbývajících 120 bodů značí 80 ms
Obr. B: Prvních 100 bodů představuje 0,2 s a zbývajících 120 bodů 1,2 s

KINETIKA DISOCIACE CO

Rychlost disociace CO z jeho komplexu s P-450_{LM} byla určena nahrazením za NO. Reakce výměny ligandu, pro kterou je rychlost-limitujícím krokem disociace CO, umožňuje určení k_{-2} . Experimenty jsou znázorněny na obr. 6. Semilogaritmický diagram v obou případech odhaluje mírně heterogenní reakci disociace ligandu.



Obrázek 6 Kinetiky disociace CO pro **A**, P-450_{LM2} a **B**, P-450_{LM4}. Zakřivená čára znázorňuje prvotní data (levá osa) a rovná čára znázorňuje kinetiku 1. řádu (pravá osa). (podle ¹⁴) 220 bodů představuje 22 s na obr. A a 44 s na obr. B

Vazba CO je vratná rovněž fotochemickou reaktivací.⁽¹⁾

Tabulka 6 Kinetické a rovnovážné konstanty pro vazbu CO na P-450_{LM}⁽¹⁴⁾

	k_{+1} [M ⁻¹ s ⁻¹]	k_{-1} [s ⁻¹]	k_{+2} [s ⁻¹]	k_{-2} [s ⁻¹]	K_1^a [μM]	K_0^b [μM]
P-450 _{LM2}	$3,2 \cdot 10^6$	18,2	53	0,11	5,6	0,01
P-450 _{LM4}	$1,6 \cdot 10^5$	3,6	5,6	0,055	22,5	0,24

^a $K_{-1} = k_{-1}/k_{+1}$ (disociační konstanta meziproductů)

^b $K_0 = k_{-1} \cdot k_{-2}/k_{+1} \cdot k_{+2}$ (celková disociační konstanta)

P-450_{LM2} je cytochrom P-450 z králíčích jater indukovaný phenobarbitalem a P-450_{LM4} je také z králíčích jater, ale s 5,6-benzoflavonem. Rovnovážná konstanta vypočtená z rychlostních konstant ukazuje, že cytochromy indukované léčivy mají 23-krát afinitu k CO než cytochromy indukované uhlovodíky.

Krystalografická data hemoglobinu a myoglobinu ukazují, že přístup ligandu je omezen distálním histidinem a postranními řetězci jiných aminokyselin, které ční do hemové kapsy.

Infračervené studia vazby CO na P-450_{LM} naznačily spíše ohnutou vazbu Fe = C = O než lineární.

2.1.5. Spektroskopické vlastnosti P-450

Většina spektrálních vlastností hemoproteinů je spojenou s jejich prosthetickou skupinou, hemem (v případě P450 jde tedy o ferroporofyrin IX). Nicméně při porovnání vlastností P-450 s ostatními hemoproteiny vykazuje P-450 spektrální zvláštnosti, například posun Soretova pásu komplexu CO s P-450 na 450 nm. Příčinou těchto zvláštností jsou specifické interakce prosthetické skupiny s apoproteinem. Rozdílné sekvence aminokyselin mají za následek charakteristickou strukturu proteinu a tedy také specifické interakce aminokyselinových zbytků s prosthetickou skupinou v tzv. hemové kapse.⁽¹⁾

Vazba CO, O₂ a jiných nízkospinových ligandů na Fe²⁺ P-450 je doprovázena přechodem z vysokospinového stavu do nízkospinového. Komplex CO vykazuje neobvyklé absorpční spektrum s posunem Soretova pásu k 450 nm.⁽¹⁾ Vazba CO-Fe je fotochemicky labilní, spektrum tohoto štěpení je pozorovatelné spektroskopicky.⁽¹⁵⁾

Tabulka 7 Absorpční spektra P-450 a modelových komplexů (převzato z ¹)

Složka	Vlnová délka Soretova pásu [nm]
<i>Fe³⁺ nízko-spinová forma</i>	
P-450 _{CAM}	417
P-450 _{LM2}	418
<i>Fe³⁺ vysoko-spinová forma</i>	
P-450 _{CAM} + kafr	391
P-450 _{LM4}	394
<i>Fe²⁺ vysoko-spinová forma</i>	
P-450 _{CAM}	408
P-450 _{CAM} + kafr	408
P-450 _{LM2}	413
P-450 _{LM4}	411
<i>Fe²⁺ nízko-spinová forma</i>	
P-450 _{CAM} -CO	447
P-450 _{LM2} -CO	451
P-450 _{LM4} -CO	448
P-450 _{CAM} -O ₂	418
P-450 _{LM} -O ₂	420

