

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Katedra analytické chemie

Katecholázová aktivita vybraných biomimetických komplexů mědi

Bc. Michaela Bártová

Diplomová práce

2022

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela Bártová**  
Osobní číslo: **C20499**  
Studijní program: **N0531A130030 Hodnocení a analýza potravin**  
Téma práce: **Katecholázová aktivita vybraných biomimetických komplexů mědi**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

## Zásady pro vypracování

1. V teoretické části zpracujte rešerši se zaměřením na popis katalytické aktivity enzymu tyrosináza a její alternativy v podobě biomimetických komplexů mědi. Dále popište metody a přístupy jakými lze stanovit katecholázovou aktivitu enzymu i komplexů.
2. V experimentální části porovnejte katecholázovou aktivitu vybraných jedno- a dvoujader-  
ných komplexů mědi vůči 3,5-di-*tert*-butylkatecholu a dopaminu. Pro budoucí vývoj tyrosinázových biomimetických senzorů se pokuste imobilizovat vybraný komplex mědi na povrch magnetických částic a stanovit jeho katalytickou aktivitu.
3. Dosažené výsledky diskutujte a na závěr kriticky zhodnoťte.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:  
Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Tomáš Mikysek, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Milan Sýs, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2022**

Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Ing. Karel Ventura, CSc.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 21. února 2022

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji:

Práci s názvem Katecholázová aktivita vybraných biomimetických komplexů mědi jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6. 5. 2022

Bc. Michaela Bártová v. r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu práce Ing. Tomáši Mikyskovi, Ph.D. jednak za jeho ochotu a vstřícnost, ale také za cenné rady a připomínky, které mi pomohly v experimentální části a při psaní diplomové práce. Zároveň děkuji konzultantovi práce Ing. Milanu Sýsovi, Ph.D. za jeho poznatky a odbornou pomoc během experimentování. Poděkování patří také doc. Ing. Lence Husákové, Ph.D. za stanovení obsahu mědi ve vzorcích metodou ICP-MS. Na závěr bych chtěla poděkovat za příležitost podílet se, skrze této diplomové práce, na projektu (19-03160S) Grantové agentury České republiky.

## **ANOTACE**

Úkolem této práce bylo stanovit katecholázovou aktivitu vybraných biomimetických komplexů mědi vůči zvoleným substrátům (dopamin, 3,5-di-tert-butylcatechol). Měření byla provedena dvěma způsoby. První z nich bylo na základě elektrochemického sledování úbytku kyslíku během oxidace substrátu katalyzované daným komplexem/tyrosinázou. Druhým způsobem bylo spektrofotometrické snímání nárůstu absorbance vlivem vzniku produktu oxidace substrátu. Získané kinetické parametry katalytické aktivity byly následně porovnány navzájem a také vůči enzymu tyrosináza. Zároveň byl sledován vliv kyslíku v různém prostředí na rychlost katalytické reakce. Závěrečné experimenty byly zaměřeny na sledování katalytické aktivity vybraného komplexu zakotveného na magnetické částice. Součástí těchto experimentů byla strukturální charakterizace částic, stanovení katecholázové aktivity zakotveného komplexu a ověření stability jeho vazby s částicemi.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Biomimetické komplexy mědi, tyrosináza, katecholázová aktivita, dopamin, 3,5-di-tert-butylcatechol

## **TITLE**

Catecholase activity of selected biomimetic copper(II) complexes

## **ANNOTATION**

The main aim of the thesis was determination of catecholase activity of various biomimetic copper(II) complexes towards selected substrates (dopamine, 3,5-di-tert-butylcatechol). Two methods were employed within the experiments. The first one deals with electrochemical monitoring of oxygen consumption during the reaction of substrate oxidation catalyzed by complex/Tyrosinase. The latter was spectrophotometric recording of absorbance during the formation of oxidation product. The obtained kinetic parameters of catalytic activity were compared also with those obtained for enzyme tyrosinase. Besides, the influence of oxygen level in different media on catalysis was examined. Final experiments were focused on monitoring of catalytic activity of selected copper(II) complex anchored at magnetic beads. Such experiments included structural characterization of these beads, determination of catecholase activity with

anchored complex, and checking the stability of the covalent bond of complex with magnetic beads.

## **KEYWORDS**

Biomimetic copper complexes, tyrosinase, catecholase activity, dopamine, 3,5-di-tert-butylcatechol

## OBSAH

Úvod.....	18
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	20
1.1 Tyrosináza .....	20
1.1.1 Strukturní vlastnosti .....	20
1.1.2 Katalytické vlastnosti.....	22
1.1.3 Možnosti praktického využití tyrosinázy.....	24
1.2 Spotřeba kyslíku během enzymatické reakce .....	24
1.2.1 Metody měření spotřeby kyslíku .....	25
1.3 Kinetické parametry enzymové reakce .....	26
1.3.1 Kinetická měření dle Michaelis-Mentenové.....	26
1.4 Biomimetické komplexy mědi .....	32
1.4.1 Komplexy mědi imitující katalytickou aktivitu tyrosinázy .....	32
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	43
2.1 Chemikálie .....	43
2.1.1 Biomimetické komplexy mědi.....	43
2.2 Přístroje a pomůcky.....	45
2.3 Příprava zásobních roztoků.....	46
2.3.1 Zásobní roztoky pro elektrochemická měření .....	46
2.3.2 Zásobní roztoky pro spektrofotometrická měření.....	46
2.4 Postup pro zakotvení komplexu 3 na magnetických částicích.....	46
2.5 Postup pro stanovení katecholázové aktivity: elektrochemicky .....	47
2.6 Postup pro stanovení katecholázové aktivity: spektrofotometricky.....	47
2.6.1 Měření v prostředí s přirozeným obsahem kyslíku.....	48
2.6.2 Měření v prostředí syčeném kyslíkem .....	49
2.7 Postup pro stanovení obsahu vody ve vybraných rozpouštědlech dle Karl Fischera	50



3	VÝSLEDKY A DISKUSE .....	51
3.1	Stanovení katecholázové aktivity: elektrochemicky .....	51
3.1.1	Měření ve vodném prostředí .....	51
3.1.2	Měření v prostředí methanolu .....	58
3.1.3	Souhrnný komentář k experimentům založených na měření spotřeby kyslíku (elektrochemicky) .....	59
3.2	Stanovení katecholázové aktivity: spektrofotometricky .....	60
3.2.1	Měření UV/VIS spekter příslušných produktů reakce .....	60
3.2.2	Měření ve vodném prostředí s přirozeným obsahem kyslíku .....	64
3.2.3	Měření ve vodném prostředí syceném kyslíkem .....	69
3.2.4	Měření v prostředí acetonitrilu s přirozeným obsahem kyslíku .....	76
3.2.5	Měření v prostředí acetonitrilu syceném kyslíkem .....	82
3.2.6	Souhrnný komentář k experimentům založených na měření vzniklého produktu (spektrofotometricky) .....	88
3.3	Zakotvení komplexu 3 na magnetické částice, sledování katecholázové aktivity .....	89
3.3.1	Charakterizace magnetických částic s vázaným komplexem .....	89
3.3.2	Stanovení katecholázové aktivity komplexu 3 zakotveného na magnetických částicích .....	92
3.3.3	Ověření stability vazby komplexu 3 na magnetických částicích .....	94
3.3.4	Souhrnný komentář k provedeným experimentům týkající se magnetických částic s vázaným komplexem 3 .....	95
4	Závěr .....	96
	Použitá literatura .....	98

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Biochemické vlastnosti tyrosináz produkovaných odlišnými mikroorganismy. ....	21
Tabulka 2: Vzorce studovaných komplexů mědi a strukturní názvy jejich ligandů. ....	35
Tabulka 3: Kinetické parametry studovaných komplexů mědi. ....	35
Tabulka 4: Vzorce měřených komplexů mědi a strukturní názvy jejich ligandů. ....	36
Tabulka 5: Kinetické parametry reakcí katalyzovaných příslušnými dvoujadernými komplexy mědi. ....	37
Tabulka 6: Vzorce studovaných dinukleárních komplexů mědi a strukturní názvy jejich ligandů. ....	38
Tabulka 7: Kinetické parametry reakcí jednotlivých komplexů s 3,5-DTBC v čistém methanolu a methanolu ředěného vodou v poměru 1:1. ....	38
Tabulka 8: Přehled použitých chemikálií včetně jejich výrobců. ....	43
Tabulka 9: Vzorce studovaných komplexů a jejich ligandů syntetizovaných na Univerzitě Pardubice. ....	44
Tabulka 10: Výčet použitých přístrojů a pomůcek včetně jejich výrobců. ....	45
Tabulka 11: Přehled vyhodnocených kinetických parametrů oxidací dopaminu katalyzovaných komplexy 1, 2 a tyrosinázou. Linearizační technika: dle Lineweavera a Burka; metoda měření: elektrochemické měření spotřeby kyslíku; prostředí pro měření: fosfátový pufr o pH 7. ....	57
Tabulka 12: Souhrn stanovených kinetických parametrů oxidací dopaminu katalyzovaných komplexy 1, 2 a tyrosinázou. Linearizační technika: dle Lineweavera a Burka; metoda měření: spektrofotometrické měření vzniklého produktu; prostředí pro měření: fosfátový pufr s přirozeným obsahem kyslíku a fosfátový pufr syčený kyslíkem. ....	75
Tabulka 13: Přehled stanovených kinetických parametrů oxidací 3,5-DTBC katalyzovaných komplexy 1 a 3. Linearizační technika: dle Lineweavera a Burka; metoda měření: spektrofotometrické měření vzniklého produktu; prostředí pro měření: acetonitril s přirozeným obsahem kyslíku a acetonitril syčený kyslíkem. ....	87
Tabulka 14: Stanovení koncentrace mědi metodou ICP-MS na částicích se zakotveným komplexem 3 ve třech sledovaných stavech. ....	91

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Tři formy aktivního centra tyrosinázy: „deoxy“, „met“ a „oxy“ forma. ....	22
Obrázek 2: Saturační křivka: Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu. ....	27
Obrázek 3: Linearizace dle Lineweavera a Burka: Závislost obrácených hodnot rychlostí na obrácených hodnotách koncentrací substrátu. ....	29
Obrázek 4: Linearizace dle Eadie-Hofstee: Závislost rychlosti na poměru rychlosti ke koncentraci substrátu. ....	30
Obrázek 5: Linearizace dle Hanese a Woolfa: Závislost poměru koncentrace substrátu a rychlosti na koncentraci substrátu. ....	31

Obrázek 6: Struktura dvoujaderného komplexu $[\text{Cu}_2(\text{L-66})]^{2+}$ a mechanismus jeho reakce s kyslíkem a následné hydroxylace 4-methoxyfenolu na katechol. ....	33
Obrázek 7: Struktura ligandů L-55, L-56 a L-5p6. ....	33
Obrázek 8: Struktura vybraných komplexů mědi; z publikace Nishida a kol. ....	34
Obrázek 9: Struktura studovaných komplexů mědi; z publikace Mukherjee a kol. ....	35
Obrázek 10: Struktura syntetizovaných a studovaných komplexů mědi; z publikace Neves a kol. ....	36
Obrázek 11: Struktury ligandů studovaných komplexů; z publikace Banu a kol. ....	37
Obrázek 12: Princip oxidace 3,5-DTBC na 3,5-DTBQ katalyzované mononukleárním komplexem mědi. ....	39
Obrázek 13: Princip oxidace 3,5-DTBC na 3,5-DTBQ katalyzované dinukleárním komplexem mědi. ....	39
Obrázek 14: Záznam absorpčních UV/VIS spekter během oxidace 3,5-DTBC katalyzované komplexem mědi. ....	40
Obrázek 15: Závislosti proudu na čase během oxidace 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 a 100 $\mu\text{mol/L}$ dopaminu na uhlíkové pastové elektrodě s imobilizovanou tyrosinázou. ....	41
Obrázek 16: Struktury studovaných komplexů. Komplexy 1 a 2: jednojaderné; komplex 3: dvoujaderný. Molární hmotnosti: komplex 1=560,8 g/mol; komplex 2=500,7 g/mol; komplex 3=692,2 g/mol. ....	44
Obrázek 17: Vzorky studovaných biomimetických komplexů mědi. Snímek vlevo: komplex 1; snímek uprostřed: komplex 2; snímek vpravo: komplex 3. ....	44
Obrázek 18: Závislosti koncentrace kyslíku na čase měřené během oxidací příslušných koncentrací dopaminu (viz legenda grafu) katalyzovaných komplexem 1. Prostředí pro měření: fosfátový pufr o pH 7; koncentrace komplexu 1: 5 mmol/L. ....	51
Obrázek 19: Saturační křivka pro oxidace jednotlivých koncentrací dopaminu katalyzované komplexem 1 ve fosfátovém pufru o pH 7. ....	52
Obrázek 20: Linearizace dle Lineweavera a Burka pro vyhodnocení kinetických parametrů oxidace dopaminu katalyzované komplexem 1. ....	52
Obrázek 21: Závislosti koncentrace kyslíku na čase zaznamenané během oxidací jednotlivých koncentrací dopaminu (viz legenda grafu) katalyzovaných komplexem 2. Prostředí pro měření: fosfátový pufr o pH 7; koncentrace komplexu 2: 5mmol/L. ....	53
Obrázek 22: Saturační křivka oxidace daných koncentrací dopaminu katalyzované komplexem 2 ve fosfátovém pufru o pH 7. ....	54
Obrázek 23: Linearizace dle Lineweavera a Burka pro vyhodnocení kinetických parametrů oxidace dopaminu katalyzované komplexem 2. ....	54
Obrázek 24: Porovnání saturačních křivek z měření oxidace dopaminu katalyzované komplexy 1 a 2. ....	55

Obrázek 25: Závislosti koncentrace kyslíku na čase zaznamenávané během oxidací příslušných koncentrací dopaminu katalyzovaných tyrosinázou. Prostředí pro měření: fosfátový pufr o pH 7; koncentrace tyrosinázy: 2 µg/mL.....	55
Obrázek 26: Saturační křivka pro oxidace sledovaných koncentrací dopaminu katalyzované tyrosinázou ve fosfátovém pufru o pH 7. ....	56
Obrázek 27: Linearizace dle Lineweavera a Burka pro stanovení kinetických parametrů oxidace dopaminu katalyzované tyrosinázou. ....	56
Obrázek 28: Závislosti koncentrace kyslíku na čase měřené v roztocích obsahující pouze fosfátový pufr a dopamin v koncentracích uvedených v legendě grafu. ....	57
Obrázek 29: Závislosti koncentrace kyslíku na čase během oxidací příslušných koncentrací 3,5-DTBC (viz legenda) katalyzovaných komplexem 3. Prostředí pro měření: methanol; koncentrace komplexu 3: 0,15 mmol/L.....	58
Obrázek 30: Saturační křivka pro oxidace příslušných koncentrací 3,5-DTBC katalyzované komplexem 3 v prostředí methanolu.....	59
Obrázek 31: Linearizace dle Lineweavera a Burka pro vyhodnocení Michaelisovy konstanty a limitní rychlosti oxidace 3,5-DTBC katalyzované komplexem 3. ....	59
Obrázek 32: UV/VIS spektrum postupně vznikajícího dopaminochromu jako produktu oxidace dopaminu katalyzované komplexem 1.....	61
Obrázek 33: UV/VIS spektrum postupně vznikajícího dopaminochromu jako produktu oxidace dopaminu katalyzované komplexem 2.....	62
Obrázek 34: UV/VIS spektrum 3,5-di-tert-butyl-o-benzochinonu vznikajícího oxidací 3,5-di-tert-butylkatecholu katalyzovanou komplexem 1.....	63
Obrázek 35: UV/VIS spektrum 3,5-di-tert-butyl-o-benzochinonu vznikajícího oxidací 3,5-di-tert-butylkatecholu katalyzovanou komplexem 3.....	63
Obrázek 36: Závislosti absorbance na čase zaznamenané během oxidací příslušných koncentrací dopaminu (viz legenda grafu) katalyzovaných komplexem 1. Prostředí pro měření: fosfátový pufr o pH 7 s přirozeným obsahem kyslíku; koncentrace komplexu 1: 0,3 mmol/L.....	64
Obrázek 37: Saturační křivka pro oxidace dopaminu katalyzované komplexem 1 v prostředí fosfátového pufru o pH 7 s přirozeným obsahem kyslíku. ....	65
Obrázek 38: Linearizace dle Lineweavera a Burka pro vyhodnocení kinetických parametrů oxidace dopaminu katalyzované komplexem 1.....	65
Obrázek 39: Závislosti absorbance na čase měřené při oxidacích v legendě zobrazených koncentracích dopaminu katalyzovaných komplexem 2. Prostředí pro měření: fosfátový pufr s přirozeným obsahem kyslíku; koncentrace komplexu 2: 0,6 mmol/L.....	66
Obrázek 40: Saturační křivka pro oxidace dopaminu katalyzované komplexem 2 v prostředí fosfátového pufru o pH 7 obsahující přirozené množství kyslíku. ....	67

Obrázek 41: Linearizace dle Lineweavera a Burka použitá pro vyhodnocení kinetických parametrů oxidace dopaminu katalyzované komplexem 2. ....	67
Obrázek 42: Křivky závislosti absorbance na čase měřené při oxidacích příslušných koncentracích dopaminu (viz legenda grafu) katalyzovaných tyrosinázou. Prostředí pro měření: fosfátový pufr o pH 7 s přirozeným obsahem kyslíku; koncentrace tyrosinázy: 2 µg/mL. ....	68
Obrázek 43: Saturační křivka pro oxidace jednotlivých koncentrací dopaminu katalyzované tyrosinázou a měřené ve fosfátovém pufru o pH 7 s přirozeným obsahem kyslíku. ....	69
Obrázek 44: Linearizace dle Lineweavera a Burka pro vyhodnocení kinetických parametrů oxidace dopaminu katalyzované tyrosinázou. ....	69
Obrázek 45: Závislosti absorbance na čase zaznamenávané během oxidací příslušných koncentrací dopaminu (viz legenda grafu) katalyzovaných komplexem 1. Prostředí pro měření: fosfátový pufr o pH 7 syčený kyslíkem; koncentrace komplexu 1: 0,3 mmol/L. ....	70
Obrázek 46: Saturační křivka pro oxidace dopaminu katalyzované komplexem 1 a měřené ve fosfátovém pufru o pH 7 syčeném kyslíkem. ....	70
Obrázek 47: Linearizace dle Lineweavera a Burka pro stanovení kinetických parametrů oxidace dopaminu katalyzované komplexem 1. ....	71
Obrázek 48: Srovnání saturačních křivek oxidačních reakcí dopaminu katalyzovaných komplexem 1 ve fosfátovém pufru o pH 7 obsahující přirozené množství kyslíku a fosfátovém pufru s přidaným kyslíkem. ....	71
Obrázek 49: Závislosti absorbance na čase měřené během oxidací příslušných koncentrací dopaminu (viz legenda grafu) katalyzovaných komplexem 2. Prostředí pro měření: fosfátový pufr o pH 7 syčený kyslíkem; koncentrace komplexu 2: 0,6 mmol/L. ....	72
Obrázek 50: Saturační křivka sestavená pro oxidace dopaminu katalyzované komplexem 2 ve fosfátovém pufru o pH 7 syčeném kyslíkem. ....	73
Obrázek 51: Linearizace dle Lineweavera a Burka využita pro stanovení kinetických parametrů oxidace dopaminu katalyzované komplexem 2. ....	73
Obrázek 52: Porovnání saturačních křivek oxidací dopaminu katalyzovaných komplexem 2 měřených ve fosfátovém pufru (pH 7) za podmínek přirozeného a přidaného kyslíku. ....	74
Obrázek 53: Srovnání závislosti absorbance na čase zaznamenaných během oxidací 0,6mM dopaminu katalyzovaných tyrosinázou ve fosfátovém pufru (pH 7) obsahující přirozené a přidané množství kyslíku (viz legenda grafu). Koncentrace tyrosinázy: 2 µg/mL. ....	75
Obrázek 54: Závislosti absorbance na čase měřené v roztocích obsahující fosfátový pufr syčený kyslíkem a dopamin v koncentracích uvedených v legendě grafu. ....	76
Obrázek 55: Závislost absorbance na koncentraci kalibrační řady 3,5-DTBQ. ....	77
Obrázek 56: Závislosti absorbance na čase změřené během oxidací jednotlivých koncentrací 3,5-DTBC (viz legenda grafu) katalyzovaných komplexem 1. Prostředí pro měření: acetonitril s přirozeným obsahem kyslíku; koncentrace komplexu 1: 0,3 mmol/L. ....	78

Obrázek 57: Saturační křivka pro oxidace 3,5-DTBC katalyzované komplexem 1 a měřené v prostředí acetonitrilu obsahující kyslík v přirozeném množství.....	79
Obrázek 58: Linearizace dle Lineweavera a Burka pro určení kinetických parametrů oxidace 3,5-DTBC katalyzované komplexem 1.....	79
Obrázek 59: Závislosti absorbance na čase změřené během oxidací příslušných koncentrací 3,5-DTBC (viz legenda grafu) katalyzovaných komplexem 3. Prostředí pro měření: acetonitril s přirozeným obsahem kyslíku; koncentrace komplexu 3: 0,15 mmol/L. ....	80
Obrázek 60: Saturační křivka pro oxidační reakce 3,5-DTBC katalyzované komplexem 3 v prostředí acetonitrilu obsahující přirozené množství kyslíku.....	81
Obrázek 61: Linearizace dle Lineweavera a Burka použita pro stanovení kinetických parametrů oxidace 3,5-DTBC katalyzované komplexem 3.....	81
Obrázek 62: Srovnání saturačních křivek oxidací 3,5-DTBC katalyzovaných za stejných podmínek komplexem 1 a komplexem 3. ....	82
Obrázek 63: Závislosti absorbance na čase zaznamenané během oxidací 3,5-DTBC v koncentracích (viz legenda grafu) katalyzovaných komplexem 1. Prostředí pro měření: acetonitril syčený kyslíkem; koncentrace komplexu 1: 0,3 mmol/L.....	83
Obrázek 64: Saturační křivka vytvořená pro oxidace 3,5-DTBC katalyzované komplexem 1 v acetonitrilu syčeném kyslíkem.....	84
Obrázek 65: Linearizace dle Lineweavera a Burka použitá pro vyhodnocení kinetických parametrů oxidace 3,5-DTBC katalyzované komplexem 1. ....	84
Obrázek 66: Srovnání saturačních křivek oxidací 3,5-DTBC katalyzovaných komplexem 1 a měřených v acetonitrilu bez a s přidaným kyslíkem.....	85
Obrázek 67: Změřené závislosti absorbance na čase při oxidacích 3,5-DTBC v koncentracích (viz legenda grafu) katalyzovaných komplexem 3. Prostředí pro měření: acetonitril syčený kyslíkem; koncentrace komplexu 3: 0,15 mmol/L. ....	85
Obrázek 68: Saturační křivka sestavená na základě oxidačních reakcí 3,5-DTBC katalyzovaných komplexem 3 v acetonitrilu syčeném kyslíkem. ....	86
Obrázek 69: Linearizace dle Lineweavera a Burka pro určení kinetických parametrů oxidace 3,5-DTBC katalyzované komplexem 3.....	86
Obrázek 70: Srovnání saturačních křivek oxidací 3,5-DTBC katalyzovaných komplexem 3 získaných z měření v acetonitrilu s přidaným a přirozeným kyslíkem. ....	87
Obrázek 71: Závislost absorbance na čase sledovaná v roztoku obsahující acetonitril syčený kyslíkem a 3,5-DTBC v koncentraci 1 mmol/L. ....	88
Obrázek 72: Snímek magnetických částic bez komplexu získané metodou SEM.....	90

Obrázek 73: Snímky magnetických částic s navázaným komplexem 3 pořízené metodou SEM. Snímek vlevo: částice se zakotveným komplexem, neměřené; snímek uprostřed: částice se zakotveným komplexem, měřené jeden den; snímek vpravo: částice s opakovaně kotveným komplexem, měřené více dní. ....	91
Obrázek 74: Závislosti absorpance na čase měřené při oxidacích 3,5-DTBC v koncentracích (viz legenda grafu) katalyzovaných komplexem 3 navázaným na magnetické částice. Prostředí pro měření: bezvodý acetonitril.....	92
Obrázek 75: Saturační křivka pro oxidační reakce 3,5-DTBC katalyzované komplexem 3 zakotveným na magnetických částicích.....	93
Obrázek 76: Linearizace dle Lineweavera a Burka použitá pro stanovení kinetických parametrů oxidace 3,5-DTBC katalyzované komplexem 3 vázaným na magnetické částice. ....	93
Obrázek 77: Opakované měření závislosti absorpance na čase při oxidaci 3,5-DTBC v koncentraci 1 mmol/L katalyzované komplexem 3 navázaným na magnetické částice. Prostředí pro měření: bezvodý acetonitril. ....	94

## SEZNAM ZKRATEK

EC	Enzyme Commission
H	heavy
L	light
pI	izoelektrický bod
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyfenylalanin
DHPAA	3,4-dihydroxyfenylacetaldehyd
E	enzym
S	substrát
ES	komplex enzym-substrát
P	produkt
$k_{+1}$	rychlostní konstanta, která popisuje rychlost vazby substrátu s enzymem
$k_{-1}$	rychlostní konstanta, která popisuje rychlost zpětného uvolnění substrátu z komplexu
$k_2$	rychlostní konstanta, která popisuje rychlost uvolnění produktu a volného enzymu
$v$	rychlost (enzymové reakce)
$V_{\max}$	limitní rychlost
$K_m$	Michaelisova konstanta
$k_{\text{cat}}$	katalytická konstanta, zároveň to samé jako $k_2$
$k_{\text{cat}}/K_m$	katalytická účinnost
3,5-DTBC	3,5-di-tert-butylcatechol
TRIS	tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
3,5-DTBQ	3,5-di-tert-butyl- <i>o</i> -benzochinon
UV/VIS	ultrafialovo-viditelná oblast spektra



HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
SEM	skenovací elektronové mikroskopie
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu

## Úvod

Katecholázovou aktivitou se rozumí schopnost enzymu, ať už přírodního či umělého, katalyzovat oxidaci katecholu na příslušný *o*-chinon. Mezi přírodní enzymy s touto aktivitou lze zařadit tyrosinázu a katechol oxidázu. Tyto enzymy, běžně nazývané také jako polyfenol oxidázy, mají podobnou strukturu aktivního centra, tedy místa, kde dochází k reakci se substráty. Jejich aktivní centrum je tvořeno dvěma atomy mědi, které jsou koordinačně vázány celkem šesti histidinovými zbytky. Hlavním rozdílem tyrosinázy od katechol oxidázy je schopnost tyrosinázy katalyzovat navíc *ortho*-hydroxylaci monofenolů na katecholy, tzv. kresolázová aktivita, kterou katechol oxidáza postrádá. Z uvedených enzymů se bude tato diplomová práce nadále soustřeďovat pouze na tyrosinázu.