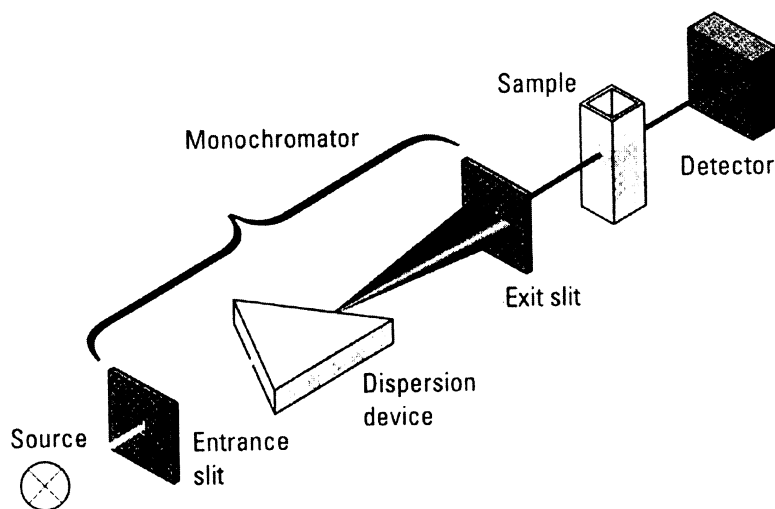
2.2. Spektrofotometry používané v absorpční spektroskopii

2.2.1. Tradiční spektrofotometr

Tradiční spektrofotometry bývají jednopaprskové i dvouprskové. Jednopaprskové spektrofotometry jsou levnější a jejich jednoduchý optický systém je méně náchylný k poruchám.

Obrázek 7 ukazuje schéma běžného jednopaprskového spektrofotometru.

Polychromatické světlo ze zdroje je soustředěno do vstupní štěrbině monochromátoru, který selektivně propouští úzké pásmo světla. Toto světlo dále prochází skrz vzorek do detektoru. Absorbance vzorku je určena z měření intenzity světla došlého do detektoru bez vzorku (blanku) a jejím porovnáním s intenzitou světla došlého do detektoru po průchodu vzorkem. Mnoho spektrofotometrů obsahuje dvě zdrojové lampy, nejčastěji deuteriovou lampu a wolframovou nebo halogenovou lampu, a jako detektory používá buď fotonásobiče, nebo častěji fotodiody.⁽¹⁶⁾

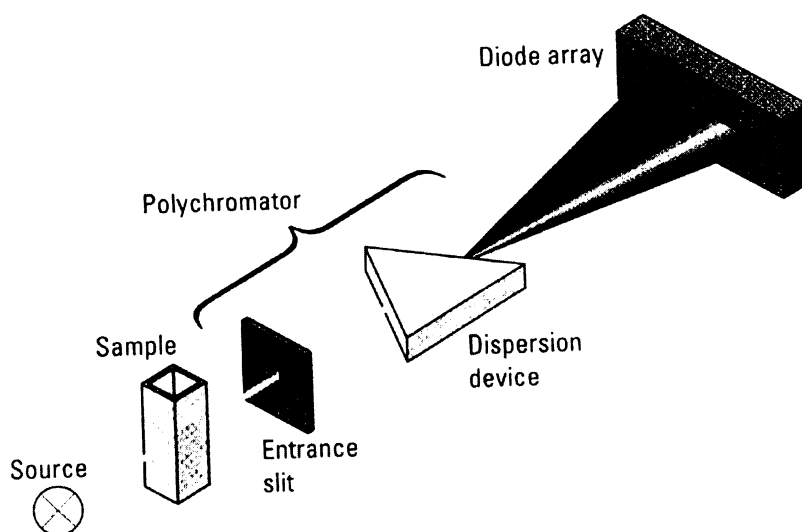


Obrázek 7 Schématické znázornění optického systému běžného jednopaprskového spektrofotometru⁽¹⁶⁾

Toto provedení je vhodné pro měření absorbance v jednotlivém bodu spektra. Je méně vhodné pro měření odlišných směsí za různých vlnových délek, nebo pro obdržení spekter vzorků. K vykonání této úlohy s běžným spektrofotometrem musí být části monochromátoru otočné, což představuje problém mechanické nereprodukovatelnosti v měření. A navíc je získání sériových dat velice pomalý proces.⁽¹⁶⁾

2.2.2. Spektrofotometr s diodovým polem

Obrázek 8 ukazuje schématický diagram spektrofotometru s diodovým polem. Polychromatické světlo ze zdroje prochází vzorkem a je soustředěno do vstupní štěrbině polychromátoru. Polychromátor rozptýlí světlo na diodové pole, na kterém každá dioda měří úzký pruh spektra. Vlnový rozsah světla detekovaný diodou souvisí s velikostí vstupní štěrbině polychromátoru a s velikostí diody. Ve výsledku každá dioda plní tu samou funkci jako výstupní štěrbině monochromátoru.⁽¹⁶⁾



Obrázek 8 Schématické znázornění optického systému spektrofotometru s diodovým polem ⁽¹⁶⁾

Polychromátor (vstupní štěrbině a disperzní zařízení) a diodové pole jsou obsaženy v dílu, kterému se říká spektrograf. Protože vzájemná poloha vzorku a disperzního prvku je obrácená ve srovnání s tradičním uspořádáním spektrofotometru, je toto uspořádání často označováno jako nepřímá optika.

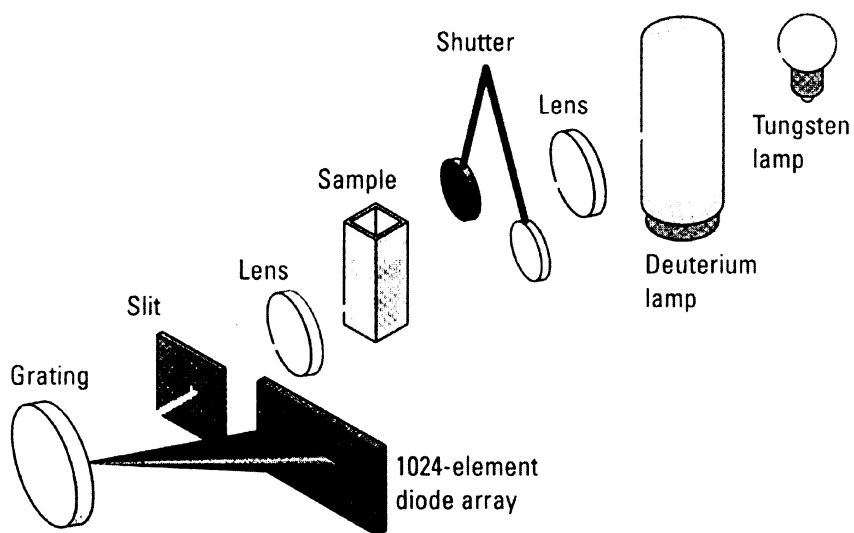
Pro minimalizování možných fotochemických reakcí se používá clona, která zablokuje světlo ze zdroje, dokud měření nemůže být provedeno. Když je zahájeno měření, clona se automaticky otevře a světlo začne procházet vzorkem do diodového pole. Spektrofotometr s diodovým polem je velmi rychlý díky zisku paralelních dat a schopnosti elektronického skenování. Má vynikající reprodukovatelnost vlnové délky a je velmi spolehlivý.⁽¹⁶⁾

Pro spektrofotometry s diodovým polem je především vhodné jedno-paprskové uspořádání, protože spektra jsou získána velmi rychle a protože je minimalizovaný interval mezi měřením blanku a vzorku.⁽¹⁶⁾

Spektrofotometr HP 8453E UV-visible

Obrázek 9 ukazuje moderní optický systém spektrofotometru s diodovým polem, HP 8453.

Toto jedno-paprskové uspořádání má minimální počet optických součástí pro vyšší výkon a efektivitu a obsahuje 1024-bodové diodové pole pro měření v oblasti vlnových délek od 190 do 1100 nm s dobrým rozlišením.⁽¹⁶⁾



Obrázek 9 Optický systém spektrofotometru HP 8453 ⁽¹⁶⁾

Lampy

Světelným zdrojem pro ultrafialovou (UV) oblast vlnových délek je deuteriová lampa s otvorem pro průsvit paprsku ze zdroje. Tato lampa emituje záření o vlnových délkách od 190 nm do 800 nm. Světelným zdrojem pro viditelnou a blízkou infračervenou oblast je halogen-wolframová lampa, která emituje světlo vlnových délek od 370 nm do 1100 nm.

Zdrojová čočka

Zdrojová čočka přijímá světlo u obou lamp a kolimuje jej. Kolimovaný paprsek prochází vzorkem.

Clona

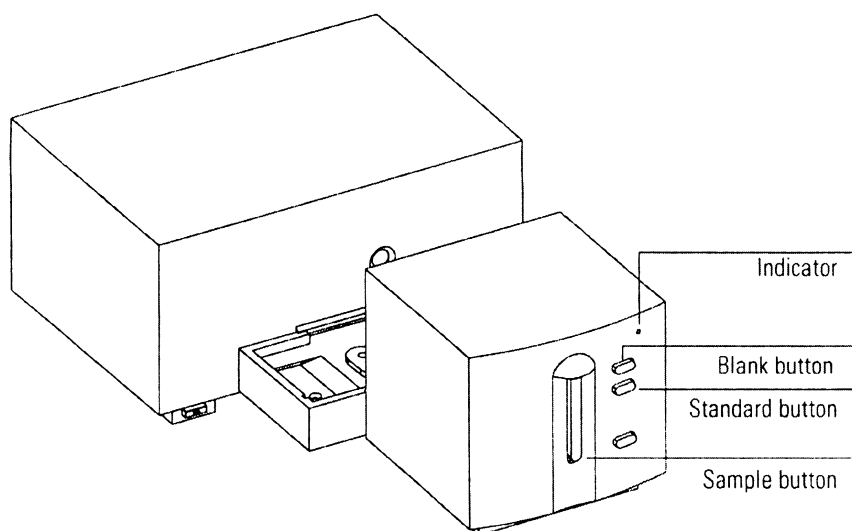
Clona je ovládána elektromechanicky. Otevře se a dovolí světlu projít vzorkem pro měření. Mezi měřeními je zavřena pro omezení expozice vzorku světlem.

Část pro kyvetu se vzorkem

Spektrofotometr má tuto část otevřenou pro jednodušší přístup ke kyvetě. Vzhledem k optickému provedení přístroje není nutný kryt.