V praxi je možné tyrosinázu využít hned v několika oblastech, mezi které patří např. medicína, potravinářství nebo čištění vod. Také ji lze použít na konstrukci biosenzorů pro stanovení či detekci polyfenolických látek. Nevýhodou tyrosinázy je její krátká životnost. Z tohoto důvodu se nabízí využití syntetizovaných tzv. umělých enzymů neboli biomimetických komplexů mědi. Jedná se tedy o umělé metaloenzymy, jejichž struktura je tvořena mědí vázanou ligandy. Tyto komplexy jsou schopny napodobit katecholázovou (některé i kresolázovou) aktivitu tyrosinázy. Sestrojením biomimetických senzorů lze tak odstranit problémy, se kterými se potýkají biosenzory s imobilizovanou tyrosinázou, jelikož jsou více stabilní, levnější, snadno vyrobitelné, poměrně citlivé a selektivní.

Stanovení katecholázové aktivity tyrosinázy či komplexů lze provést na základě kinetických měření, jejichž principy byly popsány L. Michaelisem a M. L. Mentenovou již v roce 1913. Samotná měření lze uskutečnit různými způsoby, a to např. pomocí elektrochemického měření spotřebovaného kyslíku během oxidační reakce nebo spektrofotometrického či amperometrického sledování vznikajícího oxidačního produktu. K hodnocení sledovaných aktivit se vyjadřují kinetické parametry příslušných reakcí, které je možné vyhodnotit pomocí linearizace původní rovnice dle Michaelis-Mentenové.

Experimentální část této diplomové práce je založena na stanovení a následném srovnání katecholázových aktivit vybraných biomimetických komplexů mědi a enzymu tyrosináza. Nabízí stanovení katecholázové aktivity sledované pomocí elektrochemického měření úbytku kyslíku při oxidaci substrátu a také na základě spektrofotometrického snímání vznikajícího produktu. U spektrofotometrického měření je navíc testován vliv kyslíku na rychlost katalýzy.

Na závěr je představen způsob imobilizace vybraného komplexu na magnetické částice a následné sledování jeho katecholázové aktivity a stability samotné vazby s částicemi. Součástí těchto experimentů je rovněž charakterizace částic s vázaným komplexem.

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Tyrosináza

Tyrosináza je enzym řadící se do třídy oxidoreduktáz. Dle EC (Enzyme Commission) klasifikace je značena číslem EC 1.14.18.1. V přírodě je velmi rozšířená, jelikož ji aktivně produkují rostliny, houby, mikroorganismy, ale také i zvířata a lidé [1, 2]. V těchto organismech se podílí na několika různých funkcích, mezi které patří např. produkce melaninu, což je pigment, který slouží jako ochrana před účinky ultrafialového záření. U savců je melanin biosyntetizován v melanozomech a má podstatný vliv na pigmentaci kůže, očí a vlasů [3]. Činností tyrosinázy také dochází k enzymatickému hnědnutí ovoce, zeleniny a hub. Tvorbu hnědého nebo černého pigmentu lze pozorovat po ukrojení či nechtěnému pohmoždění za přítomnosti vzduchu [4]. Takovéto enzymatické hnědnutí je z hlediska konzumace nežádoucí, jelikož zhoršuje sensorické vlastnosti dané potraviny [5]. Tyrosináza u rostlin také umožňuje tvorbu důležitých polyfenolických látek, jakými jsou třísloviny, flavonoidy či lignin. Dále se v rostlinách při buněčném dýchání účastní regulace redoxního potenciálu a také se podílí na hojení ran [3].

Pro její izolaci se nejvíce využívají bakterie či houby. U bakterií se jedná např. o druhy *Pseudomonas putida* či *Streptomyces castaneoglobisporus* [1]. V případě hub bývá často získávána z druhů *Agaricus bisporus* a *Neurospora crassa* [1, 3]. Stabilní lidskou, resp. savčí tyrosinázu lze v krystalické podobě získat velmi obtížně, jelikož se jedná o vysoce hydrofobní transmembránový glykoprotein [6]. Z tohoto důvodu se využívá konkrétně tyrosináza produkovaná druhem *Agaricus bisporus*, protože je savčí tyrosináze velmi podobná, a tak je vhodná např. pro studium melanogeneze, jinak řečeno syntéze výše zmíněného melaninu, nebo objevování a hodnocení inhibitorů tyrosinázové aktivity [3, 6].

### 1.1.1 **Strukturní vlastnosti**

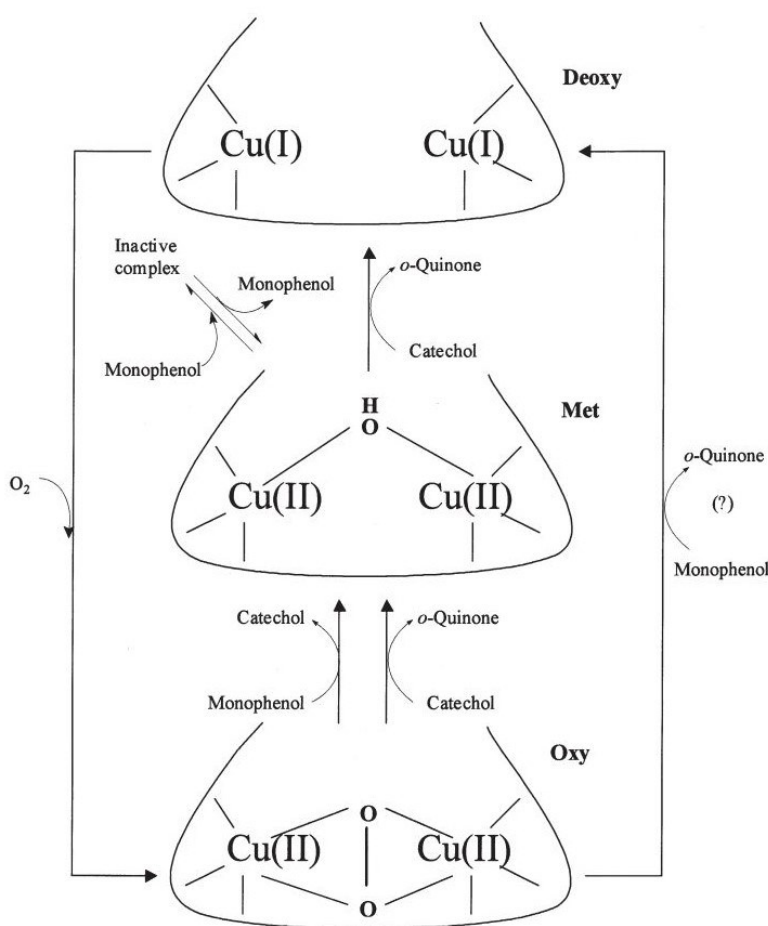
Jelikož je tyrosináza produkována několika odlišnými organismy, jednotlivé tyrosinázy se mezi sebou liší svými strukturními vlastnostmi [3]. Tyrosinázy produkované konkrétně druhy *Streptomyces glaucescens* a *Neurospora crassa* jsou strukturně monomerními proteiny. Zatímco tyrosináza distribuována houbou *Agaricus bisporus* má charakter tetrameru, který je tvořen ze dvou těžších podjednotek H (Heavy) s molekulovou hmotností 43 kDa a dvou lehčích podjednotek L (Light) o molekulové hmotnosti 13,4 kDa [7]. Takováto tyrosináza je celkem složena z 569 aminokyselin [8] vytvářející soustavou z  $\alpha$ -helixů,  $\beta$ -skládaných listů a smyček [9]. Kromě rozdílných struktur mají například i různé izoelektrické body či velikosti (Tab. 1) [8, 10].

**Tabulka 1:** Biochemické vlastnosti tyrosináz produkovaných odlišnými mikroorganismy; převzato a upraveno z [10].

Zdroje	Molekulová hmotnost [kDa/Da]	Optimální teplota [°C]	Optimální pH	pI	Michaelisova konstanta [mmol/L]
<i>Aeromonas media</i>	58000	50	8	4,9	0,64
<i>Beta vulgaris</i>	41000	25	6	nenalezeno	0,067
<i>Lentinula boryana</i>	20, 27, 47	50	6	nenalezeno	1,9 (L-DOPA)
<i>Neurospora crassa</i>	46	nenalezeno	5	nenalezeno	0,18
<i>Agaricus bisporus</i>	112800	25	7	4,75	0,36 (L-tyrosin)
<i>Lentinula edodes</i>	70, 105	nenalezeno	6,5	4,3	0,85 (L-DOPA)
<i>Aspergillus oryzae</i>	67	5,0–6,0	nenalezeno	nenalezeno	nenalezeno
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	45000	25	6,5	4,55	0,9 (L-DOPA)
<i>Trichoderma reesei</i>	43,2	30	9	9,5	7,5 (L-DOPA)
<i>Streptomyces glaucescens</i>	3,09	nenalezeno	nenalezeno	nenalezeno	0,41 (L-tyrosin)
<i>Aspergillus nidulans</i>	50,48	nenalezeno	7	nenalezeno	nenalezeno
<i>Bacillus megaterium</i>	31000	50	7	nenalezeno	0,075 (L-tyrosin)
	35000				0,35 (L-DOPA)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	nenalezeno	75	9	nenalezeno	0,563 (L-tyrosin)
					0,768 (L-DOPA)
<i>Streptomyces sp.</i>	32000	35	7	nenalezeno	1,25 (L-tyrosin)
					4,14 (L-DOPA)
<i>Pseudomonas putida</i>	36000	30	7	nenalezeno	0,23 (L-tyrosin)
	39000				0,33 (L-DOPA)

Čím se ale vzájemně neliší, je jejich aktivní centrum. Jedná se o oblast ve struktuře enzymu, kde dochází k reakci se substráty [3]. Aktivní centrum tyrosinázy je tvořeno dvěma atomy mědi, přičemž na každý z nich jsou koordinačně navázány tři histidinové zbytky [11]. Atomy mědi jsou vzájemně spojeny pomocí kyslíku, který má podstatný vliv na katalytickou

funkci tyrosinázy [3]. Toto aktivní centrum tyrosinázy lze pozorovat celkem ve třech formách, kterými jsou „met“, „oxy“ a „deoxy“ (Obr. 1) [12]. Tzv. „met“ forma obsahuje ve své struktuře dva atomy mědi v oxidačním stavu  $\text{Cu}^{\text{II}}$ , které jsou vázány pomocí malého ligandu, jakým je hydroxidový iont nebo molekula vody [13, 14]. Tyrosináza v „oxy“ formě je met-tyrosináze velmi podobná, akorát dvoumocné atomy mědi jsou zde spojené kyslíkem v podobě peroxidu vodíku. Deoxy-tyrosináza se od předešlých forem liší tím, že atomy mědi se nachází v oxidačním stavu  $\text{Cu}^{\text{I}}$  a zároveň chybí kyslíková vazba [13].



**Obrázek 1:** Tři formy aktivního centra tyrosinázy: „deoxy“, „met“ a „oxy“ forma; převzato z [13].

### 1.1.2 Katalytické vlastnosti

Funkce tyrosinázy spočívá v katalýze dvou odlišných reakcí. První z nich je *ortho*-hydroxylace monofenolů, tzv. monofenolázová reakce, při které dochází ke vzniku *o*-difenolů neboli katecholů. Poté následuje difenolázová reakce, což je oxidace vzniklých *o*-difenolů na *o*-chinony [3, 13].

## Substráty

Pro lidskou a zvířecí tyrosinázu jsou specifické zejména substráty L-tyrosin a L-DOPA (L-3,4-dihydroxyfenylalanin). Tyrosináza produkovaná houbami či rostlinami má mnohem širší spektrum substrátů [13] zahrnující navíc např. 4-methylkatechol, kyselinu chlorogenovou, katechol, katechin, kyselinu kávovou, DHPAA (3,4-dihydroxyfenylacetaldehyd), kyselinu 4-hydroxyfenylpyruvátovou či kyselinu *p*-kumarovou [4].

## Podmínky reakce

Aktivita tyrosinázy je omezena prostředím, ve kterém dané reakce mohou být uskutečněny. Především se jedná o vodná prostředí, kde jsou často využívány roztoky pufrů (např. fosfátový). Dále mohou reakce katalyzované tyrosinázou probíhat v hydrofobních rozpouštědlech, jakými jsou toluen, hexan, tetrachlormethan či chloroform. Naopak zcela neaktivní je v hydrofilních organických rozpouštědlech, kterými jsou ethanol, butanol, acetonitril nebo aceton. Dalším podstatným parametrem pro funkci tyrosinázy je pH prostředí, které se pohybuje v rozmezí 7-8 [8].

## Inhibitory tyrosinázové aktivity

Tyrosinázové inhibitory lze rozlišovat např. dle původu [6, 15] nebo typu sloučeniny, což souvisí s charakterem inhibice [13]. Podle původu se rozdělují na:

- 1) Přírodní – mezi které patří zejména hydrochinony, retinoidy,  $\alpha$ -arbutin, kyselina kojová, kyselina azelaová, kyselina kaftarová, resveratrol a fenylethyl resorcinol [6].
- 2) Semi-syntetické – do této skupiny lze zařadit 9-norlignany nebo semi-syntetické deriváty polymethoxyflavonů [15].
- 3) Syntetické – jakými jsou flavonoidy, polyfenoly, fenylypropanoidy, thiomocovina či sirné heterocyklické sloučeniny [6].

Dle samotného charakteru se inhibitory tyrosinázové aktivity mohou dělit na:

- 1) Chelátory mědi – kde podstatou inhibice je tvorba komplexů s atomy mědi, které jsou obsaženy v aktivním centru tyrosinázy. Do této skupiny lze zařadit flavonoidy [11], kyselinu kojovou, fenylthiomocovinu, diethylthiokarbamát, kyselinu salicylhydroxamovou, kyselinu benzhydroxamovou či tropolon [13].
- 2) Analogy substrátů – což jsou inhibitory kompetitivní vůči monofenolickým a/nebo difenolickým substrátům. Jako analogy substrátů lze považovat resorcinol, kyselinu skořicovou, kyselinu benzoovou nebo 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehyd [13].

U druhého způsobu rozdělení, tedy dle charakteru inhibice, je třeba poznamenat, že se jedná spíše o orientační rozdělení, jelikož některé látky mohou být jak chelátory mědi, tak analogy substrátů. Jako příklad lze uvést flavonoidní látku kvercetin [13, 11, 16].

### **1.1.3 Možnosti praktického využití tyrosinázy**

V důsledku schopnosti reagovat s fenolickými látkami, tyrosináza shledává v praxi využití hned v několika odvětvích. V medicíně je důležitým enzymem pro tvorbu melaninu a jeho následnému použití pro terapeutické účely, dále pro syntézu L-DOPA, který je využíván jako lék v léčbě Parkinsonovi choroby a také pro produkci antibiotické látky linkomycin [3, 17]. Tyrosináza izolovaná z hub nachází své využití i v klinické oblasti, a to v léčbě kožního onemocnění vitiligo [3]. V potravinářství je tyrosináza využívána pro tvorbu hydroxytyrosolu, což je antioxidační látka používaná jako potravinářské aditivum. Také je v tomto odvětví využívána pro schopnost produkovat theaflaviny. Jedná se o polyfenolické látky nacházející se v černém čaji, které mají velmi silné antioxidační a protirakovinné účinky [3, 17]. Další oblastí, kde tyrosináza nalézá své opodstatnění, je čištění odpadních vod obsahující fenoly a jejich deriváty. Mechanismus odstranění těchto látek tkví v oxidaci na nerozpustné sloučeniny, za účasti tyrosinázy, a jejich následnému odfiltrování [3]. V kosmetickém průmyslu je tyrosináza využívána pro schopnost produkovat barviva a také při výrobě samoopalovacích prostředků [17]. V oblasti elektrochemie lze tyrosinázu použít za účelem detekce fenolických látek, a to jako součást elektrochemického biosenzoru [3].

## **1.2 Spotřeba kyslíku během enzymatické reakce**

Enzymy využívající při své katalytické činnosti kyslík jsou tzv. oxygenázy. Jedná se o podskupinu třídy enzymů zvaných oxidoreduktázy. Oxygenázy oxidují substráty inkorporací molekulárního kyslíku. Podle počtu vnesených atomů kyslíku rozlišujeme oxygenázy do dvou skupin [18]. Je-li do substrátu včleněn pouze jeden atom mluvíme o tzv. monooxygenázách, přičemž druhý atom molekulárního kyslíku je redukován na vodu [19]. Příkladnou monooxygenázou je enzym tyrosináza [20]. Druhou skupinou jsou dioxygenázy, které vnášejí do substrátu dva atomy kyslíku [19].

Na základě měření spotřebovaného kyslíku při reakcích katalyzovaných oxygenázami lze vyhodnotit kinetické parametry dané reakce, které poskytnou užitečné informace o příslušných enzymech, substrátech či případných efektorech majících vliv na příslušné enzymové reakce [21].



## 1.2.1 Metody měření spotřeby kyslíku

### Amperometrické měření

Kyslíkové sondy založené na principu amperometrie patří dnes již mezi klasické, ale také nejčastěji používané. Typově se jedná o tzv. Clarkovy elektrody, které byly poprvé navrženy L. Clarkem v roce 1962 [22]. Clarkova elektroda je tvořena platinovou či zlatou katodou, referenční chloridostříbrnou anodou, vnitřním elektrolytem a polopropustnou membránou, která je propustná pro kyslík a je obvykle zhotovena z teflonu nebo polyethylenu [23]. Podstatou této techniky je průchod molekul kyslíku z měřeného roztoku skrz membránu a jejich následná elektrochemická redukce u povrchu měrné katody, přičemž dochází k průtoku elektrického proudu. Tento elektrický proud je snímán a je úměrný množství kyslíku obsaženého v proměřovaném roztoku [22].

### Vysokoučinný respirometr Oroboros Oxygraph-2k (O2k)

Na principu Clarkovy elektrody pracuje také polarografická kyslíková sonda, která je součástí přístroje Oroboros Oxygraph-2k (O2k, OROBOROS INSTRUMENTS, Innsbruck, Rakousko). Tento přístroj je široce využíván pro výzkum v oblastech bioenergetiky, mitochondriální fyziologie či diagnostice mitochondriálních onemocnění [24, 25]. Měření spotřeby kyslíku během buněčné respirace je zde prováděno v uzavřené komoře. Účelem uzavřeného systému je zamezení přístupu dalšího kyslíku z okolního prostředí. Součástí respirometru Oroboros mohou být i moduly pro spektrofotometrická a fluorescenční měření, což umožňuje analyzovat simultánně s mitochondriální respirací řadu dalších diagnosticky podstatných buněčných funkcí. Konkrétně zavedením fluorescenčního prvku do systému lze navíc detekovat reaktivní formy kyslíku a mitochondriální membránový potenciál [25].

### Fluorescenční měření

Využití fluorescenčních kyslíkových sond otevírá další možnost, jak stanovit množství spotřebovaného kyslíku. Výše uvedená Clarkova elektroda je sice poměrně levná, snadno kalibrovatelná a poskytuje rychlou odpověď, ale má také jisté nevýhody. Mezi tyto nevýhody patří zejména samotná spotřeba kyslíku sondou během měření, na což má vliv rychlost míchání měřeného roztoku. Dále může docházet k rušení měření přítomností interferujících látek, kterými v tomto případě jsou sulfan, oxid uhličitý, funkční skupiny proteinů či některé organické sloučeniny. Fluorescenční kyslíková sonda není na tyto interferenty citlivá, a proto je také považována za výhodnou alternativu ke Clarkově elektrodě [26].

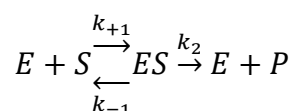
Podstatnou součástí tohoto typu kyslíkové sondy jsou tzv. fluorofory, což jsou molekuly schopné fluoreskovat, tedy absorbovat ultrafialové záření a následně ho emitovat v podobě fluorescenčního záření. Konkrétně se jedná o organická barviva nebo komplexy ruthenia či platiny. U fluorescenčních kyslíkových sond jsou fluorofory buď imobilizované na polymerních filmech, které jsou propustné pro kyslík, anebo jsou součástí organicky modifikovaných silikátových sol-gel matric [26]. Samotné měření je pak založeno na zhášení fluorescence přítomného fluoroforu molekulárním kyslíkem. V důsledku ubývajícího množství kyslíku v roztoku dochází následně ke zvýšení fluorescenčního signálu [26, 27].

### 1.3 Kinetické parametry enzymové reakce

Strukturně se enzymy řadí mezi bílkoviny a v reakci se substráty vystupují jako tzv. biokatalyzátory. Na rozdíl od chemických katalyzátorů se vyznačují svou vysokou specifitou k daným substrátům. Z tohoto důvodu mohou enzymy katalyzovat přeměnu pouze určité skupiny či pouze jedné určité látky [28]. K hodnocení rychlosti reakce a afinity enzymu k danému substrátu se využívá kinetických parametrů enzymové reakce.