Spektrograf

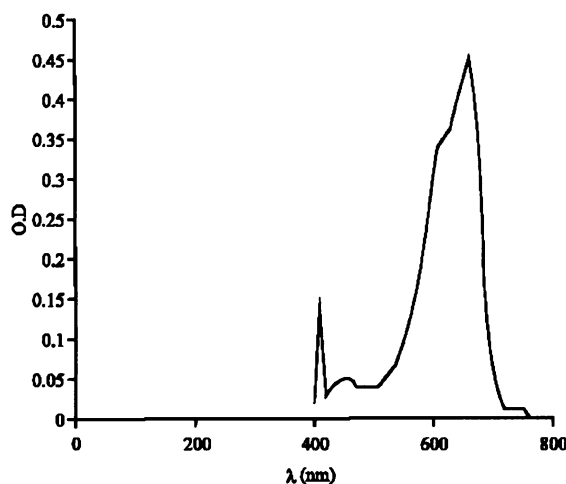
Kryt spektrografu je z keramiky pro minimalizování tepelných efektů. Hlavní části spektrografu jsou čočka, štěrbinina, mřížka a diodové pole. Průměrný vzorkovací interval diodového pole je 0,9 nm při rozsahu vlnových délek od 190 nm do 1100 nm. Přibližná šířka spektrální štěrbininy je 1 nm.⁽¹⁷⁾



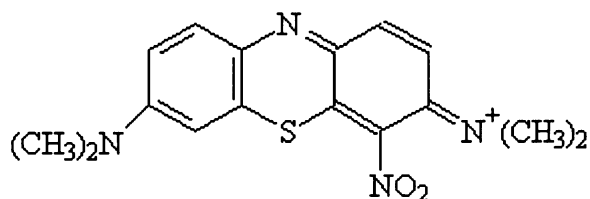
Obrázek 10 Čelní pohled na spektrofotometr HP 8453 ⁽¹⁸⁾

2.3. Methylenová zeleň

Methylenová zeleň, neboli Basic Green 5, je thiazinové barvivo s absorpčním maximem při 657 nm.⁽¹⁹⁾



Obrázek 11 Absorpční spektrum methylenové zeleně ve vodném prostředí (převzato z²⁰⁾



Obrázek 12 Strukturální vzorec MG (podle²¹⁾

MG se používá pro barvení a detekci fosforylovaných proteinů (fosfoserinových a fosfothreoninových zbytků) v SDS-PAGE gelu⁽²²⁾, v mikroskopii pro obarvení jader buněk⁽²³⁾ a barvení DNA.⁽²⁴⁾

Další synonymum pro MG je 3,7-Bis(dimethylamino)-4-nitrophenothiazin-5-ium chlorid.⁽¹⁹⁾

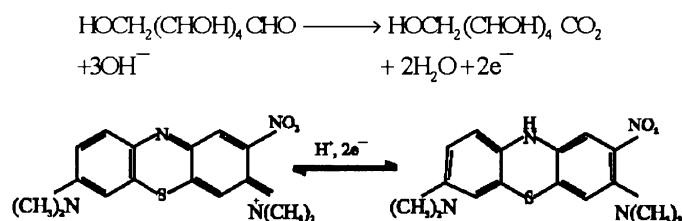
Tabulka 8 Základní charakteristiky MG (podle ^{19, 21})

Methylenová zeleň	
Registrační číslo CAS	2679-01-8
C.I. (color index)	52020
Sumární vzorec	C ₁₆ H ₁₇ N ₄ O ₂ SCl
Molární hmotnost	364,86
Rozpouštědlo	voda
Koncentrace rozpustnosti ve vodě	4,9 mg/l
Rozsah spektra	190-900 nm

2.3.1. Aerobní oxidace D-glukosy methylenovou zelení v alkalickém prostředí ⁽²⁰⁾

Reakce se příliš neliší od známějšího populárního školního experimentu s methylenovou modří (MB).⁽²⁰⁾ Jedná se o velmi jednoduchou reakci: když se zatřepe s lahví obsahující bezbarvou tekutinu, tekutina začne modrat (oxidace MB atmosférickým O₂). Po chvíli stání láhve v klidu barva opět mizí (redukování MB), až se tekutina stane opět bezbarvou.⁽²⁵⁾

V našem provedení je jediný rozdíl je v použitém barvivu, methylenová modř je nahrazena methylenovou zelení. Tyto reakce se měří spektrofotometricky Po přidání glukosy do zeleného roztoku MG v alkalickém prostředí se začne barvivo redukovat odejmutím 1 protonu z glukosy (která tím oxiduje) a roztok zbledne. Po zatřepání směsí se vlivem bublin kyslíku barvivo opět oxiduje a získá zpět svou sytou barvu.



Rovnice 1 Schéma redukce methylenové zeleně (převzato z ²⁰)

Reakci experimentálně studovali pákistánští vědci Rafia Azmat, Samreen Ahmed, Sitwat Quereshi, Farayl Vali Mohammed a Fahim Uddin. Podle jejich výsledků je rychlostní konstanta pro oxidaci glukosy závislá na koncentraci glukosy, nikoli však na koncentraci barviva či NaOH, což ukazuje tabulka č.9:

Tabulka 9 Experimentálně zjištěné rychlostní konstanty aerobní oxidace glukosy methylenovou zelení ⁽²⁰⁾

MG .10⁵ [mol/dm³]	Glukosa .10⁴ [mol/dm³]	NaOH .10² [mol/dm³]	Rychl.konst. k . 10³ [s⁻¹]
0,66	1,66	8,30	1,4
1,33	1,66	8,30	1,5
2	1,66	8,30	1,6
2,5	1,66	8,30	1,6
3,33	1,66	8,30	1,6
0,66	10,00	8,30	3,3
0,66	30,00	8,30	3,4
0,66	50,00	8,30	3,9
0,66	60,00	8,30	4,2
0,66	80,00	8,30	4,4
0,66	1,66	8,30	1,4
0,66	1,66	16,00	1,3
0,66	1,66	25,00	1,2
0,66	1,66	33,00	1,0
0,66	1,66	41,00	0,9

3. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo vyzkoušet možnost studia kinetiky reakcí na spektrofotometru s diodovým polem HP 8453 a především popsat postup tohoto měření. Zejména bylo cílem seznámit se se softwarovým modulem Biochemical Analysis a ověřit jeho možnosti pro studium kinetiky obecně.

Místo původně plánovaného cytochromu P-450 jsem proměřovala aerobní oxidaci D-glukosy methylenovou zelení v alkalickém prostředí, neboť izolace a příprava P-450 by byla příliš náročná.

4. METODY POKUSU

4.1. Použité přístroje

- notebook Asus A3H
- spektrofotometr HP 8453
- analytické váhy ADAM, Schoeller instruments

4.2. Použité programy

Protože se ukázalo, že programový modul Biochemical Analysis neumožňuje přímý export kinetických dat (nabízená funkce export umožňuje pouze exportovat časový průběh při šesti předem zadaných vlnových délkách, a to i když jsou data ukládána jako časová série spekter), navíc výrobce neudává v manuálech žádné podrobnosti o formátu uložených dat, byla možnost konverze dat prověřována hledáním na Internetu. Byl nalezen program of firmy BioLogic (viz dále) a použit pro export dat do Excelu.

- 845x UV-Visible System-Instrument 1 (online) + makro do tohoto programu od firmy BioLogic (stáhnuto z www stránek: <http://www.bio-logic.info/rapid-kinetics/specfit.html>)
- 30-ti denní zkušební verze programu Specfit/32 (také stáhnuto z internetových stránek: <http://www.bio-logic.info/rapid-kinetics/specfit.html>)
- Microsoft Excel 2003

4.3. Použité chemikálie

- glukosa, p.a. Merck
- methylenová zeleň, Lachema
- 1 M roztok NaOH
- destilovaná voda

5. POSTUP PRÁCE

5.1. Nastavení programu

Po zapnutí spektrofotometru HP 8453 a jeho připojení na notebook Asus A3H byl spuštěn program 845x UV-Visible System-Instrument 1 (online). Pro měření kinetiky je potřeba zvolit *Mode* → *Kinetics*. V okně *Time & Calculation* na levé straně okna programu se kliknutím na ikonu *Setup* nastaví parametry časového měření. Je tam možnost nastavit až 6 vlnových délek při kterých se bude kinetika vyhodnocovat, celkový čas měření (*Run time*), doba mezi kliknutím na *Start* a počátkem měření (*Start time*), čas mezi jednotlivými měřeními (*Cycle time*). Zaškrtnutím *Increment cycle time by:* se zvolí možnost procentuálního růstu času mezi jednotlivými měřeními po určité době, která se zadá do pole *after initial time of:*. Dále je tam také možnost nastavit výpočet rychlosti (*Rate calculation*) pokud víme, jakým kinetickým mechanismem reakce probíhá.

Nastavení pro měření pokusu:

- Use wavelength: 350, 450, 550, 600, 650 a 700 nm
- Run time: 270 s
- Start time: 20 s
- Cycle time: 10 s
- Increment cycle time by: 50 %
- after initial time of: 100 s
- Rate calculation → Type: First Order

5.2. Měření kinetiky

Jak je již uvedeno výše, rychlost aerobní oxidace je závislá na koncentraci glukosy, nikoli na koncentraci NaOH nebo barviva. Zvolila jsem proto vyšší koncentraci glukosy, abych dosáhla vysoké rychlostní konstanty.

Připravila jsem si:

- $24,3 \cdot 10^{-3}$ M roztok glukosy (0,0876 g glukosy jsem rozpustila ve 20 ml destilované vody)
- $2,19 \cdot 10^{-5}$ M roztok methylenové zeleně (navážila jsem 0,0019 g MG, které jsem rozpustila v 250 ml destilované vody)
- 0,25 M roztok NaOH (5 ml 1 M roztoku jsem zředila 15 ml destilované vody)

Plastovou kyvetu jsem naplnila vodou, v programu jsem zvolila *Measure* → *Blank* a spektrofotometr proměřil spektrum blanku, které se ihned ukázalo na monitoru. Po proměření blanku se zaktivuje okno *Measure* → *Time Based Measurement* → *Start*, které umožňuje měření časové kinetiky reakce.