#### 1.3.1 Kinetická měření dle Michaelis-Mentenové

Základní poznatky o průběhu enzymatických reakcí byly představeny Leonorem Michaelisem a Maud Leonorou Mentenovou již v roce 1913. Předmětem jejich studia bylo měření rychlosti štěpení sacharózy enzymem invertáza na glukózu a fruktózu [29]. Pro popis kinetiky enzymové reakce bylo tak navrženo jednoduché schéma:



Enzym (E) spolu se substrátem (S) nejdříve vytváří komplex (ES), který následně uvolní produkt (P) a volný enzym. Eventuelně může dojít ke zpětnému uvolnění substrátu a volného enzymu. Kinetiku reakcí zde určují rychlostní konstanty, které popisují rychlost vazby substrátu s enzymem ( $k_{+1}$ ), rychlost zpětného uvolnění ( $k_{-1}$ ) substrátu z komplexu a také rychlost uvolnění produktu a volného enzymu ( $k_2$ , také lze značit jako  $k_{cat}$ ) [30]. Pro rychlost enzymové reakce ( $v$ ) dle Michaelis-Mentenové byla odvozena rovnice [31]:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

- $[S]$  = koncentrace substrátu

- $V_{max}$  (limitní rychlost) a  $K_m$  (Michaelisova konstanta) = kinetické parametry, o kterých bude více pojednáno níže

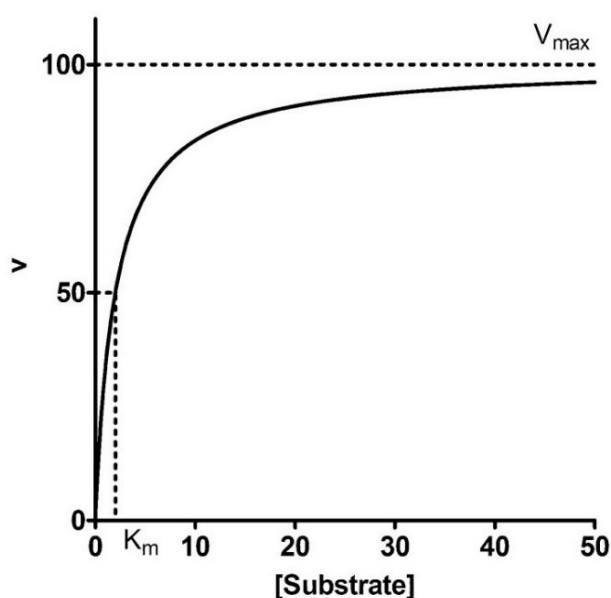
### Saturační křivka

Na základě studie kinetiky dané enzymové reakce bylo zjištěno, že v případě konstantní koncentrace enzymu a měnící se, resp. postupně zvyšující se, koncentrace substrátu, bude mít závislost počáteční rychlosti na koncentraci substrátu hyperbolický charakter (Obr. 2) [29]. Tato závislost se také označuje jako saturační křivka, jelikož se zvyšující se koncentrací substrátu dochází k postupné saturaci (nasycení) enzymu substrátem. Při určité, dostatečně velké koncentraci substrátu dochází k plnému nasycení enzymu a veškerý enzym je tak vázán se substrátem v komplexu. Z tohoto důvodu je při vysokých koncentracích substrátu reakční rychlost konstantní, a tudíž nezávislá na koncentraci substrátu. V tomto koncentračním rozmezí je časový průběh enzymové reakce vyjádřen kinetickou rovnicí nultého řádu vzhledem k substrátu:

$$v \approx \frac{V_{max} \cdot [S]}{[S]} \approx V_{max}$$

Naopak při nízkých koncentracích substrátu je tato závislost lineární a enzymová reakce zde probíhá jako reakce prvního řádu vzhledem k substrátu [31]:

$$v \approx \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m}$$



**Obrázek 2:** Saturační křivka: Závislost rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu; převzato z [28].

Ze saturační křivky lze odečíst již zmíněné kinetické parametry enzymové reakce, kterými jsou Michaelisova konstanta ( $K_m$ ) a mezní (limitní) rychlost ( $V_{max}$ ) [28, 31]. Limitní rychlostí se rozumí rychlost, při které je veškerý enzym vázaný ve formě komplexu enzym–substrát [32]. Zároveň je její hodnota úměrná množství aktivního enzymu [31]. Michaelisova konstanta odpovídá koncentraci substrátu, při které bylo dosaženo poloviny limitní rychlosti [28, 31]. Může být rovněž definována jako koncentrace substrátu, při níž došlo k poloviční saturaci aktivního centra enzymu daným substrátem. Jelikož odpovídá koncentraci je vyjadřována v koncentračních jednotkách [31]. Hodnota Michaelisovy konstanty je závislá na okolním prostředí, a to zejména na teplotě a pH [33]. Také se liší mezi jednotlivými enzymy a při reakcích téhož enzymu s různými substráty. Naopak její velikost nezávisí na koncentraci enzymu. Michaelisova konstanta je zároveň relativním měřítkem afinity enzymu k příslušnému substrátu či stability vzniklého komplexu enzym–substrát. Lze tedy říct, že čím nižší je její hodnota, tím vyšší je afinita enzymu k substrátu [31].

Dalšími důležitými kinetickými parametry jsou katalytická konstanta ( $k_{cat}$ ) a katalytická účinnost ( $k_{cat}/K_m$ ). Katalytická konstanta, také označovaná jako tzv. „číslo přeměny“ (z ang. „turnover number“), je definována jako počet molekul substrátu, které mohou být přeměněny jednou molekulou enzymu nasyceného substrátem za jednotku času. Velikost katalytické konstanty se tedy obvykle udává v  $s^{-1}$  či  $min^{-1}$ . Hodnotu  $k_{cat}$  lze vyjádřit ze vztahu:

$$V_{max} = k_{cat} \cdot [E]_0$$

- $[E]_0$  = počáteční koncentrace enzymu

Katalytická účinnost odpovídá poměru katalytické a Michaelisovy konstanty a její rozměr je vyjadřován v jednotkách  $L/mol \cdot s$ . Tento kinetický parametr je často využíván pro porovnání využití různých substrátů daným enzymem. Zároveň je katalytická účinnost považována za měřítko substrátové specifity či relativní vhodnosti určitého substrátu pro reakci s příslušným enzymem. Tedy čím vyšší je její hodnota, tím více je daný substrát vhodný [31].

#### Experimentální určení kinetických parametrů enzymové reakce

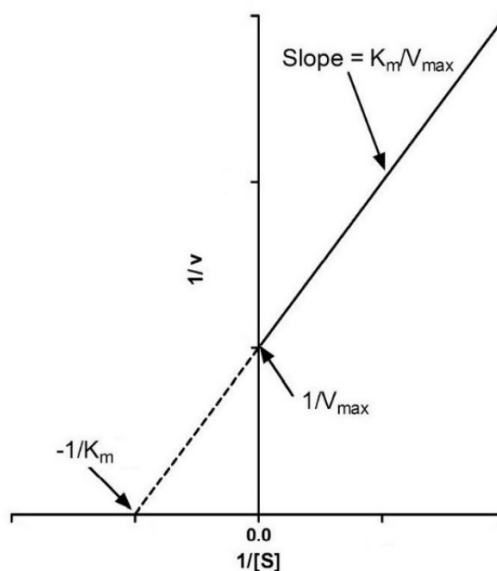
Pro přesné určení Michaelisovy konstanty a limitní rychlosti se obvykle aplikují metody, jejichž podstatou je linearizace rovnice dle Michaelis–Mentenové. Naměřená data lze následně proložit lineární regresí a v grafické podobě tak získat přímku [34]. Mezi takové metody patří linearizace podle Lineweavera a Burka, linearizace dle Eadieho a Hofstee či linearizace dle Hanese a Woolfa [35].

### Linearizace dle Lineweavera a Burka

Na základě této metody se původní rovnice dle Michaelis-Mentenové linearizuje do podoby:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Jak je z rovnice již patrné, do grafu (Obr. 3) se následně vynáší reciproké hodnoty rychlosti v závislosti na recipročných koncentracích substrátu. Proložení dat získáme přímku, jejichž směrnici je poměr Michaelisovy konstanty a limitní rychlosti. V místě, kde přímka protíná svislou osu, lze odečíst obrácenou hodnotu limitní rychlosti. Michaelisova konstanta se zde nachází jako záporná reciproká hodnota, kterou lze získat po protažení přímky do záporných hodnot vodorovné osy a odečíst ji v místě kde se přímka s touto osou protne [28, 35].



**Obrázek 3:** Linearizace dle Lineweavera a Burka: Závislost obrácených hodnot rychlostí na obrácených hodnotách koncentrací substrátu; převzato a upraveno z [28].

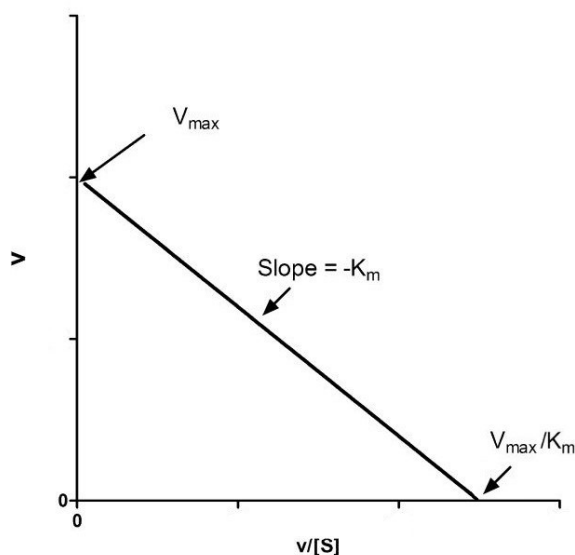
Linearizace dle Lineweavera a Burka je často využívána pro její jednoduchost. Bohužel ale nalézá i jisté nevýhody [35]. Jelikož tato metoda využívá recipročných hodnot, je poměrně citlivá na chyby v měření, ke kterým dochází především u nižších koncentracích [28]. Další nevýhodou tohoto způsobu vyhodnocení je, že v grafickém zobrazení datové body náležící vyšším koncentracím substrátu jsou shlukovány do úzké oblasti, a naopak body patřící nižším koncentracím jsou vzdáleny a v grafu zdůrazněny. Což se následně může projevit změnou sklonu přímky a vést k chybnému stanovení kinetických parametrů [34].

### Linearizace dle Eadieho a Hofstee

Lineární podobu rovnice Michaelis-Mentenové získanou transformací Eadie-Hofstee vyjadřuje vztah:

$$v = V_{max} - K_m \frac{v}{[S]}$$

Výsledným grafem bude tedy závislost rychlosti na poměru rychlosti ke koncentraci substrátu (Obr. 4). Záporná hodnota Michaelisovy konstanty zde představuje směrnici přímky. Limitní rychlost v tomto případě vyjadřuje úsek na svislé ose, tedy místo, kde se přímka s touto osou protíná [28, 35]. Protažením přímky směrem k vodorovné ose získáme v místě průtnutí s touto osou hodnotu představující poměr limitní rychlosti k Michaelisově konstantě [35].



**Obrázek 4:** Linearizace dle Eadie-Hofstee: Závislost rychlosti na poměru rychlosti ke koncentraci substrátu; převzato a upraveno z [28].

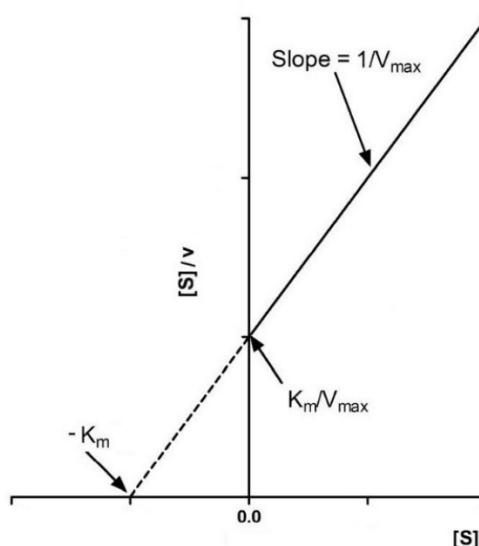
Linearizace dle Eadie-Hofstee je pro stanovení kinetických parametrů enzymové reakce z hlediska přesnosti vhodnější než metoda dle Lineweavera a Burka [35]. Avšak výsledné parametry mohou být také zatíženy chybou. Hlavní nevýhodou této metody je, že závislá proměnná, tedy rychlost, je promítnuta v obou osách [28, 34]. Z tohoto důvodu se případné experimentální chyby pak také projeví na obou osách [36].

### Linearizace dle Hanese a Woolfa

Linearizací rovnice Michaelis-Mentenové na základě metody dle Hanese a Woolfa dostaneme následující vztah:

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{1}{V_{max}} \cdot [S]$$

V grafické podobě (Obr. 5) se na svislou osu vynáší poměr koncentrace substrátu a rychlosti a na vodorovnou osu koncentrace substrátu. Směrnicí přímky této závislosti je převrácená hodnota limitní rychlosti. Poměr Michaelisovy konstanty a limitní rychlosti vyjadřuje úsek na svislé ose. Hodnota samotné Michaelisovy konstanty se promítne v záporné podobě na vodorovné ose, a to v místě protnutí přímky s touto osou [35, 36].



**Obrázek 5:** Linearizace dle Hanese a Woolfa: Závislost poměru koncentrace substrátu a rychlosti na koncentraci substrátu; převzato a upraveno z [28].

Tento způsob linearizace je považován ze všech tří jako nejpřesnější. Avšak hlavní nevýhodou této metody je, podobně jako u linearizace Eadie-Hofstee, že ani jedna z os nepředstavuje nezávislé hodnoty, jelikož v obou se promítá koncentrace substrátu [36].

Obecně jsou linearizační techniky především vhodné k vizualizaci dat [36]. Pomocí nich lze odhalit atypické kinetiky, které se v grafické podobě (speciálně u transformace Eadie-Hofstee) od standardních profilů značně odchyľují [28]. Z důvodu zamezení chyb v důsledku linearizace se kinetické parametry čím dál častěji stanovují nelineární regresní analýzou, která umožňuje určení parametrů z netransformovaných dat [36].

## 1.4 Biomimetické komplexy mědi

Komplexy mědi, které jsou schopny imitovat enzymovou aktivitu, se řadí do skupiny supramolekulárních umělých enzymů. Jedná se o poměrně širokou skupinu syntetických enzymů, které se také označují jako tzv. synzomy [37]. Obecně supramolekulární interakce, kterými jsou vodíkové vazby, hydrofobní či elektrostatické interakce, van der Waalsovy síly a vazby kov–ligand, hrají důležitou roli jednak v rozpoznání substrátu, tak i v samotném procesu enzymové katalýzy [38]. Supramolekulární umělé enzymy tedy stejně jako přírodní enzymy potřebují k vyvolání jejich aktivity dva interakční mechanismy, jakými jsou selektivní vazba na substrát a samotná katalýza. Mezi synzomy lze zařadit syntetické metaloenzymy, cyklohextriny či kalixareny [37]. Metaloenzymy jsou skupina enzymů, v jejichž proteinové struktuře je obsažen jeden či více atomů prvku přechodového kovu, kterým může být např. železo, mangan či měď [39, 40]. Jako konkrétní příklad lze zde uvést právě enzym tyrosináza [41]. Napodobeniny těchto enzymů čili umělé metaloenzymy jsou látky tvořené malými molekulami, tzv. ligandy, které vazbou s kovy vytváří komplexní sloučeniny. Takovéto komplexy jsou syntetizovány a zkoumány jako strukturní a funkční modely příslušných metaloenzymů, které lze využít k pochopení mechanismů daných enzymových reakcí [39].

### 1.4.1 **Komplexy mědi imitující katalytickou aktivitu tyrosinázy**

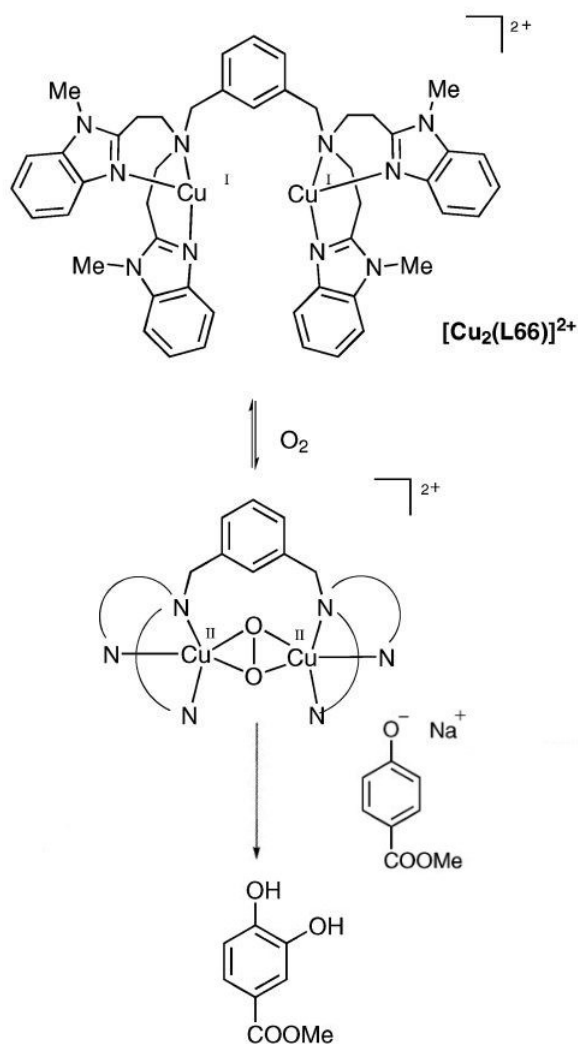
Komplexy mědi napodobující katalytickou aktivitu tyrosinázy patří do již zmíněných umělých metaloenzymů. Vázané ionty mědi zde imitují aktivní centrum tyrosinázy [41]. Z tohoto důvodu jsou tyto komplexy, stejně jako tyrosináza, schopny katalyzovat oxidaci fenolických a katecholických substrátů na chinony [42].

Obecně lze komplexy mědi rozlišovat podle počtu přítomných iontů mědi na jednojaderné (mononukleární), které obsahují pouze jeden iont mědi a vícejaderné (polynukleární) komplexy, kterými jsou nejčastěji dvoujaderné se dvěma ionty, tříjaderné se třemi ionty a čtyřjaderné, v jejichž struktuře jsou čtyři ionty mědi [43].

#### Kresolázová aktivita biomimetických komplexů mědi

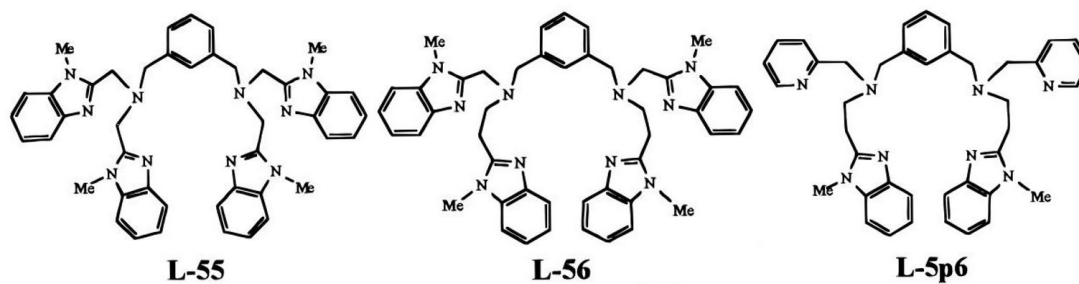
Již v roce 1991 Casella a jeho kolegové představili první syntetickou komplexní sloučeninu, která byla schopna reverzibilně vázat kyslík a následně katalyzovat oxidaci fenolu na příslušný katechol [41, 44, 45]. Zároveň to byl první fungující modelový systém imitující tyrosinázu a kresolázovou aktivitu dalších metaloenzymů. Jednalo se o dvoujaderný komplex  $[\text{Cu}_2(\text{L-66})]^{2+}$ , kde ligand L-66 představoval  $\alpha, \alpha'$ -bis{bis[2-(1-methyl-2-benzimidazolyl)ethyl]amino}-m-xylen. Reakce se substráty probíhala za velmi nízkých teplot, např. při  $-60^\circ\text{C}$  byl oxidován substrát 4-methoxyfenol na odpovídající katechol (Obr. 6) [41].





**Obrázek 6:** Struktura dvoujaderného komplexu  $[\text{Cu}_2(\text{L-66})]^{2+}$  a mechanismus jeho reakce s kyslíkem a následné hydroxylace 4-methoxyfenolu na katechol; převzato a upraveno z [46].

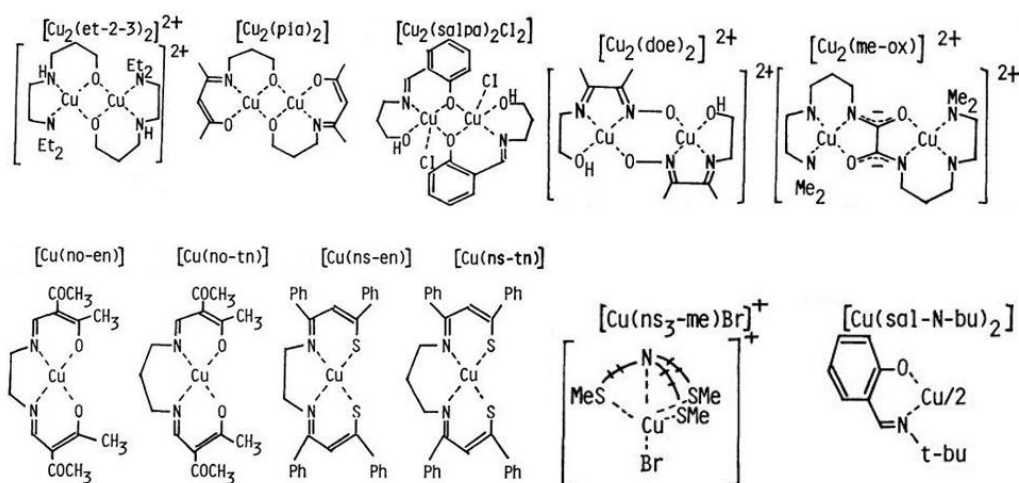
Později byla vyvinuta celá série dalších dvoujaderných komplexů mědi s kresolázovou aktivitou odvozených od *m*-xylyl tetrabenzimidazolových ligandů. Těmito komplexy jsou např.  $[\text{Cu}_2(\text{L-55})]^{2+}$ ,  $[\text{Cu}_2(\text{L-56})]^{2+}$  či  $[\text{Cu}_2(\text{L-5p6})]^{2+}$  [47]. Struktury těchto ligandů jsou znázorněny na obrázku č. 7.



**Obrázek 7:** Struktura ligandů L-55, L-56 a L-5p6; převzato a upraveno z [47].

## Katecholázová aktivita biomimetických komplexů mědi

Strukturou a katalytickou aktivitou mono a dinukleárních komplexů mědi při oxidaci katecholů na chinony se poprvé zabývali Nishida a kol. v roce 1980 [41, 48]. Příklady těchto komplexů jsou uvedeny na obrázku č. 8. Jako substráty byly použity kyselina askorbová a 3,5-di-tert-butylkatechol (3,5-DTBC). V rámci studie bylo zjištěno, že planární mononukleární komplexy mědi mají nižší katecholázovou aktivitu v porovnání s mononukleárními komplexy, které strukturně planární nejsou. Dále prokázali, že dinukleární komplexy jsou více katalyticky aktivní než mononukleární [48]. Toto zjištění bylo následně potvrzeno i dalšími studiemi [49, 50] a vysvětleno tím, že pro vazbu dvou fenolických kyslíků katecholu a následnou dvou elektronovou redoxní reakci je zapotřebí dvou atomů mědi, které budou vůči sobě v krátké vzdálenosti [49]. Nishida a kol. tuto vzdálenost definovali pod 5 Å [48].



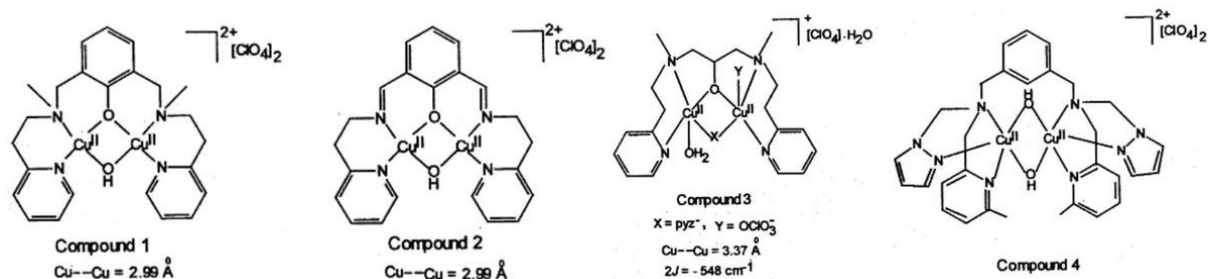
**Obrázek 8:** Struktura vybraných komplexů mědi; z publikace Nishida a kol.; převzato a upraveno z [48].

### Přehled vybraných komplexů mědi s katecholázovou aktivitou a jejich porovnání

V průběhu dalších let bylo syntetizováno velké množství různých komplexů mědi a jejich katecholázovou aktivitou se zabývala celá řada studií. Pro hodnocení a vzájemné porovnávání katalytické aktivity jednotlivých biomimetických komplexů mědi se využívají stejné kinetické parametry jako u enzymů. Těmito parametry jsou tedy Michaelisova konstanta, limitní rychlost, katalytická konstanta a katalytická účinnost.

Mukherjee a kol. (2002) studovali katecholázovou aktivitu celkem šesti odlišných dinukleárních komplexů mědi, avšak kinetické parametry byly stanoveny pouze u čtyř z nich, a z tohoto důvodu jsou zde uvedené pouze tyto komplexy (Obr. 9). Systematické názvy studovaných

komplexů a názvy jejich ligandů jsou znázorněny v tabulce č. 2. Zvoleným substrátem pro redoxní reakci byl 3,5-DTBC, jehož roztok byl připraven rozpuštěním v acetonitrilu. Komplexy byly taktéž rozpuštěny v acetonitrilu. Kinetické parametry jednotlivých reakcí (Tab. 3) byly vyhodnoceny na základě spektrofotometrického měření [51].



**Obrázek 9:** Struktura studovaných komplexů mědi; z publikace Mukherjee a kol.; převzato a upraveno z [51].

**Tabulka 2:** Vzorce studovaných komplexů mědi a strukturní názvy jejich ligandů; převzato a upraveno z [51].

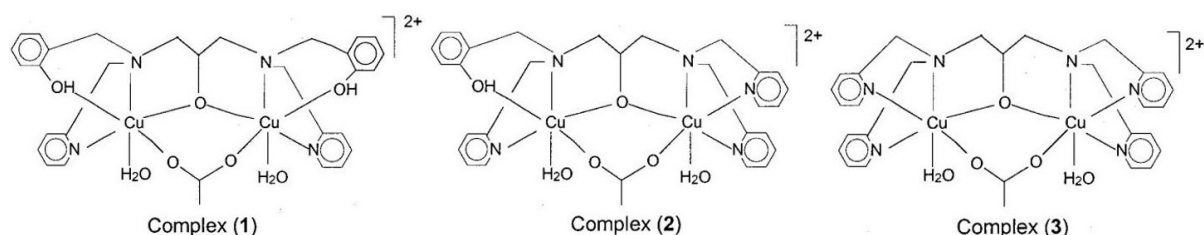
Komplex	Vzorec
1	$[\text{Cu}_2(\text{L}^1 - \text{O})(\mu\text{-OH})][\text{ClO}_4]_2$
2	$[\text{Cu}_2(\text{L}^2 - \text{O})(\mu\text{-OH})][\text{ClO}_4]_2$
3	$[\text{Cu}_2(\text{L}^3 - \text{O})(\mu\text{-C}_3\text{H}_3\text{N}_2)(\text{OClO}_3)(\text{H}_2\text{O})][\text{ClO}_4]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
4	$[\text{Cu}_2(\text{L}^4)(\mu\text{-OH})_2][\text{ClO}_4]_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Ligand	Strukturní název
L <sup>1</sup> – OH	2,6-[N-methyl-N-(2-pyridylethyl)aminomethyl]fenol
L <sup>2</sup> – OH	2,6-bis[N-(2-pyridylethyl)iminomethyl]fenol
L <sup>3</sup> – OH	1,3-bis[N-methyl-N-(2-pyridylethyl)amino]propan-2-ol
L <sup>4</sup>	α,α'-bis[N-(6-methyl-2-pyridylmethyl)-N-(pyrazol-1-ylmethyl)amino]-m-xylen

**Tabulka 3:** Kinetické parametry studovaných komplexů mědi; převzato a upraveno z [51].

Komplex	K <sub>m</sub> [mmol/L]	V <sub>max</sub> [mmol/L.s]	k <sub>cat</sub> [s <sup>-1</sup> ]	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> [L/mmol.s]
1	11,17	7,6 · 10 <sup>-2</sup>	1,52	0,136
2	0,42	2,33 · 10 <sup>-3</sup>	0,045	0,107
3	2,62	1,43 · 10 <sup>-3</sup>	0,029	0,011
4	4,9	1,4 · 10 <sup>-3</sup>	0,028	0,006

Dle studie Mukherjee a kol. (2002) jsou rozdílné katalytické aktivity komplexů způsobeny jejich elektronickými vlastnostmi a odlišnou geometrií okolí iontů mědi. Na účinnost katalýzy má také podstatný vliv přístupnost iontu mědi pro vazbu se substrátem, jelikož čím těsnější bude jejich interakce, tím vyšší bude účinnost katalýzy [51].

Tři strukturně podobné dinukleární komplexy mědi (Obr. 10, Tab. 4) syntetizovali a jejich katecholázovou aktivitu následně studovali Neves a kol. (2002). Jednotlivé komplexy se navzájem lišily počtem fenolových skupin koordinačně vázaných s mědí. Kinetická měření byla provedena spektrofotometricky opět na základě oxidace 3,5-DTBC. Substrát i komplexy byly rozpuštěny v methanolu. Příslušné reakce byly měřeny v prostředí methanolu syčeného kyslíkem za přítomnosti vodného TRIS (tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) pufru. Methanol byl syčen kyslíkem z důvodu větší tvorby produktu v porovnání s jeho produkcí v anaerobním prostředí [52]. V tabulce č. 5 jsou uvedeny kinetické parametry reakcí katalyzovaných jednotlivými komplexy.



**Obrázek 10:** Struktura syntetizovaných a studovaných komplexů mědi; z publikace Neves a kol.; převzato a upraveno z [52].

**Tabulka 4:** Vzorce měřených komplexů mědi a strukturní názvy jejich ligandů; převzato a upraveno z [52].

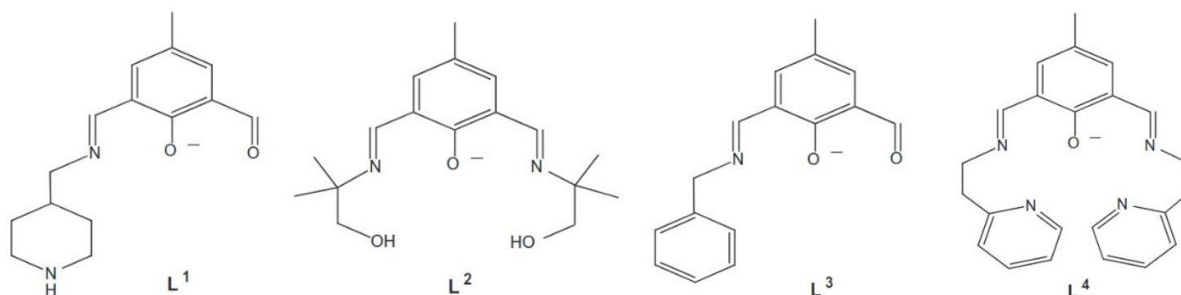
Komplex	Vzorec
1	$[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{bbppnol})(-\text{OAc})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
2	$[\text{Cu}_2(\text{Hbtppnol})(\mu-\text{OAc})](\text{ClO}_4)_2$
3	$[\text{Cu}_2(\text{P1-O}^-)(\text{OAc}^-)](\text{ClO}_4)_2$
Ligand	Strukturní název
$\text{H}_3\text{bbppnol}$	<i>N,N'</i> -bis(2-hydroxybenzyl)- <i>N,N'</i> -bis(pyridylmethyl)]-2-hydroxy-1,3-propandi-amin
$\text{H}_2\text{btppnol}$	<i>N</i> -(2-hydroxybenzyl)- <i>N,N',N'</i> -tris(2-pyridylmethyl)-1,3-diaminopropan-2-ol
P1-OH	1,3-bis[bis(2-pyridylmethyl)amino]propanolát

**Tabulka 5:** Kinetické parametry reakcí katalyzovaných příslušnými dvoujadernými komplexy mědi; převzato a upraveno z [52].

Komplex	$K_m$ [mmol/L]	$V_{max}$ [mmol/L.s]	$k_{cat}$ [ $s^{-1}$ ]	$k_{cat}/K_m$ [L/mmol.s]
1	0,79	$1,9 \cdot 10^{-4}$	0,0079	0,01
2	0,95	$1,9 \cdot 10^{-4}$	0,0078	0,0081
3	0,86	$6,7 \cdot 10^{-5}$	0,0028	0,0033

Rozdíly v katalytických aktivitách jednotlivých komplexů jsou v práci Nevese a kol. (2002) opět odůvodněny na základě odlišných elektrochemických vlastností a přístupností iontů mědi pro vazbu se substrátem [52].

Syntézou čtyř dinukleárních komplexů mědi (Tab. 6) a porovnáním jejich katecholázové aktivity v závislosti na rozpouštědle se zabývali Banu a kol. v roce 2012. Struktury čtyř odlišných ligandů obsažených v těchto komplexech jsou znázorněny na obrázku č. 11. Komplexy byly postupně rozpuštěny v acetonitrilu, dichlormethanu, dimethylsulfoxidu, čistém methanolu a methanolu ředěném vodou v poměru 1:1. Substrátem pro zjištění katecholázové aktivity byl 3,5-DTBC. Kinetiky příslušných reakcí byly měřeny spektrofotometricky za aerobních podmínek [53].



**Obrázek 11:** Struktury ligandů studovaných komplexů; z publikace Banu a kol.; převzato z [53].

**Tabulka 6:** Vzorce studovaných dinukleárních komplexů mědi a strukturní názvy jejich ligandů; převzato a upraveno z [53].

Komplex	Vzorec
1	$[\text{Cu}_2(\text{L}^1\text{H})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_2](\text{NO}_3)_2$
2	$[\text{Cu}_2(\text{L}^2)(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)$
3	$[\text{Cu}_2(\text{L}^3)_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)$
4	$[\text{Cu}_2(\text{L}^4)(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)_2$
Ligand	Strukturní název
L <sup>1</sup>	2-formyl-4-methyl-6-(4-(aminomethyl)-piperidine)iminomethyl-fenolát
L <sup>2</sup>	2,6-bis(2-amino-2-methyl-1-propanol)iminomethyl-4-methyl-fenolát
L <sup>3</sup>	2-formyl-4-methyl-6-(benzylamine)iminomethyl-fenolát
L <sup>4</sup>	2,6-bis(2-aminoethylpyridine)iminomethyl-4-methyl-fenolát

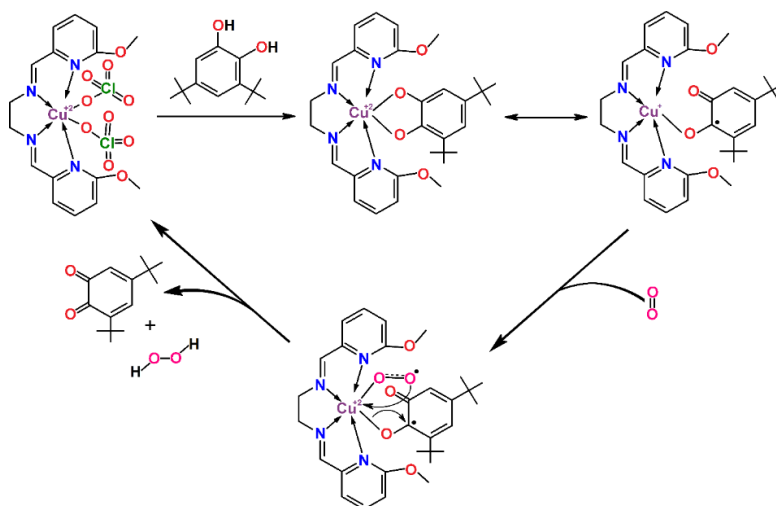
Nejvyšší katalytická účinnost komplexů pro aerobní oxidaci 3,5-DTBC na 3,5-DTBQ (3,5-di-tert-butyl-*o*-benzochinon) byla zjištěna v prostředí methanol-voda a v čistém methanolu. Pro reakce v těchto rozpouštědlech byly stanoveny kinetické parametry, které jsou prezentovány v tabulce č. 7. V dimethylsulfoxidu došlo pouze ke vzniku aduktu komplex-substrát, avšak nikoli k následné oxidaci substrátu na chinon. Tvorba 3,5-DTBQ nebyla zaznamenána ani v prostředí acetonitrilu a dichlormethanu [53].

**Tabulka 7:** Kinetické parametry reakcí jednotlivých komplexů s 3,5-DTBC v čistém methanolu a methanolu ředěného vodou v poměru 1:1; převzato a upraveno z [53].

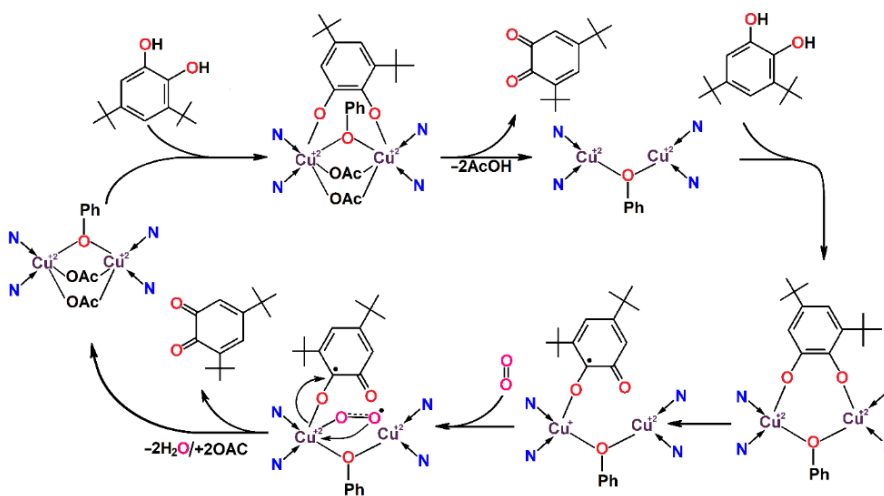
Rozpouštědlo: čistý methanol		
Komplex	V <sub>max</sub> [mmol/L.s]	k <sub>cat</sub> [s <sup>-1</sup> ]
1	0,82	8,22
2	0,09	0,92
3	0,2	2
4	0,06	0,65
Rozpouštědlo: methanol-voda (1:1)		
Komplex	V <sub>max</sub> [mmol/L.s]	k <sub>cat</sub> [s <sup>-1</sup> ]
1	0,76	7,67
2	0,54	5
3	0,1	1
4	0,4	4

### Substráty pro zjištění katecholázové aktivity biomimetických komplexů mědi

Mezi vhodné substráty pro zjištění katecholázové aktivity komplexů mědi lze uvést 3,5-DTBC [39] či některé neurotransmitery, kterými jsou především dopamin, serotonin [54] adrenalin a noradrenalin [55]. Jak je již z výše uvedených studií zjevné, nejčastěji voleným substrátem je 3,5-di-tert-butylkatechol. Přírodní metaloenzymy, jako tyrosináza či katechol oxidáza, vždy oxidují 3,5-DTBC na 3,5-DTBQ za vzniku vody, jako produktu čtyřelektronové redukce kyslíku. Zatímco u některých biomimetických komplexů mědi je na místo vody možná produkce peroxidu vodíku, který je zde produktem dvouelektronové redukce kyslíku. Mechanismus vazby komplexu s 3,5-DTBC a jeho následné oxidace je rozdílný v závislosti na tom, zda je reakce katalyzovaná mononukleárními či dinukleárními komplexy [39]. Na tyto rozdíly poukazují obrázky č. 12 a 13.



**Obrázek 12:** Princip oxidace 3,5-DTBC na 3,5-DTBQ katalyzované mononukleárním komplexem mědi; převzato z [56].



**Obrázek 13:** Princip oxidace 3,5-DTBC na 3,5-DTBQ katalyzované dinukleárním komplexem mědi; převzato z [57].

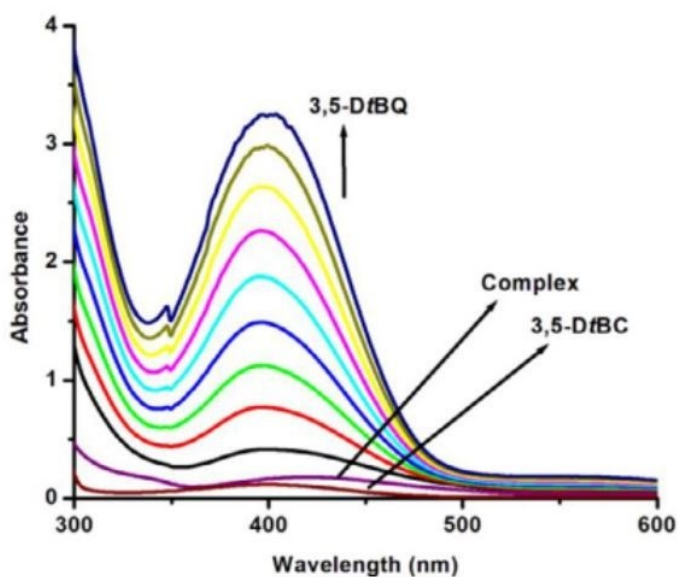


### Metody pro stanovení katecholázové aktivity biomimetických komplexů mědi

Pro měření katecholázové aktivity přírodních enzymů a komplexů mědi, které tyto enzymy napodobují, se využívá stejných metod. Obecně je rozlišujeme dle toho, zda během katalyzované oxidace substrátu zaznamenáváme množství spotřebovaného kyslíku či tvorbu produktu [58]. Úbytek kyslíku se nejčastěji stanovuje amperometricky nebo fluorescenčně (viz podkapitola 1.2.1). Zatímco stanovení katecholázové aktivity založené na tvorbě příslušného produktu se obvykle provádí spektrofotometricky [59]. Mezi další často využívané metody patří metody elektrochemické, a to zejména amperometrie [60], pomocí které lze také detekovat vznikající produkt a cyklická voltametrie, kterou je možné charakterizovat elektrochemické chování daného komplexu/enzymu během redoxní reakce [61] a stanovit příslušné kinetické parametry [62]. Pro sledování kinetiky těchto reakcí je také použitelná radiometrie, manometrie či hmotností spektrometrie s elektrosprejovou ionizací a iontovou pastí pro rozlišení iontů na základě jejich hmot [63].

#### *Spektrofotometrické měření*

Vlivem vznikajícího produktu oxidace substrátu, která je katalyzovaná komplexem či enzymem, dochází při určité vlnové délce k nárůstu absorbance. Vlnová délka, při které absorbuje konkrétně 3,5-DTBQ je přibližně 400 nm. Obrázek č. 14 představuje charakteristický záznam závislosti absorbance na vlnové délce skenované v jistém časovém intervalu v UV/VIS (ultrafialovo-viditelné) oblasti. Z absorpčních spekter je patrný nárůst 3,5-DTBQ a zároveň je zde zaznamenaný pás pro samotný komplex mědi a původní 3,5-DTBC [59].



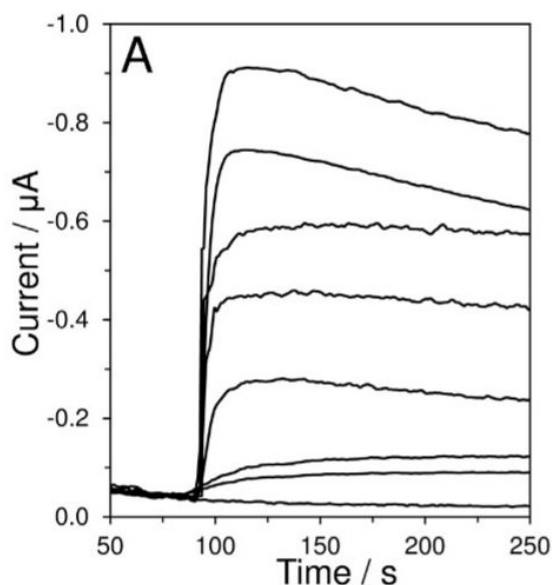
**Obrázek 14:** Záznam absorpčních UV/VIS spekter během oxidace 3,5-DTBC katalyzované komplexem mědi; převzato a upraveno z [59].



Kinetické parametry příslušných reakcí lze stanovit na základě závislosti absorbance na čase pro různé koncentrace substrátu [59].

#### *Amperometrické měření*

Touto metodou lze zaznamenávat pouze látky, které jsou tzv. elektroaktivní, což znamená, že jsou schopny elektrochemické přeměny u povrchu elektrody. Na elektrodu je zde vkládáno konstantní napětí a vlivem redoxní reakce dochází ke vzniku elektrického proudu, který je úměrný koncentraci sledované elektroaktivní látky. Měření se obvykle provádí ve tříelektrodovém uspořádání složeném z pracovní kovové elektrody (např. zlaté), referenční elektrody, kterou je často chloridostříbrná elektroda a platinové pomocné elektrody. Jednou z možností, jak studovat katecholázovou aktivitu enzymů/komplexů je pomocí jejich imobilizace na pracovní elektrodu a sestavením tak amperometrického bio či biomimetického senzoru. Vlivem oxidace katecholu na chinon zde dochází k nárůstu elektrického proudu. Kinetiku reakce lze měřit na základě rostoucího proudu v čase, což je analogické se spektrofotometrickou metodou. Obrázek č. 15 zobrazuje závislost proudu na čase během oxidace různých koncentrací dopaminu na uhlíkové pastové elektrodě s imobilizovanou tyrosinázou [60].



**Obrázek 15:** Závislosti proudu na čase během oxidace 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 a 100 µmol/L dopaminu na uhlíkové pastové elektrodě s imobilizovanou tyrosinázou; převzato z [60].

#### Biomimetické senzory založené na komplexech mědi

Předním důvodem syntézy biomimetických komplexů mědi je jejich využití pro detekci fenolických látek, a to i v jejich stopovém množství [42, 64]. Biomimetické senzory jsou chemicky modifikované elektrody [65], kde inkorporovaný komplex může sloužit jako katalyzátor reakce anebo pouze jako rychlý mediátor přenosu elektronů [54]. K tomuto účelu jsou velmi

oblíbené uhlíkové pastové elektrody [64]. Hlavními výhodami biomimetických senzorů jsou především nízká cena, snadná výroba, rychlá obnova povrchu, citlivost a selektivita [65]. Současně jsou jejich konstrukcí řešeny nevýhody biosenzorů s imobilizovanou tyrosinázou, kterými jsou zejména krátká životnost, relativně vysoké detekční limity a nízká stabilita [42]. Takovéto senzory shledávají uplatnění v široké škále průmyslových odvětvích, jakými jsou např. potravinářský, farmaceutický či textilní průmysl nebo čištění vod [54]. Zvláště důležité jsou v lékařské diagnostice, a to pro detekci katecholaminů, kterými jsou dopamin, levodopa, epinefrin či norepinefrin. Katecholaminy jsou podstatné pro nervový systém, kde zastávají funkci centrálních a periferních neurotransmiterů. Avšak vysoké hladiny těchto látek v tělních tekutinách indikují nádorová onemocnění centrální nervové soustavy či nadledvinek. Stanovení katecholaminů v tělních tekutinách má přední význam u osob trpících Parkinsonovou chorobou nebo stresem. Jejich kvantitativním stanovením lze také odhalit některá endokrinní onemocnění či další patologické nebo fyziologické abnormality v těle [65].

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Chemikálie

V tabulce č. 8 je sepsán seznam chemikálií, a to včetně jejich výrobců, které byly použity v experimentální části.

**Tabulka 8:** Přehled použitých chemikálií včetně jejich výrobců.

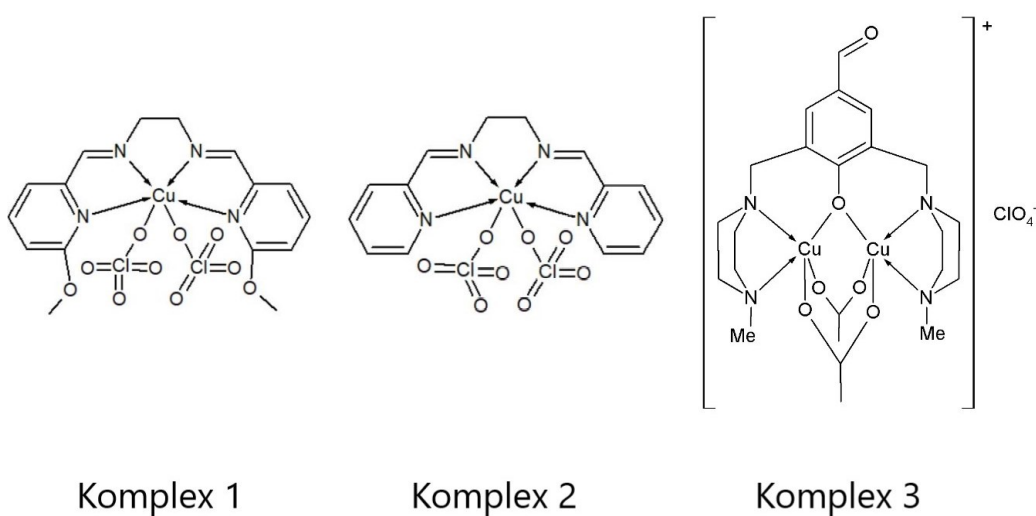
Chemikálie	Výrobce
Acetonitril pro HPLC, $\geq 99,9\%$	Honeywell, Seelze, Německo
Acetonitril bezvodý, 99,8%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Ethanol absolutní, $\geq 99,8\%$	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Methanol pro HPLC	Penta, Chrudim, Česká republika
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, čistý	Penta, Chrudim, Česká republika
Dopamin hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
3,5-di-tert-butylcatechol, 98%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
3,5-di-tert-butyl- <i>o</i> -benzochinon, 98%	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Kyselina chlorovodíková, 36%	Penta, Chrudim, Česká republika
Hydroxid sodný, p.a.	Penta, Chrudim, Česká republika
Hydranal Coulomat-E	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
Destilovaná voda	Univerzita Pardubice, Česká republika
Tyrosináza, izolovaná z <i>Agaricus bisporus</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

#### 2.1.1 Biomimetické komplexy mědi

Vzorce studovaných komplexů a jejich ligandů, které byly syntetizované na Ústavu chemie a technologie makromolekulárních látek Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice, jsou prezentované v tabulce č. 9. Pro přehlednost budou v diplomové práci dále označovány pod čísly 1, 2 a 3. Na obrázku č. 16 jsou představeny struktury těchto komplexů a v popisku jsou navíc uvedeny jejich molární hmotnosti. Vzorky jednotlivých komplexů lze spatřit na obrázku č. 17.