Do plastové pipety jsem automatickou pipetou napipetovala 800 μ l roztoku NaOH a stejné množství roztoku MG. Po kliknutí na *Start* zbývá ještě 20 s (*Start time* v *Setup*) pro vložení kyvety do spektrofotometru a dopipetování 1000 μ l roztoku glukosy.

Na monitoru se po měření zobrazila naměřené spektra pomocí *View* → *All spektra*. Ta jsem uložila *File* → *Save* → *All data as* → *.kd format*.

Formát *.kd je velmi těžké exportovat např. do Excelu nebo Originu, neboť výrobce nikde neuvádí jeho popis. Nám se nakonec podařilo jej exportovat pomocí makra, které bylo staženo od firmy BioLogic Science Instruments z internetových stránek:

<http://www.bio-logic.info/rapid-kinetics/specfit.html>

Po instalaci makra do stejného adresáře, v němž je ovládací program, se objeví v horní liště nová ikona *Export*.

Stačí pak zvolit *Export* → *SPECFIT spreadsheet* → *.txt format*. Tento formát již lze importovat do Excelu, Originu a podobných programů.

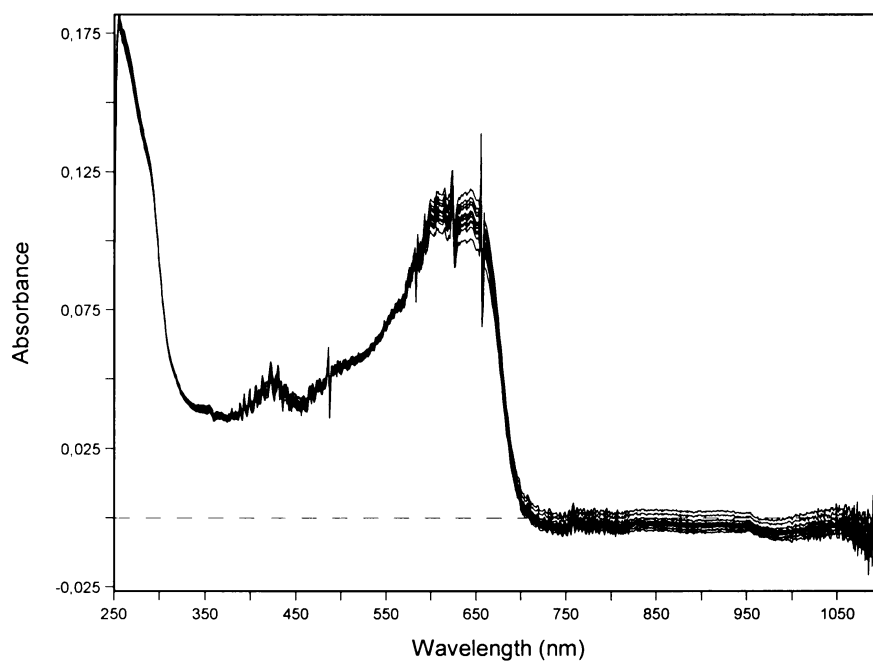
6. VÝSLEDKY

6.1. Vyhodnocení kinetických dat

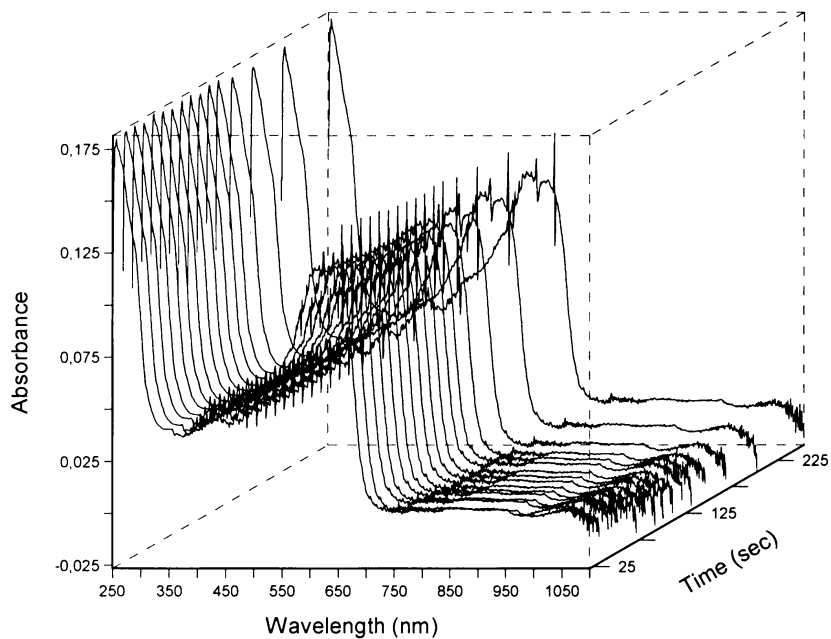
Naměřené hodnoty byly ve formátu *.txt naimportovány do programu Specfit/32, který byl jako 30-ti denní zkušební verzi také stáhnut ze stránek:

<http://www.bio-logic.info/rapid-kinetics/specfit.html>

Výsledné grafy časových změn závislostí absorbance na vlnové délce jsou ukázány na obr. 13 a 14:

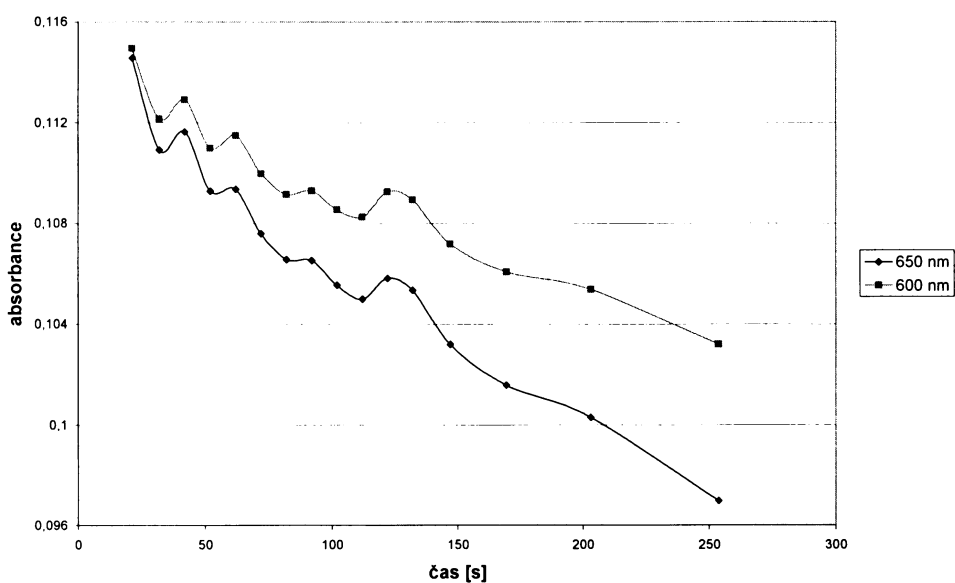


Obrázek 13 2D graf kinetiky aerobní oxidace D-glukosy methylenovou zelení

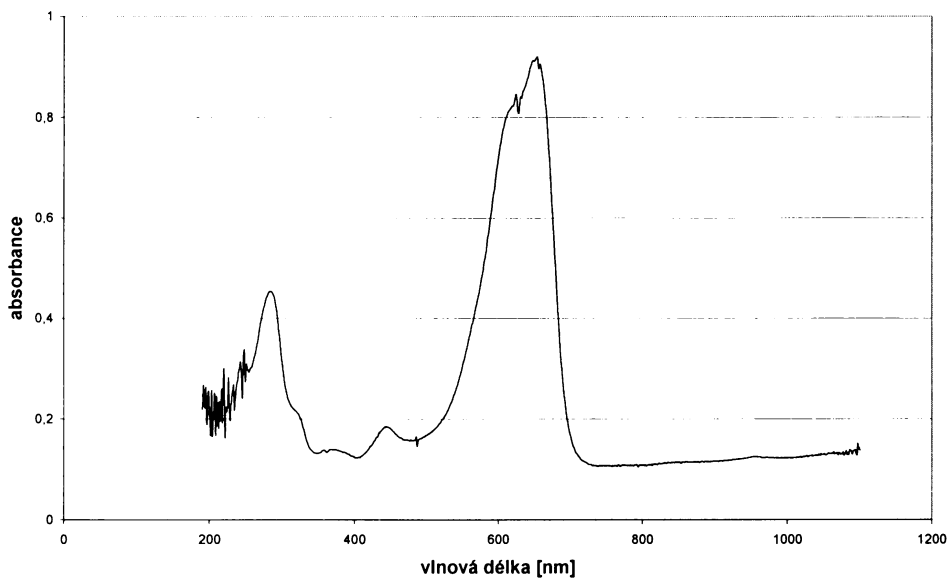


Obrázek 14 3D graf kinetiky aerobní oxidace D-glukosy methylenovou zelení

Z naměřených hodnot bylo patrné, že nejvyšší absorbance a zároveň také jejich nejzřetelnější pokles jsou při vlnových délkách 600 a 650 nm (obr. 15). Vychází to také z toho, že spektrum samotného roztoku MG má absorpční maximum při 654 nm a druhé, menší, při 625 nm (obr. 16). Oba grafy byly vytvořeny pomocí programu Microsoft Excel 2003.