**Tabulka 9:** Vzorce studovaných komplexů a jejich ligandů syntetizovaných na Univerzitě Pardubice.

Komplex	Vzorec
1	$[\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2(\text{L}^1)]$
2	$[\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2(\text{L}^2)]$
3	$[\text{Cu}_2\text{L}^3(\text{OAc})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)$
Ligand	Vzorec
$\text{L}^1$	<i>N,N'</i> -bis[(6-methoxypyridin-2-yl)methyl]- <i>N,N'</i> -dimethylethan-1,2-diamin
$\text{L}^2$	<i>N,N'</i> -bis(pyridin-2-ylmetylen)ethan-1,2-diamin
$\text{L}^3$	2,6-bis[( <i>N</i> -methyl piperazin-1-yl)methyl]-4-formylfenol (HL)



**Obrázek 16:** Struktury studovaných komplexů. Komplexy 1 a 2: jednojaderné; komplex 3: dvoujaderný. Molární hmotnosti: komplex 1=560,8 g/mol; komplex 2=500,7 g/mol; komplex 3=692,2 g/mol.



**Obrázek 17:** Vzorčky studovaných biomimetických komplexů mědi. Snímek vlevo: komplex 1; snímek uprostřed: komplex 2; snímek vpravo: komplex 3.

## 2.2 Přístroje a pomůcky

V tabulce č. 10 jsou uvedeny přístroje a pomůcky, včetně jejich výrobců, které byly využity během experimentů.

**Tabulka 10:** Výčet použitých přístrojů a pomůcek včetně jejich výrobců.

<b>Přístroj/pomůcka</b>	<b>Výrobce</b>
Stolní multimetr Orion 5-Star	Thermo Fisher Scientific, Singapur
UV-VIS spektrometr Cintra 4040	GBC Scientific Equipment, Victoria, Austrálie
Kyveta 100-QX, 10 mm	Hellma Analytics, Německo
pH metr Orion Star A325	Thermo Fisher Scientific, Indonésie
Laboratorní váhy KERN PLE 200-3	KERN & Sohn GmbH, Balingen, Německo
Analytické váhy Sartorius BP211D	Sartorius AG, Göttingen, Německo
Kyslík 2.5, tlaková láhev	Linde Gas a.s., Praha, Česká republika
Míchačka magnetická s ohřevem Heidolph MR Hei-Tec	Heidolph Instruments, Schwabach, Německo
Míchadlo magnetické Color Squid	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen im Breisgau, Německo
Automatické pipety Eppendorf	Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o., Říčany, Česká republika
Pipetovací špičky Eppendorf	Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o., Říčany, Česká republika
Mikrozkumavky typu Eppendorf	Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o., Říčany, Česká republika
Plastové centrifugační zkumavky s víčkem	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Německo
Laboratorní nádobí	Fisher Scientific, Pardubice, Česká republika
Skenovací elektronový mikroskop VEGA 3 SBU	Tescan, Brno, Česká republika
Naprašovačka Q150R Plus	Quorum Technologies, Lewes, Velká Británie
Částice z hydrazidové magnet. perlové celulózy L1805	Univerzita Pardubice, Česká republika
Coulometrický titrátor 831 KF	Metrohm, Herisau, Švýcarsko
Magnetická míchačka 728	Metrohm, Herisau, Švýcarsko
ICP-MS spektrometr Agilent 7900 s kvadrupolovým analyzátozem iontů a oktapolovou kolizní celou	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Kalifornie, USA

## **2.3 Příprava zásobních roztoků**

### **2.3.1 Zásobní roztoky pro elektrochemická měření**

Postupně byly připraveny 10mL 0,01M zásobní roztoky komplexů 1, 2 a 3 navážením 56,08 mg komplexu 1, 50,07 mg komplexu 2 a 69,22 mg komplexu 3. Navážky byly poté rozpuštěny v bezvodém acetonitrilu. Pro měření ve vodném prostředí byl jako substrát použit dopamin, jehož 10mL 0,01M zásobní roztok byl připraven navážením 18,96 mg dopamin hydrochloridu, který byl následně rozpuštěn v 0,05M kyselině chlorovodíkové. Vodné prostředí představoval fosfátový pufr o pH 7. Nejprve byl připraven 250mL 0,1M roztok dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného, a to rozpuštěním 3,9 g dihydrátu dihydrogenfosforečnanu sodného v destilované vodě. Poté bylo pH roztoku upraveno na hodnotu 7 postupným přidávkem 0,2M roztoku hydroxidu sodného. Měření v nevodném prostředí bylo uskutečněno v methanolu a jako substrát byl použit 3,5-di-tert-butylkatechol (3,5-DTBC). Zásobní 0,01M roztok 3,5-DTBC (10 mL) byl získán navážením 22,23 mg 3,5-DTBC a jeho rozpuštěním v methanolu (pro HPLC). Také byl připraven zásobní roztok tyrosinázy, a to navážením 2 mg enzymu a následným rozpuštěním v 1 mL již připraveného fosfátového pufru.

### **2.3.2 Zásobní roztoky pro spektrofotometrická měření**

Zásobní 0,01M roztoky komplexů 1, 2 a 3 byly připraveny obdobně jako u měření spotřeby kyslíku. V případě měření ve vodném prostředí, respektive ve fosfátovém pufru o pH 7, byl připraven 10mL 0,1M zásobní roztok dopaminu navážením 189,64 mg dopamin hydrochloridu a jeho rozpuštěním ve fosfátovém pufru. Pro měření s tyrosinázou byl přichystán 0,01M zásobní roztok dopaminu stejným postupem jako u elektrochemického měření spotřeby kyslíku. Katecholázová aktivita komplexů v nevodném prostředí byla sledovaná opět s 3,5-DTBC, jehož 10mL zásobní roztoky byly připraveny jako 0,1 a 0,01M. V případě 0,1M roztoku bylo naváženo 22,23 mg 3,5-DTBC a pro 0,01M roztok 222,3 mg. Obě navážky byly následně rozpuštěny v bezvodém acetonitrilu. Jako reakční organické prostředí pro měření byl zde vybrán acetonitril (pro HPLC). Pro kalibraci na produkt byl připraven 10mL 0,1M zásobní roztok 3,5-di-tert-butyl-*o*-benzochinonu, a to navážením 220,2 mg a následným rozpuštěním v bezvodém acetonitrilu.

## **2.4 Postup pro zakotvení komplexu 3 na magnetických částicích**

Do mikrozkušavky typu Eppendorf bylo nejprve napipetováno 50  $\mu$ L destilované vody. Pak byla na zkumavce u hladiny vody zakreslena ryska, po kterou byly následně převedeny

magnetické částice. Tímto způsobem bylo do mikrozkušavky přesunuto přibližně 50  $\mu\text{L}$  částic, které byly poté promyty v absolutním ethanolu. Do skleněné lékovky bylo naváženo 7 mg komplexu 3. Promyté částice byly společně s přiměřeným množstvím ethanolu přeneseny do lékovky ke komplexu a po dobu 3 hodin společně vařeny při 70  $^{\circ}\text{C}$  na magnetické míchačce s ohřevem.

## **2.5 Postup pro stanovení katecholázové aktivity: elektrochemicky**

Všechna elektrochemická měření spotřeby kyslíku byla provedena vždy ve 3 mL reakční směsi složené z roztoku komplexu, substrátu a zvoleného prostředí (fosfátový pufr či methanol). Do skleněné lékovky byl nejdříve napipetován fosfátový pufr či methanol v příslušném objemu dle potřebné koncentrace substrátu. Poté byl přidán roztok komplexu nebo tyrosinázy. Komplexy 1 a 2 byly proměřované pouze ve fosfátovém pufru, do kterého byly přidávány vždy v objemu 1,5 mL, což odpovídalo výsledné koncentraci v reakční směsi 5 mmol/L. Tyrosináza byla taktéž měřena jen ve fosfátovém pufru, do něhož byla pipetována ve 3  $\mu\text{L}$ , a tudíž byla její koncentrace v roztoku 2  $\mu\text{g/mL}$ . Spotřeba kyslíku během reakce katalyzované komplexem 3 byla sledovaná v prostředí methanolu, do kterého byl přidáván v objemu 45  $\mu\text{L}$ . Koncentrace komplexu 3 ve směsi tedy byla 0,15 mmol/L. Takto připravené roztoky byly postupně umístěny na magnetické míchadlo. Následně byla do roztoků vložena kyslíková sonda a po ustálení koncentrace kyslíku byl pipetován příslušný substrát. Pro komplex 1, 2 a tyrosinázu byl použit dopamin, který byl s komplexem 1 proměřován v koncentračním rozmezí 0,2-1,5 mmol/L, s komplexem 2 od 0,2 do 2,5 mmol/L a pro reakce s tyrosinázou od 0,1 do 3 mmol/L. Na přístroji byla každých 30 sekund odečtena hodnota koncentrace kyslíku (mg/L) v roztoku po dobu 20 minut. Katecholázová aktivita komplexu 3 byla sledovaná s 3,5-DTBC v rozmezí koncentrace 0,05-1,5 mmol/L. Úbytek kyslíku byl pozorován v 10 sekundovém intervalu v rámci 3 minut.

Pro jednotlivé koncentrace substrátu byly následně sestaveny závislosti úbytku kyslíku na čase. Jednotlivá data byla proložena křivkami, u kterých byla odečtena jejich směrnice. Poté byla vždy sestavena závislost příslušných směrnic na měřených koncentracích substrátu, což znázorňovalo saturační křivku dle Michaelis-Mentenové. Pro zjištění kinetických parametrů reakce byla využita linearizace dle Lineweavera a Burka.

## **2.6 Postup pro stanovení katecholázové aktivity: spektrofotometricky**

Katecholázové aktivity komplexů/tyrosinázy byly sledovány nejprve v příslušném prostředí (fosfátový pufr, acetonitril) obsahující kyslík v přirozeném množství, a poté se zvýšeným

množstvím. Pro měření s 3,5-DTBC byla provedena kalibrace na jeho oxidační produkt 3,5-di-tert-butyl-*o*-benzochinon.

### 2.6.1 Měření v prostředí s přirozeným obsahem kyslíku

Pro jednotlivá spektrofotometrická měření vznikajícího produktu oxidace daného substrátu byl celkový objem reakční směsi taktéž 3 mL. Do kyvety byl vždy nejprve přidán příslušný objem fosfátového pufru či acetonitrilu, do kterého byl poté napipetován roztok komplexu či tyrosinázy. Komplex 1 byl přidáván v objemu 90  $\mu$ L, což odpovídalo výsledné koncentraci 0,3 mmol/L ve 3 mL směsi. Komplex 2 byl měřen v koncentraci 0,6 mmol/L, tudíž byl přidáván ve 180  $\mu$ L. Koncentrace komplexu 3 byla taktéž jako u měření spotřeby kyslíku 0,15 mmol/L, a proto byl pipetován v objemu 45  $\mu$ L. Roztok tyrosinázy byl přidáván vždy ve 3  $\mu$ L, a tak výsledná koncentrace enzymu v reakční směsi byla 2  $\mu$ g/mL. Následně byl do připravené směsi přidán substrát. Ve fosfátovém pufru byl měřen komplex 1, 2 a tyrosináza spolu s dopaminem, který byl sledován v koncentračním rozmezí 0,5-2,5 mmol/L s komplexem 1, v koncentracích 1 až 6 mmol/L s komplexem 2 a s tyrosinázou v rozmezí 0,1 až 3 mmol/L. Závislost absorbance na čase byla zde měřena při 475 nm. U komplexu 1 ve fosfátovém pufru pro jednotlivé koncentrace dopaminu byla absorbance snímána po 30 sekundách v rámci 30 minut, u komplexu 2 každých 30 sekund po dobu 45 minut a v případě tyrosinázy po 5 sekundách během 45 minut. V prostředí acetonitrilu byla narůstající absorbance v čase sledována během oxidace 3,5-di-tert-butylkatecholu katalyzované komplexy 1 a 2. V případě komplexu 1 byl 3,5-DTBC měřen v koncentracích od 0,1 do 2 mmol/L a u komplexu 3 v koncentracích od 0,05 do 1,5 mmol/L. Spektrofotometrická měření při vlnové délce 400 nm u komplexu 1 trvala vždy celkem 30 minut a hodnota absorbance byla snímána po 30 sekundách. U komplexu 3 byla absorbance odečítána každých 5 sekund po dobu přibližně 12 minut.

Katecholázová aktivita komplexu 3 zakotveného na magnetických částicích byla sledována v bezvodém acetonitrilu za použití 3,5-DTBC jako substrátu. Částice byly nejprve z lékovky převedeny do kyvety a acetonitrem promyty od ethanolu a nezakotveného komplexu. Následně byl do kyvety, v množství dle požadované koncentrace substrátu, napipetován acetonitril. 3,5-di-tert-butylkatechol byl proměřován v koncentračním rozmezí 0,1 až 2 mmol/L a absorbance v závislosti na čase byla snímána při 400 nm po 5 sekundách v rámci 1 hodiny. Po každém měření byly částice pročištěny acetonitrem. Zároveň byla pozorována stabilita vazby komplexu na částicích, kdy byl 3,5-DTBC opakovaně (celkem 5x) měřen v koncentraci 1 mmol/L. Absorbance byla zaznamenávána v 5 sekundových intervalech během 30 minut.



## 2.6.2 Měření v prostředí syčeném kyslíkem

Při měření v roztocích s přidaným kyslíkem byl vždy volen více koncentrovaný (0,1M) zásobní roztok substrátu. Důvodem toho bylo, že jisté množství kyslíku, které bylo obsažené v roztoku substrátu, zároveň ředilo koncentraci již obsaženého kyslíku v měřící cele. Proto bylo lepší vnášet do reakční směsi roztok substrátu v co nejmenším objemu.

### Reakce ve vodném prostředí

Do kyvety byl nejprve napipetován fosfátový pufr, do kterého byl přidán komplex 1, 2 či tyrosináza ve stejných množstvích jako u měření bez syčení. Poté byla kyveta zalepena parafilmem, který byl následně propíchnut jehlou připojenou k tlakové láhvi s kyslíkem. Roztok byl syčen vždy 2 minuty. K takto syčené směsi byl přidán substrát. Objem reakční směsi byl taktéž 3 mL. Během měření byla kyveta přikryta víčkem. U komplexu 1 byly závislosti absorbance na čase měřeny s dopaminem v koncentračním rozmezí 0,05-1,4 mmol/L, 1-6 mmol/L pro reakce s komplexem 2 a s tyrosinázou pouze v koncentraci 0,6 mmol/L. Hodnoty absorbance v čase byly snímány opět při 475 nm. Kinetika reakce komplexu 1 s dopaminem v příslušných koncentracích byla sledovaná po dobu 15 minut a jednotlivé absorbance byly odečítané ve 30 sekundových intervalech. Celková doba měření u komplexu 2 byla 45 minut a absorbance byla snímána opět každých 30 sekund. Tyrosináza s dopaminem byla proměřovaná 1 hodinu a zvyšující se absorbance byla zaznamenávána po 5 sekundách.

### Reakce v prostředí acetonitrilu

Do 25mL erlenmeyerovy baňky bylo převedeno přibližně 25 mL acetonitrilu. Baňka byla uzavřena parafilmem, který byl poté propíchnut jehlou napojenou ke kyslíkové tlakové láhvi. Rozpouštědlo bylo následně syčeno 10 min kyslíkem. Po uplynulé době byl takto připravený acetonitril napipetován v požadovaném množství (dle výsledné koncentrace substrátu) do kyvety. Dále byl přidán komplex 1 či 3, a to opět ve stejných objemech jako v případě měření bez syčení. Na závěr byl do roztoku pipetován substrát a kyveta byla následně uzavřena víčkem. Jelikož byl použit jako substrát 3,5-DTBC závislost absorbance na čase byla snímána při vlnové délce 400 nm. Celkový objem reakční směsi byl totožný s předchozími měřeními. Proměřované koncentrace 3,5-di-tert-butylkatecholu u komplexu 1 byly v rozmezí 0,1-2,5 mmol/L a 0,1-1 mmol/L u komplexu 3. Hodnoty absorbance byly zaznamenávány každých 30 sekund. U reakcí katalyzované komplexem 1 byla celková doba měření jednotlivých koncentrací 3,5-DTBC pokaždé 30 minut a 15 minut v případě komplexu 3.

### Postup pro kalibraci na 3,5-di-tert-butyl-o-benzochinon

Do kyvety byly nejprve převedeny 3 mL acetonitrilu (pro HPLC). Poté byl postupně přidáván roztok 3,5-di-tert-butyl-o-benzochinonu tak, aby hodnoty absorbance při 400 nm byly měřeny pro koncentrace 0,1; 0,198; 0,294; 0,388 a 0,481 mmol/L. Následně byla sestavena závislost odečtených absorbancí na příslušných koncentracích 3,5-DTBQ.

V případě měření s dopaminem byl postup pro vyhodnocení kinetických parametrů obdobný jako u sledování spotřeby kyslíku. Data ze závislosti absorbance na čase pro příslušné koncentrace substrátu byly proloženy křivkami, u kterých byly odečteny hodnoty jejich směrnic. Poté byla vytvořena závislost jednotlivých směrnic na měřených koncentracích substrátu a její následnou linearizací dle Lineweavera a Burka stanoveny kinetické parametry. Pro reakce se substrátem 3,5-DTBC byla provedena kalibrace na vznikající produkt, respektive 3,5-DTBQ. Hodnoty absorbancí byly tak přes rovnici lineární regrese získané z kalibrace přepočteny na koncentrace, které byly následně vyneseny v závislosti na čase. Po proložení jednotlivých dat křivkami byly opět odečteny jejich směrnice. Dále byl postup pro stanovení kinetických parametrů  $K_m$  a  $V_{max}$  analogický s předchozím. Ze získané limitní rychlosti byla navíc vypočítána katalytická konstanta ( $k_{cat}$ ), jako další kinetický parametr.

## **2.7 Postup pro stanovení obsahu vody ve vybraných rozpouštědlech dle Karl Fischera**

Obsah vody byl stanoven v použitých rozpouštědlech (absolutní ethanol, acetonitril pro HPLC a bezvodý acetonitril). Zvoleným činidlem pro coulometrickou Karl Fischer titraci byl Hydranal-Coulomat E. Do automatického titrátoru bylo vždy dávkováno 800  $\mu$ L rozpouštědla a po jeho ztitrování byl na displeji odečten výsledný obsah vody.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

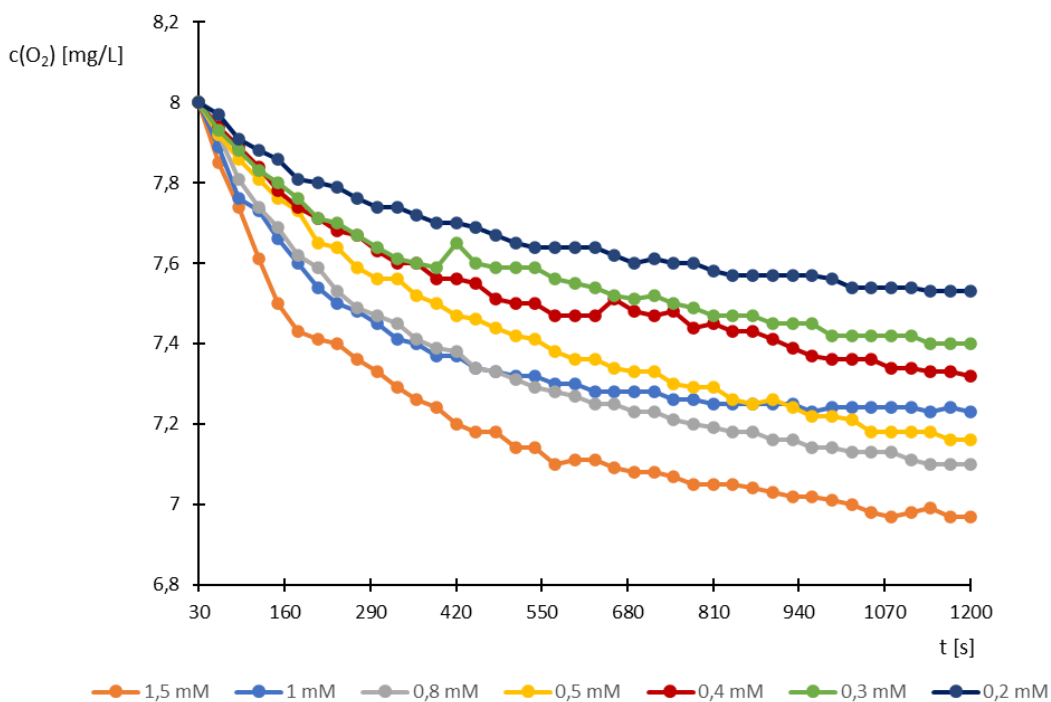
#### 3.1 Stanovení katecholázové aktivity: elektrochemicky

Náplní těchto experimentů bylo stanovit katecholázovou aktivitu biomimetických komplexů mědi pomocí elektrochemického měření spotřebovaného množství kyslíku během oxidace příslušného substrátu. Pro měření byla použita polarografická kyslíková sonda. Zároveň byla určena i katecholázová aktivita enzymu tyrosináza, vůči které byly aktivity komplexů následně porovnávány.

##### 3.1.1 Měření ve vodném prostředí

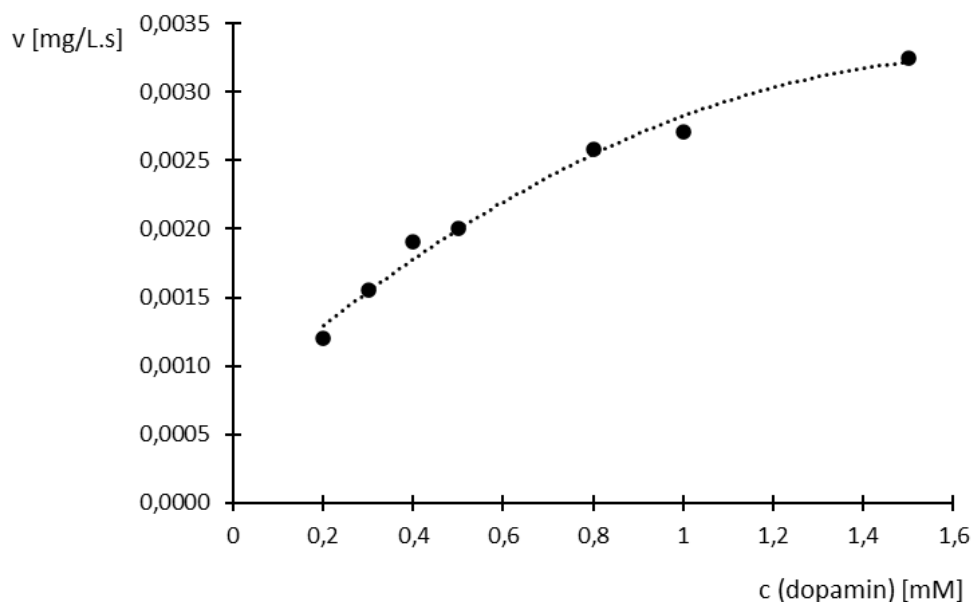
###### Komplex 1

Na základě postupu uvedeného v podkapitole 2.5 byly naměřeny hodnoty koncentrace kyslíku během oxidace dopaminu jako substrátu, který byl sledován v koncentracích uvedených v legendě grafu (Obr. 18). Reakce byly katalyzované komplexem 1 a probíhaly ve fosfátovém pufru o pH 7. Z grafu je patrné, že čím vyšší byla koncentrace substrátu, tím větší byl úbytek kyslíku za čas. Po jisté době, kdy veškeré množství dopaminu bylo přeměněno na chinon, došlo k ustálení koncentrace kyslíku přítomného v reakční směsi. U vyšších koncentrací tak docházelo k pomalejšímu ustálení, jelikož bylo třeba zoxidovat větší množství substrátu.

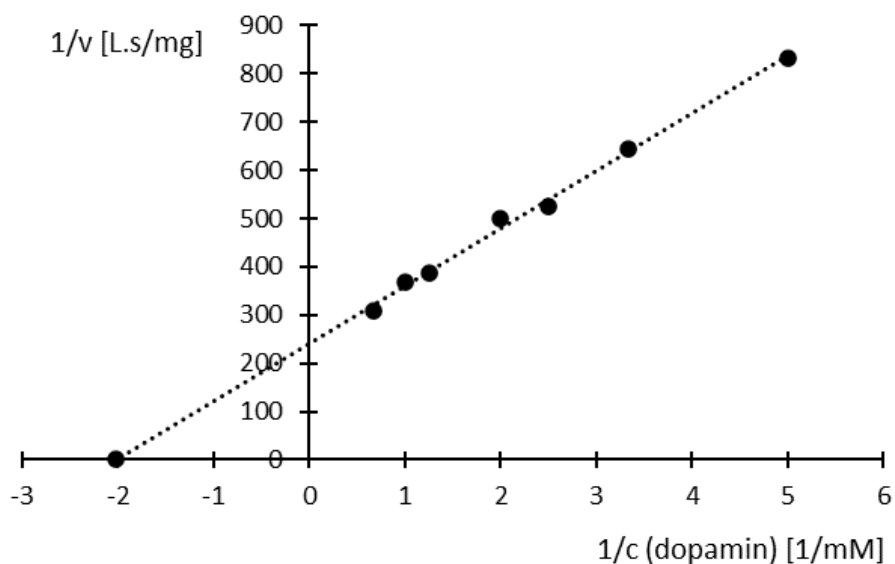


**Obrázek 18:** Závislosti koncentrace kyslíku na čase měřením během oxidací příslušných koncentrací dopaminu (viz legenda grafu) katalyzovaných komplexem 1. Prostředí pro měření: fosfátový pufr o pH 7; koncentrace komplexu 1: 5 mmol/L.

Směrnice výše uvedených křivek byly následně vztaženy k příslušným koncentracím dopaminu a byla tak sestrojena saturační křivka (Obr. 19). Pro vyhodnocení kinetických parametrů byla následně saturační křivka linearizována podle Lineweavera a Burka (Obr. 20). Dle postupu popsaném v kapitole 1.3 byla stanovena Michaelisova konstanta na hodnotu 0,5 mmol/L a limitní rychlost na 0,0041 mg/L.s.



**Obrázek 19:** Saturační křivka pro oxidace jednotlivých koncentrací dopaminu katalyzované komplexem 1 ve fosfátovém pufru o pH 7.



**Obrázek 20:** Linearizace dle Lineweavera a Burka pro vyhodnocení kinetických parametrů oxidace dopaminu katalyzované komplexem 1.

- Vzorový výpočet kinetických parametrů:

Rovnice lineární regrese:

$$y = 119,19x + 241,29$$

1. Michaelisova konstanta

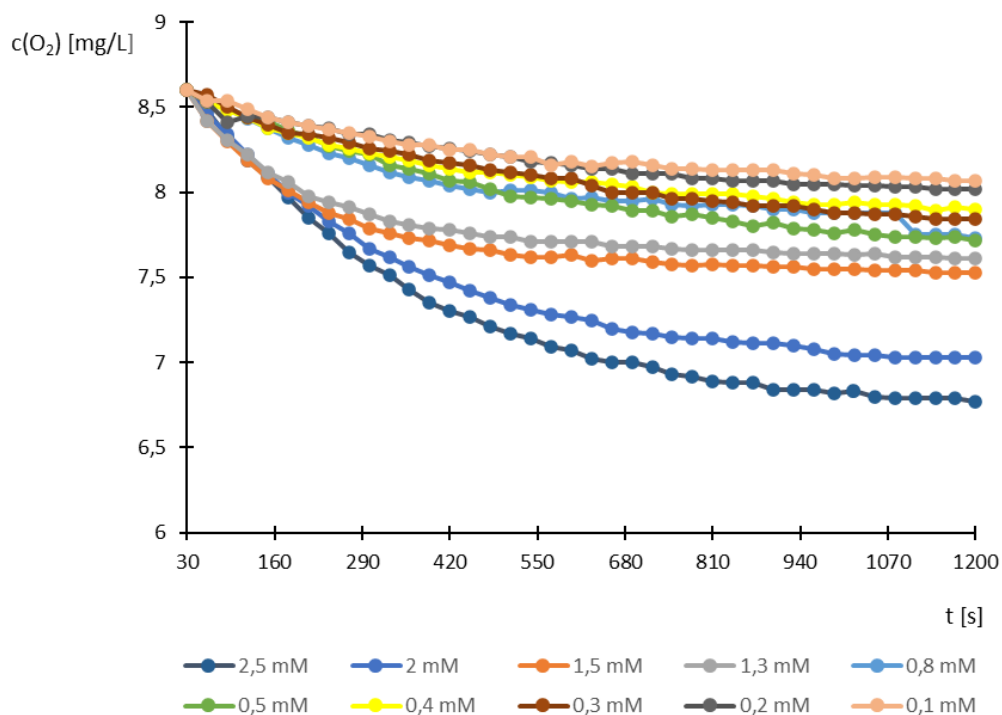
$$K_m = \frac{1}{\frac{241,29}{119,19}} \doteq 0,5 \text{ mmol/L}$$

2. Limitní rychlost

$$V_{max} = \frac{1}{241,29} \doteq 0,0041 \text{ mg/L} \cdot \text{s}$$

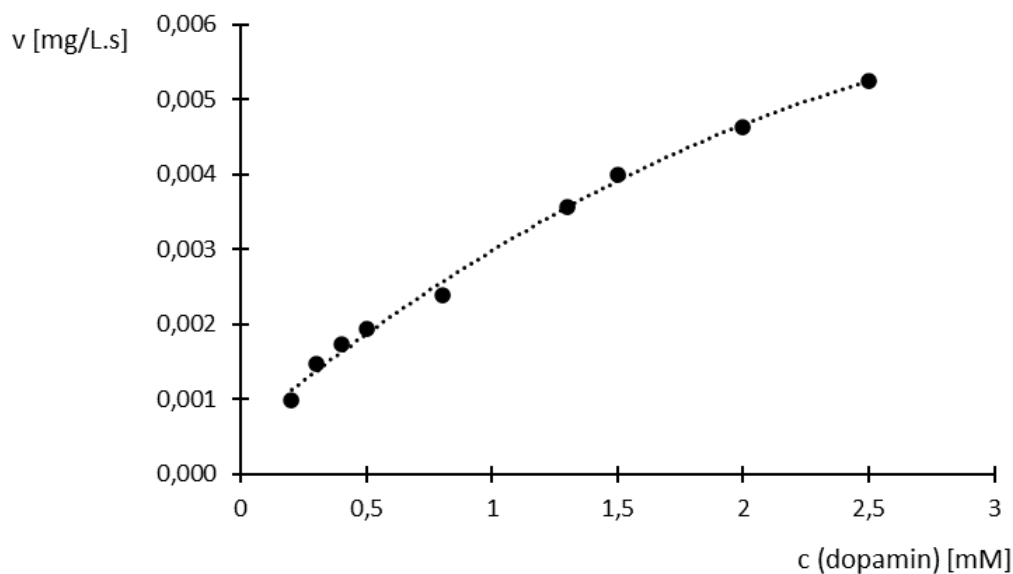
### Komplex 2

Na obrázku č. 21 jsou zobrazeny jednotlivé závislosti koncentrace kyslíku na čase sledované během oxidací příslušných koncentrací dopaminu, jejichž konkrétní hodnoty jsou prezentované v legendě grafu. Reakce byly katalyzované komplexem 2 a probíhaly ve fosfátovém pufru o pH 7. Souvislosti, které lze vyvodit z tohoto grafu jsou stejné jako u komplexu 1.

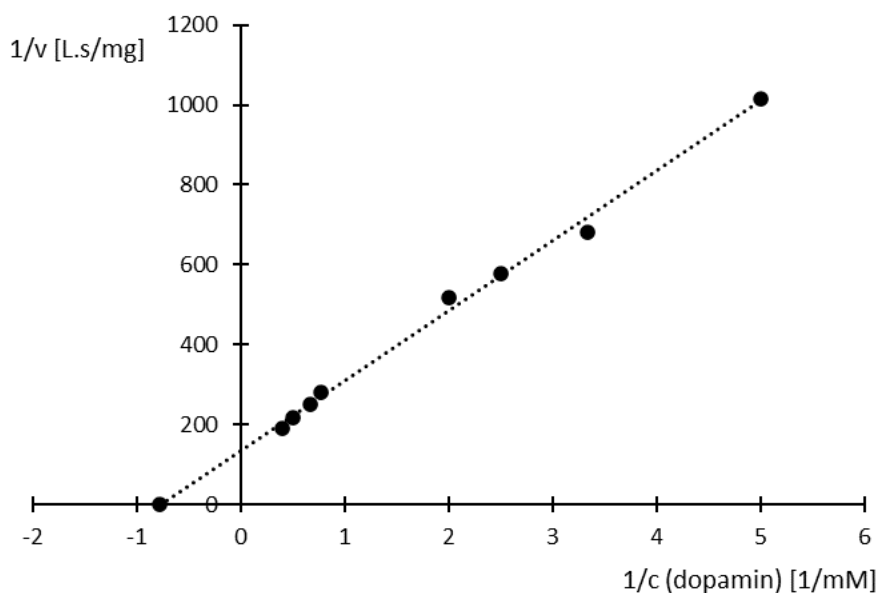


**Obrázek 21:** Závislosti koncentrace kyslíku na čase zaznamenané během oxidací jednotlivých koncentrací dopaminu (viz legenda grafu) katalyzovaných komplexem 2. Prostředí pro měření: fosfátový pufr o pH 7; koncentrace komplexu 2: 5mmol/L.

Pomocí linearizace saturační křivky (Obr. 22) dle Lineweavera a Burka (Obr. 23) byly zjištěny kinetické parametry. Michaelisova konstanta činila 1,3 mmol/L a limitní rychlost 0,0074 mg/L.s. Podle hodnot těchto parametrů lze usuzovat, že komplex 2 je méně aktivní v porovnání s komplexem 1.



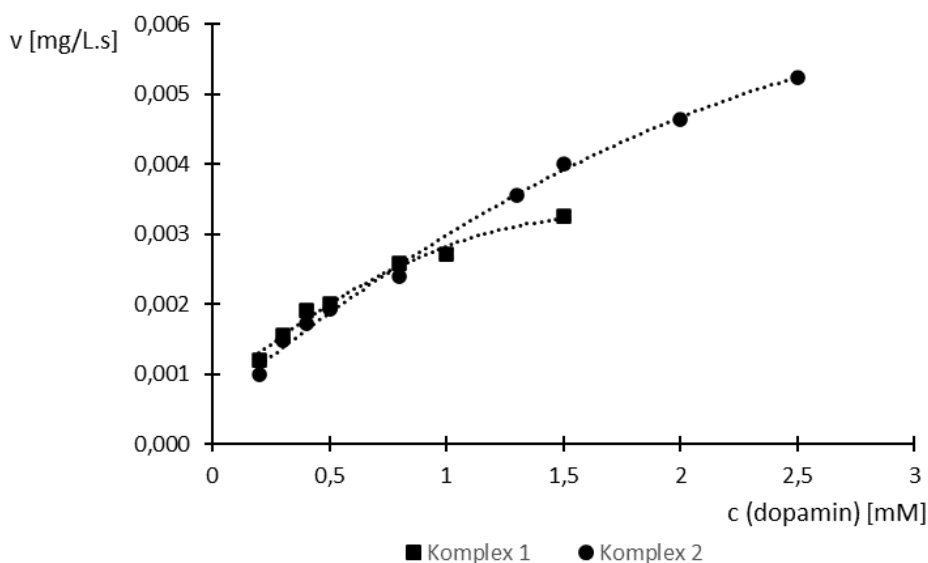
**Obrázek 22:** Saturační křivka oxidace daných koncentrací dopaminu katalyzované komplexem 2 ve fosfátovém pufru o pH 7.



**Obrázek 23:** Linearizace dle Lineweavera a Burka pro vyhodnocení kinetických parametrů oxidace dopaminu katalyzované komplexem 2.

Dle charakteru saturačních křivek lze porovnat katalytickou aktivitu komplexů 1 a 2 (Obr. 24). Křivka získaná z měření komplexu 1 je více strmá a k jejímu ustálení dochází

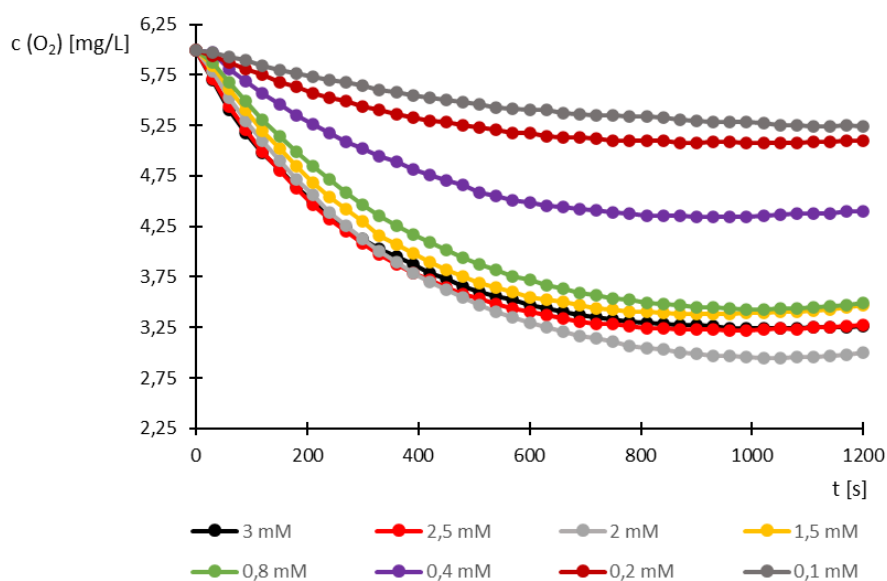
při nižší hodnotě než v případě komplexu 2. Z těchto skutečností opět plyne, že více katalyticky aktivní je komplex 1.



**Obrázek 24:** Porovnání saturačních křivek z měření oxidace dopaminu katalyzované komplexy 1 a 2.

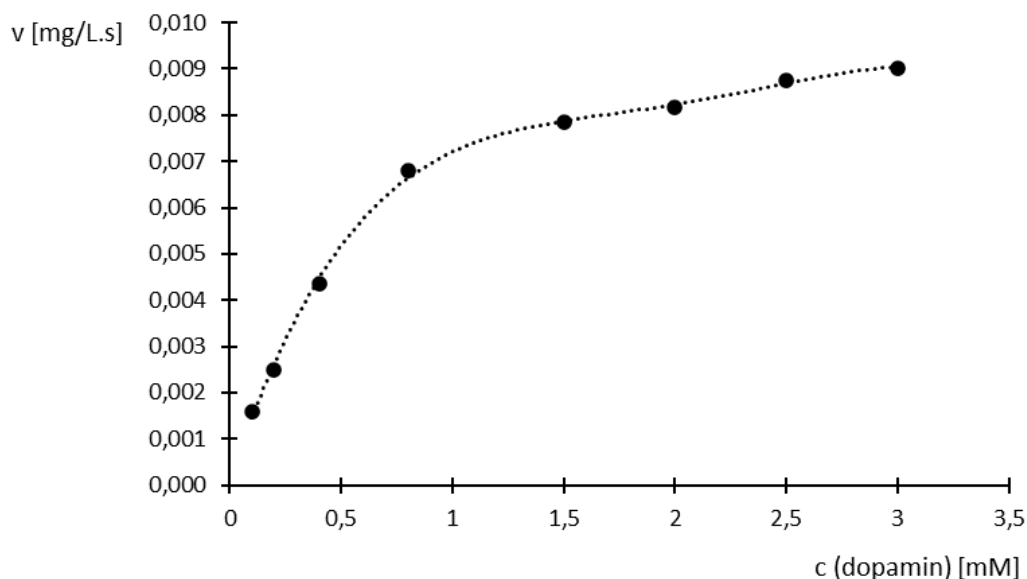
### Tyrosináza

Obrázek č. 25 představuje záznamy klesající koncentrace kyslíku vlivem oxidací jednotlivých koncentrací dopaminu (viz legenda grafu) katalyzovaných tyrosinázou. Z grafu si lze všimnout, že křivky měřených koncentrací dopaminu 2; 2,5 a 3 mmol/L mají podobnou směrnici, což je způsobeno tím, že při těchto koncentracích dochází téměř k úplnému nasycení enzymu.

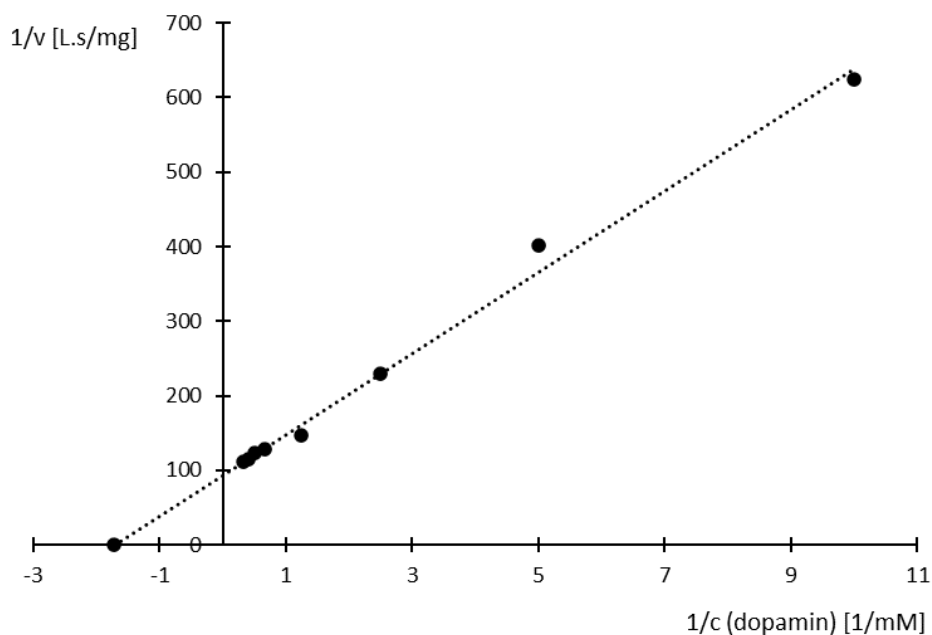


**Obrázek 25:** Závislosti koncentrace kyslíku na čase zaznamenávané během oxidací příslušných koncentrací dopaminu katalyzovaných tyrosinázou. Prostředí pro měření: fosfátový pufr o pH 7; koncentrace tyrosinázy: 2  $\mu\text{g/mL}$ .

Saturační křivkou (Obr. 26) byl následně potvrzen výše uvedený poznatek o nasycení tyrosinázy při nejvyšších měřených koncentracích dopaminu. Linearizací saturační křivky dle Lineweavera a Burka (Obr. 27) byly opět vyhodnoceny kinetické parametry reakce. Michaelisova konstanta byla stanovena na 0,58 mmol/L a limitní rychlost na 0,0106 mg/L.s.



**Obrázek 26:** Saturační křivka pro oxidace sledovaných koncentrací dopaminu katalyzované tyrosinázou ve fosfátovém pufru o pH 7.



**Obrázek 27:** Linearizace dle Lineweavera a Burka pro stanovení kinetických parametrů oxidace dopaminu katalyzované tyrosinázou.



V tabulce č. 11 je uveden souhrn kinetických parametrů, které byly vyhodnoceny pomocí linearizace dle Lineweavera a Burka pro jednotlivé oxidace dopaminu katalyzované komplexy 1, 2 a tyrosinázou ve fosfátovém pufru.

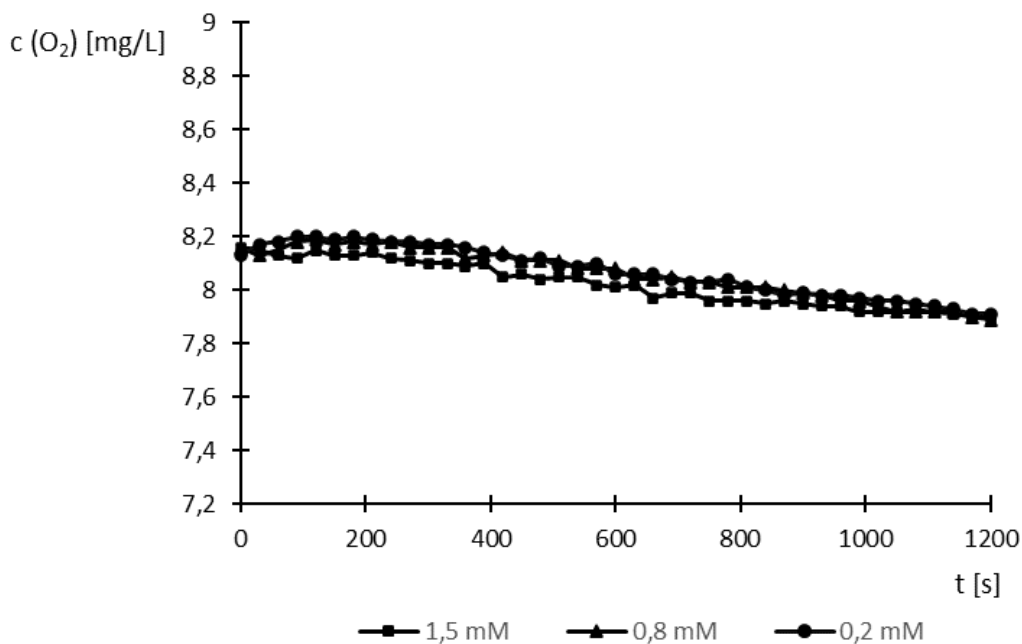
**Tabulka 11:** Přehled vyhodnocených kinetických parametrů oxidací dopaminu katalyzovaných komplexy 1, 2 a tyrosinázou. Linearizační technika: dle Lineweavera a Burka; metoda měření: elektrochemické měření spotřeby kyslíku; prostředí pro měření: fosfátový pufr o pH 7.

Komplex/tyrosináza	Rovnice lineární regrese *	$K_m$ [mmol/L]	V [mg/L.s]
Komplex 1	$y=119,19x+241,29$	0,5	0,0041
Komplex 2	$y=174,64x+135,26$	1,3	0,0074
Tyrosináza	$y=54,536x+93,919$	0,58	0,0106

\* pozn.: pro přímky získané linearizací jednotlivých saturačních křivek dle Lineweavera a Burka

#### Kontrola stability dopaminu ve vodném prostředí

Pro ověření, zda nedocházelo během měření k samovolné oxidaci dopaminu, byla sledovaná také koncentrace kyslíku v reakční směsi bez komplexu/tyrosinázy (Obr. 28). Pro tento účel byl proměřován dopamin v koncentracích 0,2; 0,8 a 1,5 mmol/L. Úbytek kyslíku v průběhu 20 minut byl zcela zanedbatelný.



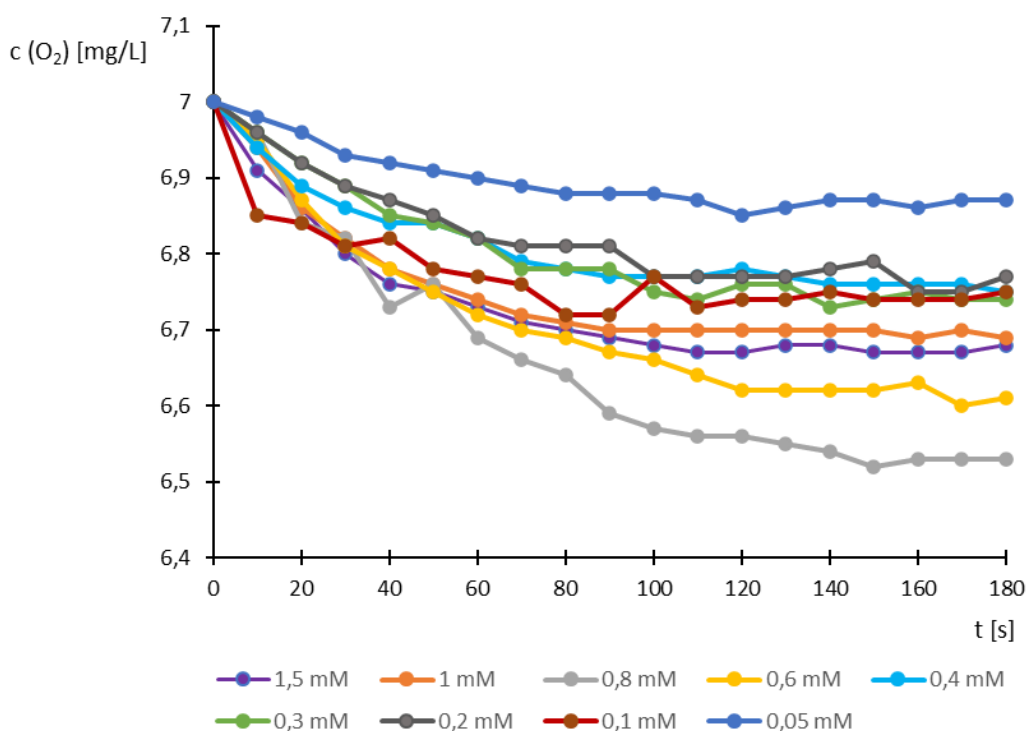
**Obrázek 28:** Závislosti koncentrace kyslíku na čase měřené v roztocích obsahující pouze fosfátový pufr a dopamin v koncentracích uvedených v legendě grafu.