Obrázek 15 Závislost absorbance MG na čase při vlnových délkách 600 a 650 nm



Obrázek 16 Absorpční spektrum samotného roztoku MG

6.2. Rychlost reakcí

Program UV-Visible System- Instrument 1 (online) umí spočítat rychlosti reakcí při jednotlivých délkách při známém kinetickém řádu. První řád (*First Order*) je programem vypočten pomocí exponenciálního výpočtu rychlosti, k :⁽²⁶⁾

$$A_t = A_\infty + (A_0 - A_\infty)e^{-kt}$$

Kde k je vypočteno z lineární regrese:⁽²⁶⁾

$$\begin{aligned} \frac{A_{t_{i+1}} - A_{t_i}}{t_{i+1} - t_i} &= kA_\infty - k \frac{1}{t_{i+1} - t_i} \int_{t_i}^{t_{i+1}} A_t dt \\ &= kA_\infty - \frac{1}{2} k (A_{t_{i+1}} + A_{t_i}) \end{aligned}$$

Tabulka 10 Rychlosti reakce při různých vlnových délkách vypočítané programem UV-Visible System-Instrument 1 (online)

Vlnová délka [nm]	Rychlost [1/s]
450	$5,0623 \cdot 10^{-3}$
550	$2,6807 \cdot 10^{-2}$
600	$1,1208 \cdot 10^{-2}$
650	$9,5309 \cdot 10^{-3}$
700	$2,2678 \cdot 10^{-2}$

7. DISKUSE

Z výsledku je patrné, že spektrofotometr lze úspěšně používat pro měření kinetiky reakcí. Po nastavení základních parametrů je práce s ním velice jednoduchá. Problém exportu dat by bylo možné řešit pomocí programu Specfit/32 a k němu dodávaných maker (toto řešení by bylo uživatelsky komfortní). Je také možno použít zmíněná makra samostatně (pracují bez časového omezení) a exportovaná data pak vynášet do grafů jinými vhodnými programy.

8. ZÁVĚR

Spektrofotometr s diodovým polem HP 8453 spolu se softwarem firmy Agilent Technologies se výborně hodí pro měření kinetiky. Přístroj se hodí také pro měření tak malých změn v absorbanci, které jsem naměřila pomocí aerobní oxidace D-glukosy methylenovou zelení, a které jsou mimo jiné typické také pro cytochrom P-450.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) Ruckpaul K., Rein H.: *Cytochrome P-450*; Akademie-Verlag Berlin (1984)
- (2) Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.: *Chem. Listy* 93, 229-237 (1999)
- (3) Guengerich F.P.: *Chem. Res. Toxicol.* 14, 611-650 (2001).
- (4) Štefl M.: Kinetika interakce cytochromu P-450 s oxidem uhelnatým, Bakalářská práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2006)
- (5) Cytochrome P450 Homepage: <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html> (4.5.2007)
- (6) Gregořicová J.: Studium kinetiky redukce vybraných hemthiolátových enzymů, Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2004)
- (7) Plant N.: *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 478–488 (2007)
- (8) Poulos T.L., Finzel B.C., Howard A.J.: *J. Mol. Biol.* 195, 687-700 (1987)
- (9) Anderson J.L.R., Chapman S.K.: *Dalton Trans* 1, 13-24 (2005)
- (10) Promise: <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/MAIN.html> (4.5.2007)
- (11) Sawada N., Sakaki T., Kitanaka S., Kato S., Inouye K.: *Eur. J. Biochem.* 268, 6607-6615 (2001)
- (12) Hannemann F., Bichet A., Ewen K.M., Bernhardt R.: *Biochim. Biophys. Acta* 1770, 330 – 344 (2007)
- (13) Ryter S.W., Otterbein L.E.: *BioEssays* 26, 270-280 (2004)

(14) Gray R.D.: *J. Biol. Chem.* 257, 1086-1094 (1981)

(15) Gore M.G.: *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry-A Practical Approach*, Oxford University Press (2000)

Kniha přístupná v omezeném rozsahu na:

http://books.google.com/books?hl=en&lr=lang_en&id=dCjsBlnQhc4C&oi=fnd&pg=PR17&sig=6Og-cnpOupqhxhNE1slkxplyxp7E&dq=spektrofotometri+AND+UV#PPP1,M1

(8.5.2007)

(16) Owen T.: *Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy-A Primer*, Hewlett Packard Company, Germany (1996)

(17) Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System: Operator's Manual, Agilent Technologies, Germany (2003)

(18) HP 8453E UV-visible Spectroscopy System-User Manual, Hewlett Packard Company, Germany (1998)

(19) Methylene Green: <http://www.sciencelab.com/page/S/PVAR/23023/SLM2953>

(29.5.2007)

(20) Rafia Azmat, Samreen Ahmed, Sitwat Quereshi, Farayl Vali Mohammed, Fahim Uddin: *J. Applied Sci.* 6, 2784-2788 (2006)

(21) Methylene Green: <http://www.usca.edu/chemistry/spectra/methgrn.htm> (29.5.2007)

(22) Cutting J.A., Roth T.F.: *Anal. Bioch.* 54, 386-394 (1973)

(23) Methylene Green Recipe: <http://www.thelabrat.com/protocols/MethylGreen.shtml>

(29.5.2007)

(24) <http://homepages.gac.edu/~cellab/chpts/chpt2/ex2-4.html> (29.5.2007)

(25) Adamčíková L., Pavlíková K., Ševčík P.: *Int. J. Chem. Kinet.* 31, 463-468 (1999)

(26) Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System: Understanding Your Biochemical Analysis Software, Agilent Technologies, Germany (2003)

(27) Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System: Operator's Manual for Biochemical Analysis Software, Agilent Technologies, Germany (2003)

(28) Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System: Understanding Your UV-visible Spectroscopy System, Agilent Technologies, Germany (2003)