### 3.1.2 Měření v prostředí methanolu

#### Komplex 3

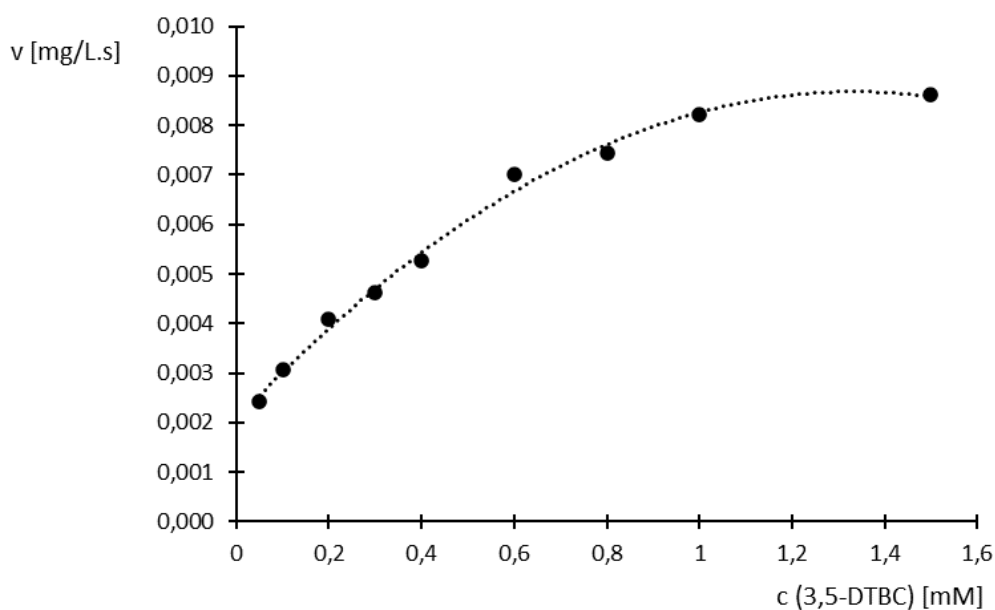
Před měřením samotného komplexu 3 byly provedeny experimenty týkající se sledování úbytku kyslíku během oxidace dopaminu a 3,5-di-tert-butylcatecholu v methanolu katalyzované komplexy 1 a 2. Spotřeba kyslíku byla pozorovaná jednak v čistém, tak v 50% methanolu. Ačkoli nedocházelo během měření k viditelné změně koncentrace kyslíku, tak sledování katecholázové aktivity touto metodou bylo v nevodném prostředí uskutečněno pouze s komplexem 3. Nevodné prostředí je zároveň nevhodné i pro tyrosinázu. Komplex 3 nebyl naopak měřen ve vodném prostředí, jelikož je ve vodě neaktivní a také dochází k jeho degradaci. Vhodným substrátem pro nevodná prostředí je 3,5-DTBC.

V případě reakcí katalyzovaných komplexem 3 musely být jednotlivé koncentrace kyslíku snímány po 10 sekundách během 3 minut (Obr. 29), jelikož docházelo k velmi rychlé změně 3,5-di-tert-butylcatecholu na 3,5-di-tert-butyl-*o*-benzochinon.

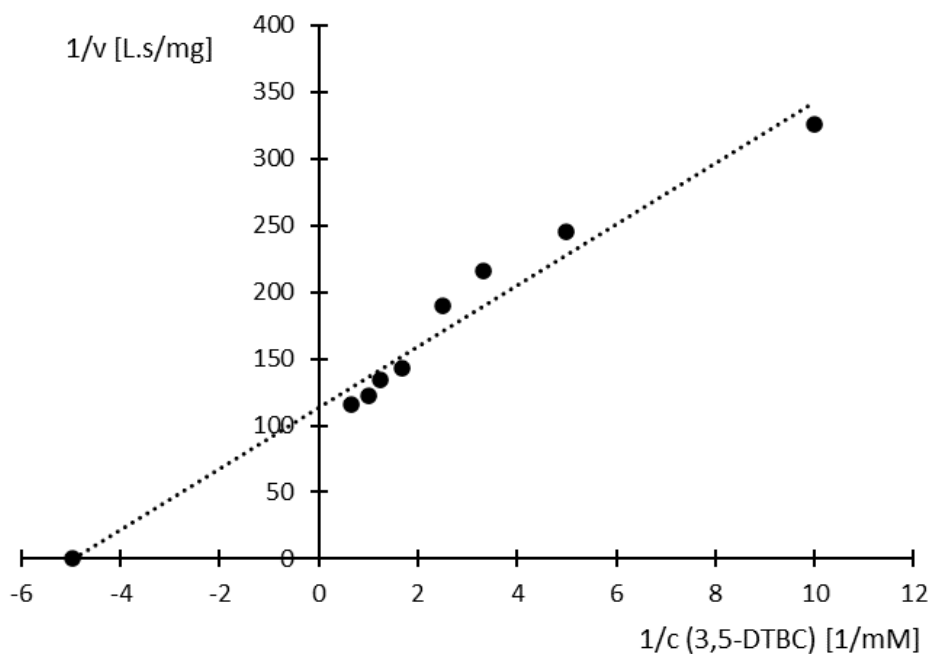


**Obrázek 29:** Závislosti koncentrace kyslíku na čase během oxidací příslušných koncentrací 3,5-DTBC (viz legenda) katalyzovaných komplexem 3. Prostředí pro měření: methanol; koncentrace komplexu 3: 0,15 mmol/L.

Pomocí linearizace saturační křivky (Obr. 30) dle Lineweavera a Burka (Obr. 31) byla vyhodnocena Michaelisova konstanta na 0,2 mmol/L a limitní rychlost na 0,0088 mg/L.s. Rovnice lineární regrese byla pro tuto závislost  $y=22,895x+113,74$ .



**Obrázek 30:** Saturační křivka pro oxidace příslušných koncentrací 3,5-DTBC katalyzované komplexem 3 v prostředí methanolu.



**Obrázek 31:** Linearizace dle Lineweavera a Burka pro vyhodnocení Michaelisovy konstanty a limitní rychlosti oxidace 3,5-DTBC katalyzované komplexem 3.

### 3.1.3 Souhrnný komentář k experimentům založených na měření spotřeby kyslíku (elektrochemicky)

Zde je nutné poznamenat, že měření založená na elektrochemickém zaznamenávání spotřeby kyslíku byla ovlivněna hned několika faktory, které by mohly mít vliv na příslušné

výsledky. Mezi takovéto faktory patří zejména vlastní spotřeba kyslíku polarografickou kyslíkovou sondou, která navíc vyžaduje míchání roztokem během měření. Mícháním může docházet k nežádoucí změně hodnoty obsahu kyslíku během sledované reakce. Další problém, který by mohl ovlivnit sledovaný obsah kyslíku je produkce peroxidu vodíku během oxidací katalyzovaných jednojadernými komplexy (komplex 1 a 2).

Objektivně můžeme navzájem porovnat aktivity komplexu 1, 2 a tyrosinázy, jelikož byly měřeny se stejným substrátem v totožném prostředí a stejnou metodou. Dle stanovených hodnot Michaelisovy konstanty lze usoudit, že se tyrosináze nejvíce podobá komplex 1, ačkoli je podle naměřené limitní rychlosti asi třikrát pomalejší (Tab. 11). Také je na místě podotknout, že tyrosináza je schopna této aktivity dosáhnout v o dost nižší koncentraci ( $2 \mu\text{g/mL}$ ) v porovnání s komplexem (komplex 1:  $2,8 \cdot 10^3 \mu\text{g/mL}$ ; komplex 2:  $2,5 \cdot 10^3 \mu\text{g/mL}$ ).

Komplex 3 se podle kinetických parametrů jeví jako nejvíce aktivní, ale bohužel zde ho nelze s dalšími komplexy či tyrosinázou srovnávat. Jeho aktivita bude následně porovnána s komplexem 1 pomocí spektrofotometrických měření (viz podkapitola 3.2).

## **3.2 Stanovení katecholázové aktivity: spektrofotometricky**

Druhým způsobem, kterým byla zjišťována katecholázová aktivita vybraných komplexů mědi bylo pomocí spektrofotometrického měření produktu vzniklého oxidací použitého substrátu. Jednotlivé experimenty byly prováděny nejprve s roztoky s přirozeným obsahem kyslíku a následně po zvýšení jeho obsahu. Součástí těchto experimentů bylo také stanovit katecholázovou aktivitu tyrosinázy a srovnat ji se sledovanými komplexy.

### **3.2.1 Měření UV/VIS spekter příslušných produktů reakce**

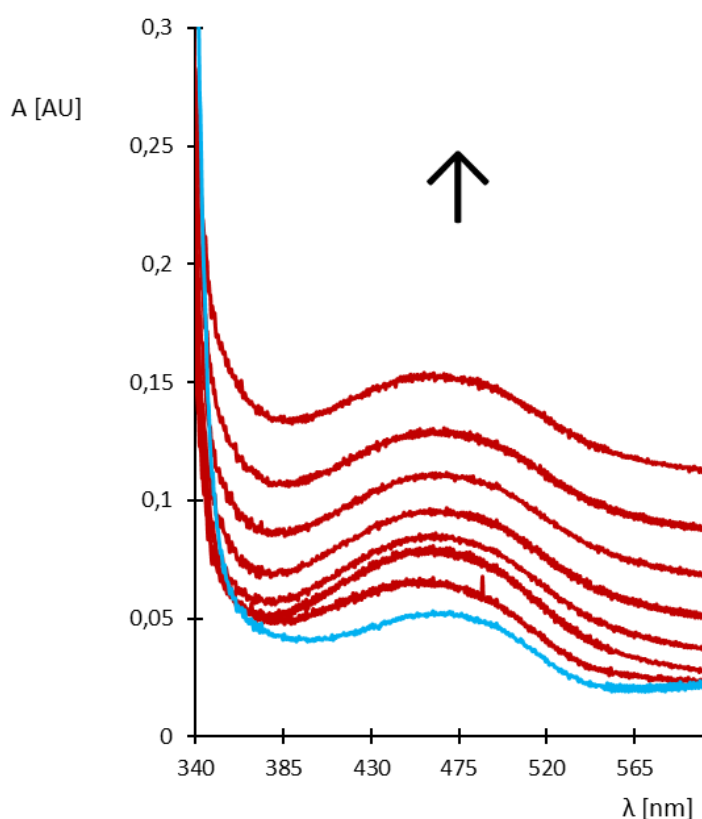
Před zahájením experimentů bylo nutné u vybraných substrátů, kterými byly dopamin a 3,5-di-tert-butylkatechol, zjistit, při jaké vlnové délce absorbují jejich oxidační produkty.

#### **Dopaminochrom**

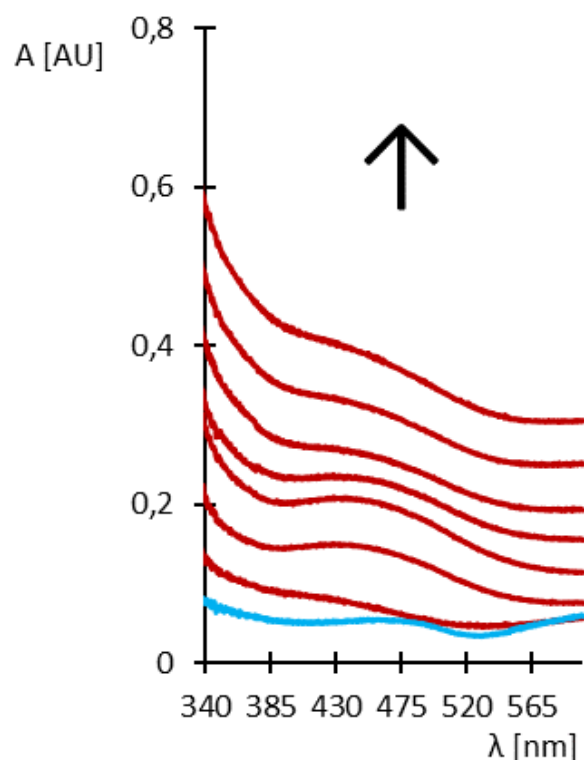
Pro reakce ve vodném prostředí byl jako substrát volen dopamin. Oxidací dopaminu vzniká nejprve *o*-dopaminchinon, který následně cyklizuje na leukodopaminchrom. Vzniklý leukodopaminchrom podléhá další oxidaci za tvorby dopaminochromu, který je zde sledovaným produktem reakce. Stabilita produkovaného dopaminochromu není bohužel příliš velká a po sléze dochází k jeho přeměně na 5,6-dihydroxyindol a následné polymerizaci za vzniku polydopaminu.

Pro zjištění vlnové délky, při které absorbuje postupně vznikající dopaminochrom, byla měřena závislost absorbance na vlnové délce (v rozmezí 200-700 nm).

UV/VIS spektra dopaminochromu byla snímána během oxidace dopaminu katalyzované jednak komplexem 1 (Obr. 32), tak komplexem 2 (Obr. 33). V obou případech byla nejprve proměřena absorpce fosfátového pufru. Následně byla sledována absorpce samotných komplexů, které odpovídají modré křivky. Poté byl do příslušných reakčních směsí přidán dopamin, a to v koncentraci 1 mmol/L pro měření s komplexem 1 a 3 mmol/L s komplexem 2. Koncentrace komplexu 1 v reakční směsi byla 0,3 mmol/L a komplexu 2 0,6 mmol/L. UV/VIS spektra vznikajícího dopaminochromu (červené křivky) byla zaznamenávána v 5 minutových intervalech po dobu 30 minut. Vlnová délka, při které absorbuje dopaminochrom byla stanovena na 475 nm.



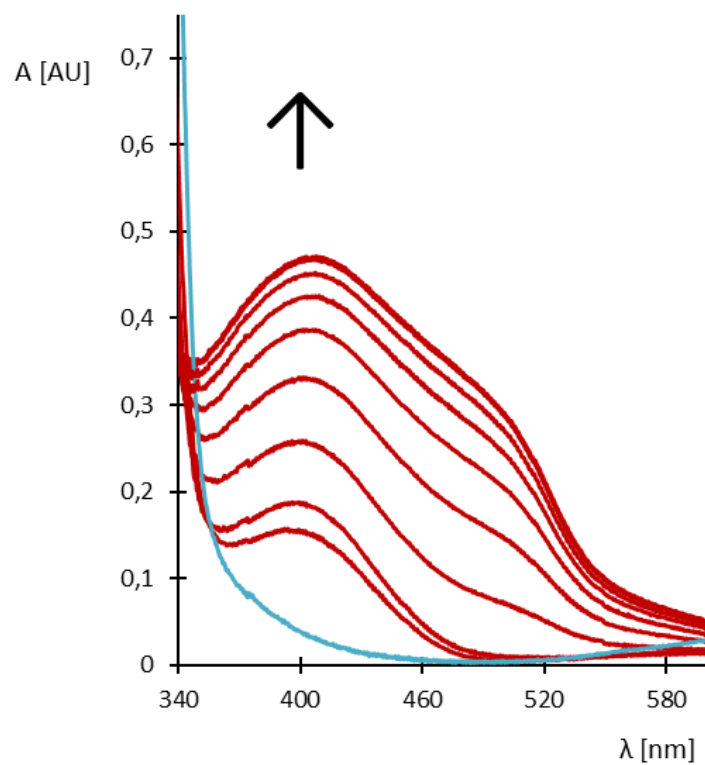
**Obrázek 32:** UV/VIS spektrum postupně vznikajícího dopaminochromu jako produktu oxidace dopaminu katalyzované komplexem 1.



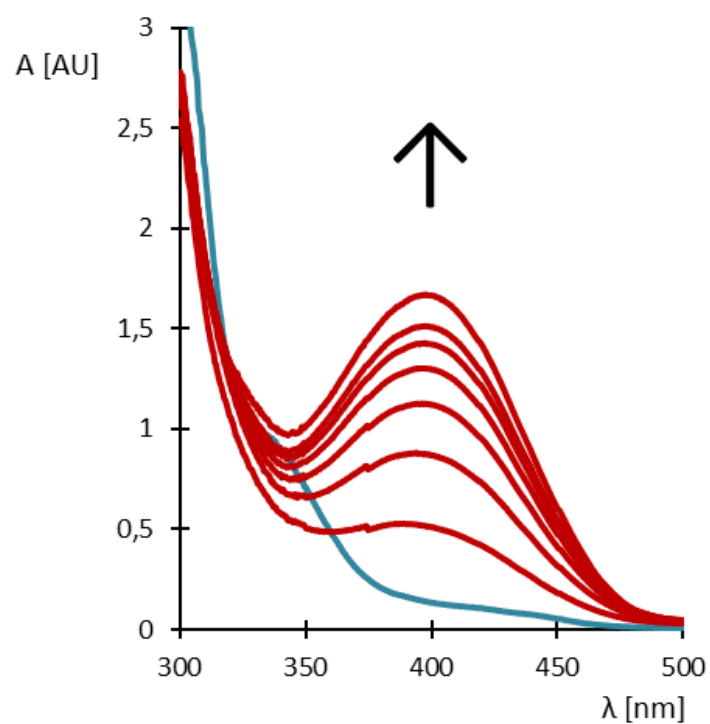
**Obrázek 33:** UV/VIS spektrum postupně vznikajícího dopaminochromu jako produktu oxidace dopaminu katalyzované komplexem 2.

### 3,5-di-tert-butyl-*o*-benzochinon

Ke sledování katecholázové aktivity v nevodném prostředí byl jako substrát použit 3,5-di-tert-butylcatechol, jehož oxidačním produktem je 3,5-di-tert-butyl-*o*-benzochinon. Spektra 3,5-DTBQ tvořeného oxidací 1mM 3,5-DTBC katalyzovanou komplexem 1 (Obr. 34) a komplexem 3 (Obr. 35), byla snímána v rozmezí vlnových délek 200 až 600 nm. Nejdříve byla proměřena absorpce samotného acetonitrilu (pro HPLC). Dále byla zaznamenána absorpce studovaných komplexů (modré křivky) a následně byly měřeny absorpční čáry vznikajícího 3,5-DTBQ a to vždy po 50 sekundách během 400 sekund. Komplex 1 byl ve sledované reakční směsi obsažen v koncentraci 0,3 mmol/L a komplex 3 v koncentraci 0,15 mmol/L. Na základě měření bylo zjištěno, že 3,5-di-tertbutyl-*o*-benzochinon absorbuje při vlnové délce 400 nm.



**Obrázek 34:** UV/VIS spektrum 3,5-di-tert-butyl-*o*-benzochinonu vznikajícího oxidací 3,5-di-tert-butylkatecholu katalyzovanou komplexem 1.

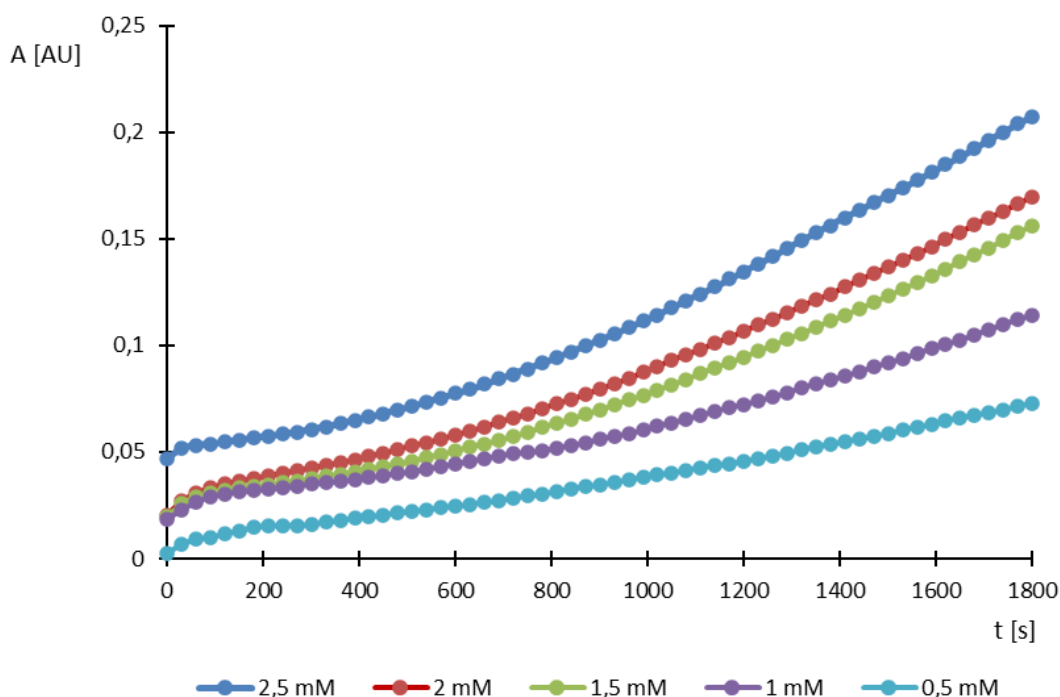


**Obrázek 35:** UV/VIS spektrum 3,5-di-tert-butyl-*o*-benzochinonu vznikajícího oxidací 3,5-di-tert-butylkatecholu katalyzovanou komplexem 3.

### 3.2.2 Měření ve vodném prostředí s přirozeným obsahem kyslíku

#### Komplex 1

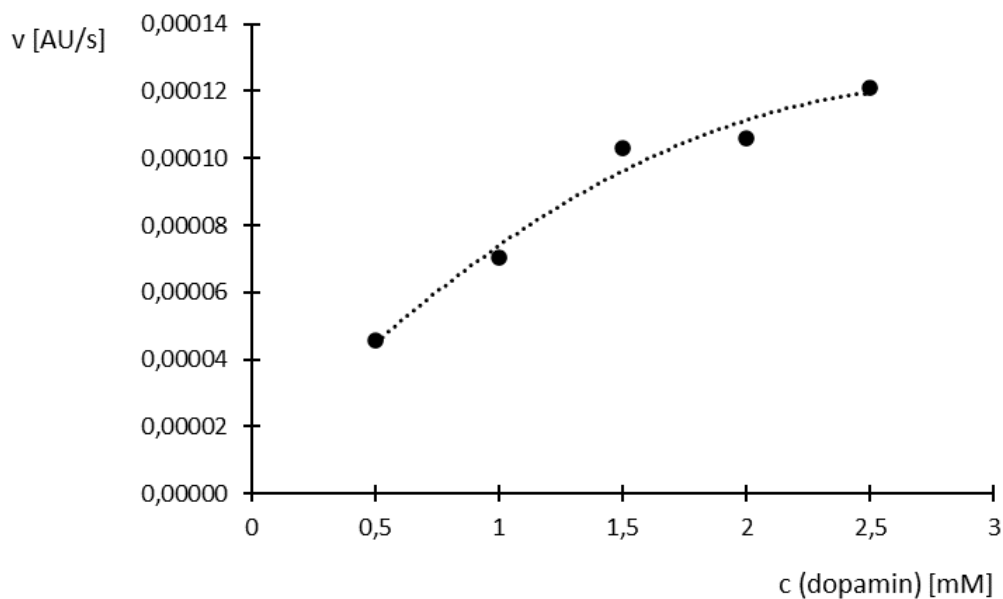
Na obrázku č. 36 jsou uvedeny závislosti absorbance na čase sledované během oxidace dopaminu měřeného v příslušných koncentracích (viz legenda grafu). Reakce katalyzované komplexem 1 probíhaly ve fosfátovém pufru o pH 7 obsahující přirozené množství rozpuštěného kyslíku. Ze zobrazených závislostí lze vyvodit, že s rostoucí koncentrací dopaminu v reakční směsi bylo dosaženo za daný čas vyšších hodnot absorbance, a to vlivem vzniku většího množství oxidačního produktu.



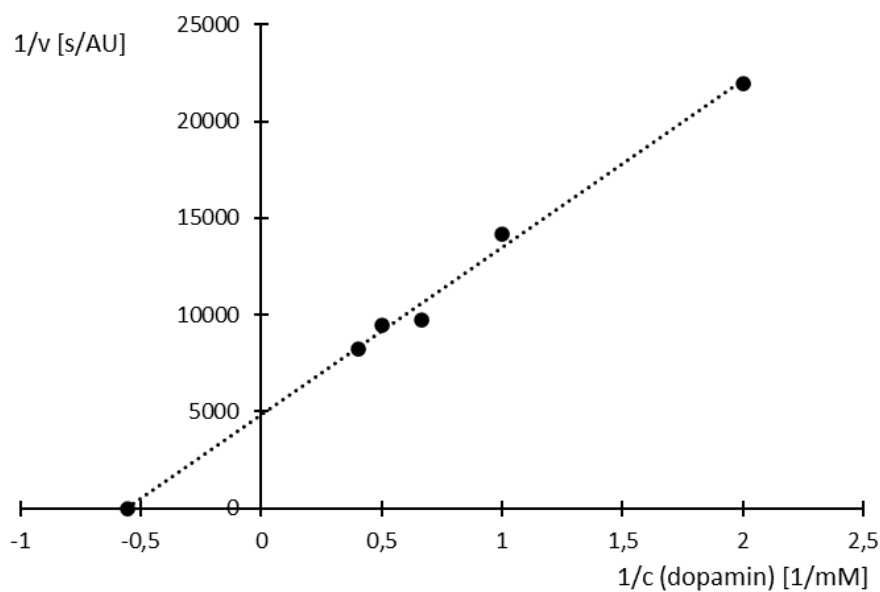
**Obrázek 36:** Závislosti absorbance na čase zaznamenané během oxidací příslušných koncentrací dopaminu (viz legenda grafu) katalyzovaných komplexem 1. Prostředí pro měření: fosfátový pufr o pH 7 s přirozeným obsahem kyslíku; koncentrace komplexu 1: 0,3 mmol/L.

Na základě linearizace saturační křivky (Obr. 37) dle Lineweavera a Burka bylo provedeno přesnější vyhodnocení kinetických parametrů reakce (Obr. 38). Michaelisova konstanta byla stanovena na hodnotu 1,8 mmol/L a limitní rychlost na 0,0002 AU/s. Z uvedených výsledků plyne, že k úplnému nasycení komplexu 1 dochází až při vyšších koncentracích dopaminu než 2,5 mmol/L.





**Obrázek 37:** Saturační křivka pro oxidace dopaminu katalyzované komplexem 1 v prostředí fosfátového pufru o pH 7 s přirozeným obsahem kyslíku.



**Obrázek 38:** Linearizace dle Lineweavera a Burka pro vyhodnocení kinetických parametrů oxidace dopaminu katalyzované komplexem 1.

- Vzorový výpočet kinetických parametrů:

Rovnice lineární regrese:

$$y = 8637,3x + 4821,2$$

1. Michaelisova konstanta

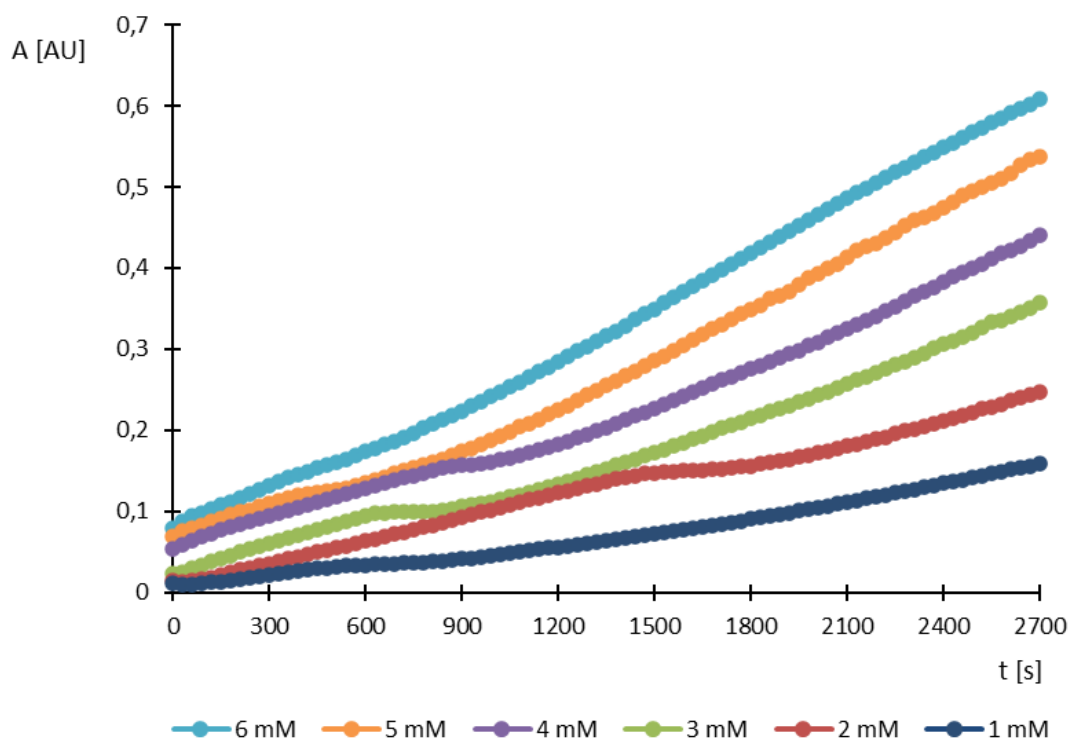
$$K_m = \frac{1}{\frac{4821,2}{8637,3}} \doteq 1,8 \text{ mmol/L}$$

## 2. Limitní rychlost

$$V_{max} = \frac{1}{4821,2} \doteq 0,0002 \text{ AU/s}$$

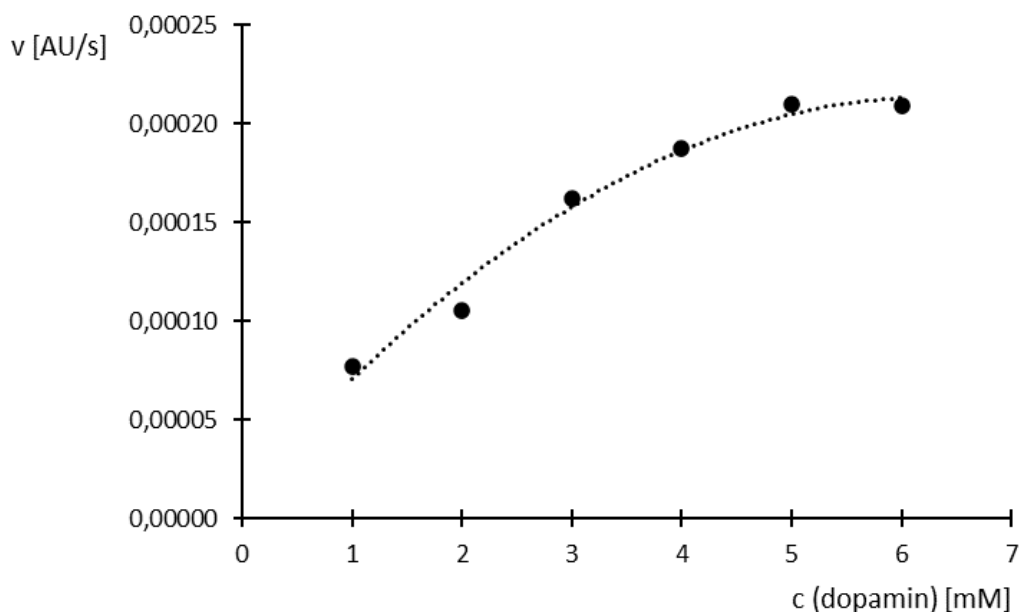
### Komplex 2

Jednotlivé závislosti absorbance na čase měřené během oxidace příslušných koncentrací dopaminu, jejichž hodnoty jsou uvedeny v legendě grafu, představuje obrázek č. 39. Dané reakce byly katalyzované komplexem 2 a probíhaly opět ve fosfátovém pufru o pH 7 s přirozeným obsahem kyslíku.

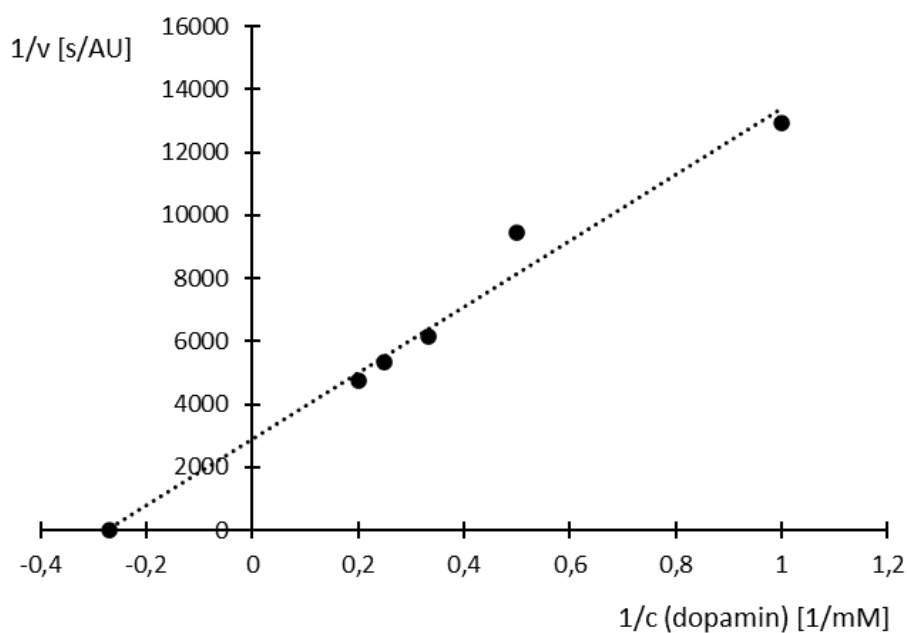


**Obrázek 39:** Závislosti absorbance na čase měřené při oxidacích v legendě zobrazených koncentracích dopaminu katalyzovaných komplexem 2. Prostředí pro měření: fosfátový pufr s přirozeným obsahem kyslíku; koncentrace komplexu 2: 0,6 mmol/L.

Linearizací saturační křivky (Obr. 40) dle Lineweavera a Burka (Obr. 41) byla stanovena Michaelisova konstanta, jejíž hodnota odpovídala 3,4 mmol/L a limitní rychlost, která byla 0,0003 AU/s. Z rozměrů vyhodnocených parametrů lze říci, že k dosažení limitní rychlosti je třeba vyšší koncentrace dopaminu než 6 mmol/L. Zároveň ze stanovených kinetických parametrů je opět zřejmé, že komplex 2 je méně katalyticky aktivní než komplex 1.



**Obrázek 40:** Saturační křivka pro oxidace dopaminu katalyzované komplexem 2 v prostředí fosfátového pufru o pH 7 obsahující přirozené množství kyslíku.

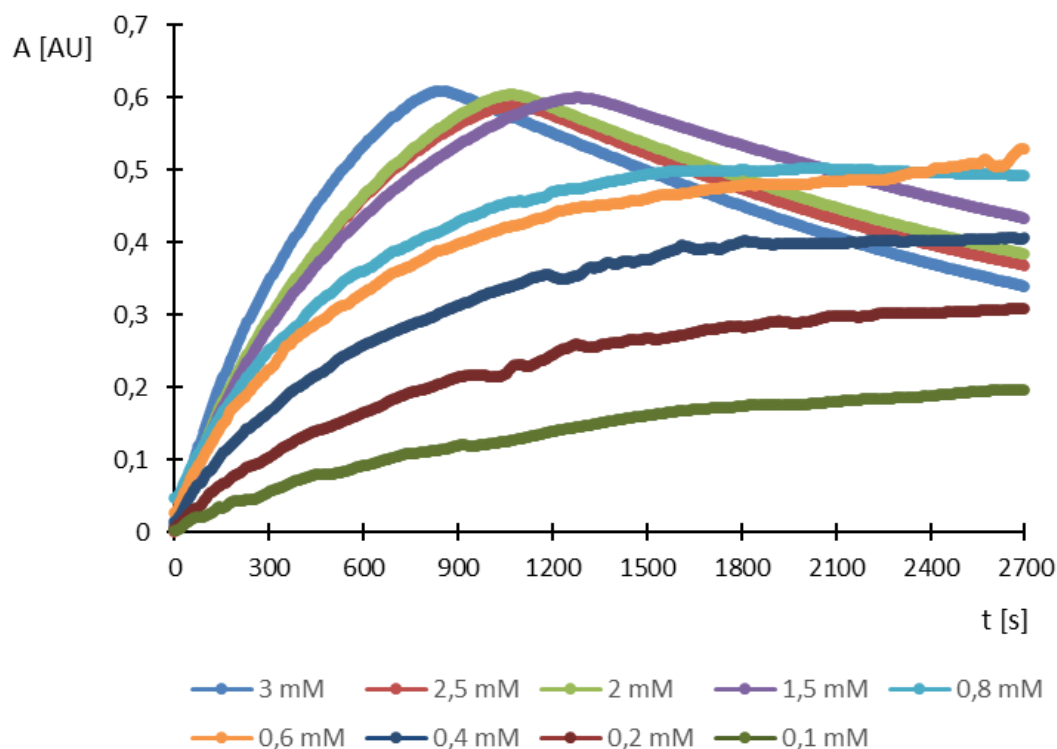


**Obrázek 41:** Linearizace dle Lineweavera a Burka použitá pro vyhodnocení kinetických parametrů oxidace dopaminu katalyzované komplexem 2.

### Tyrosináza

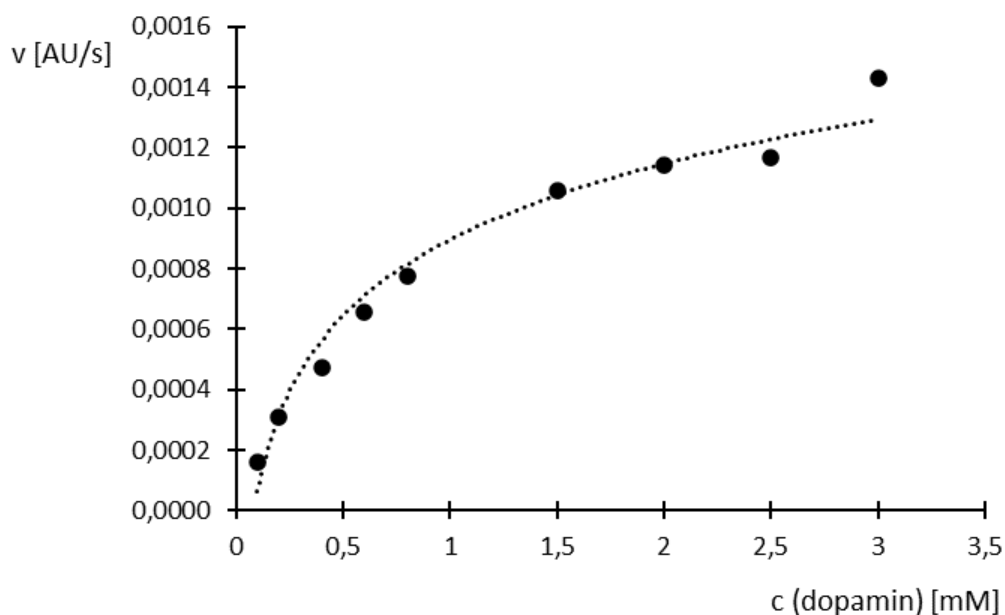
Záznamy závislosti absorbance na čase při oxidaci dopaminu, měřeného v koncentracích uvedených v legendě grafu, jsou zobrazeny na obrázku č. 42. Jednotlivé reakce byly katalyzované tyrosinázou ve fosfátovém pufru o pH 7, který obsahoval kyslík v přirozeném množství. Křivky odpovídající vyšším koncentracím dopaminu (1,5; 2; 2,5 a 3 mmol/L) mají nejprve

velmi prudký náběh a po dosažení jisté absorbance dochází k jejich spádu. Tento jev je způsoben polymerací dopaminu za tvorby polydopaminu, který při vyšších koncentracích vzniká rychleji a více než u nižších koncentrací.

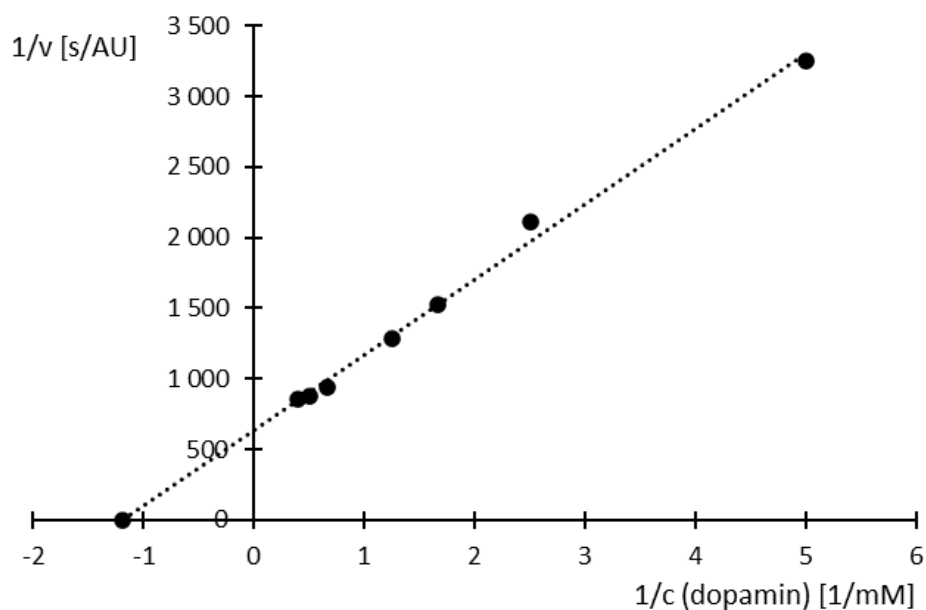


**Obrázek 42:** Křivky závislosti absorbance na čase měřené při oxidacích příslušných koncentracích dopaminu (viz legenda grafu) katalyzovaných tyrosinázou. Prostředí pro měření: fosfátový pufr o pH 7 s přirozeným obsahem kyslíku; koncentrace tyrosinázy: 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Linearizací saturační křivky (Obr. 43) dle Lineweavera a Burka (Obr. 44) byla vypočtena Michaelisova konstanta, jejíž hodnota činila 0,8 mmol/L a limitní rychlost, která dosahovala 0,0016 AU/s.



**Obrázek 43:** Saturační křivka pro oxidace jednotlivých koncentrací dopaminu katalyzované tyrosinázou a měřené ve fosfátovém pufru o pH 7 s přirozeným obsahem kyslíku.



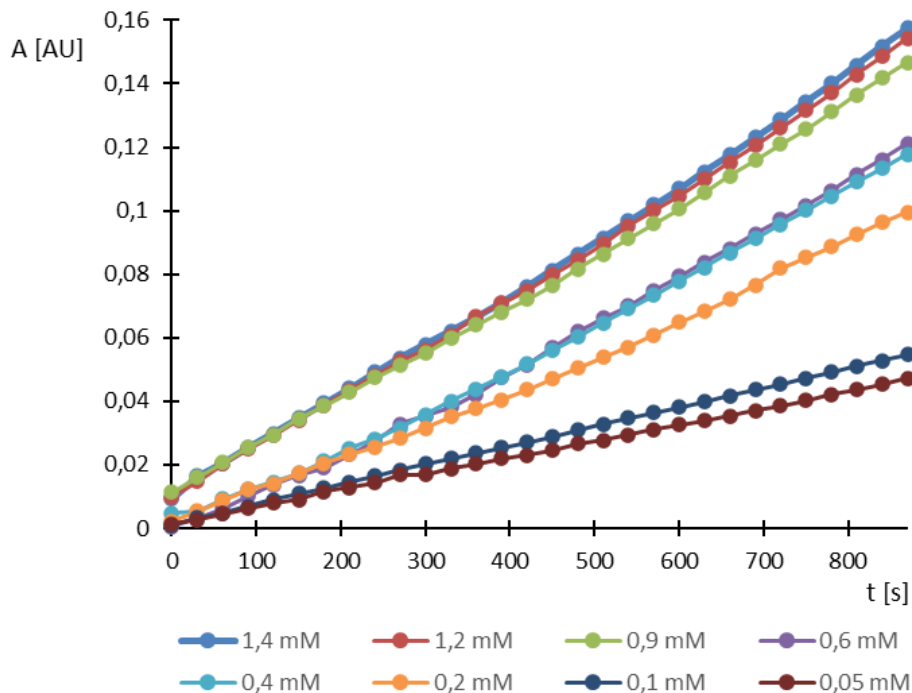
**Obrázek 44:** Linearizace dle Lineweavera a Burka pro vyhodnocení kinetických parametrů oxidace dopaminu katalyzované tyrosinázou.

### 3.2.3 Měření ve vodném prostředí syceném kyslíkem

#### Komplex 1

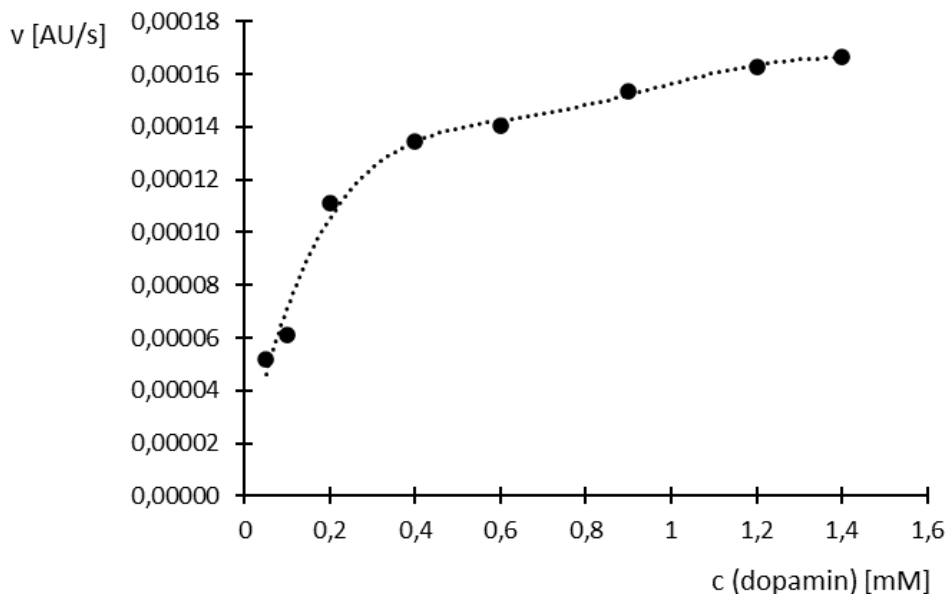
Na obrázku č. 45 jsou vyjádřeny závislosti absorbance na čase naměřené během oxidace příslušných koncentrací dopaminu, které lze nalézt v legendě grafu. Reakční prostředí zde tvořil fosfátový pufr o pH 7, který byl společně s komplexem 1 sycen kyslíkem po dobu 2 minut.

Z uvedeného grafu je patrné, že jednotlivé křivky mají zejména na počátku strmější charakter v porovnání s křivkami naměřenými za přirozených podmínek.

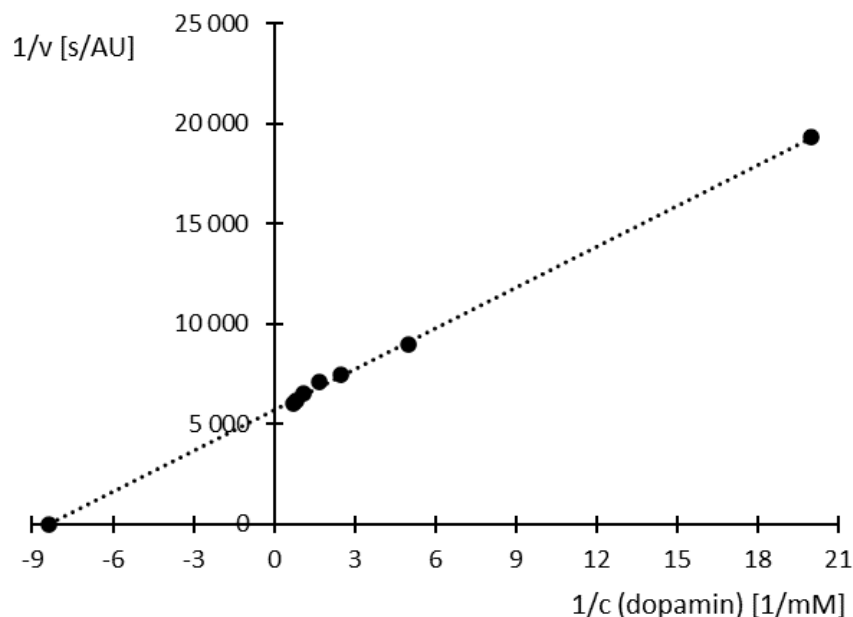


**Obrázek 45:** Závislosti absorbance na čase zaznamenávané během oxidací příslušných koncentrací dopaminu (viz legenda grafu) katalyzovaných komplexem 1. Prostředí pro měření: fosfátový pufr o pH 7 syčený kyslíkem; koncentrace komplexu 1: 0,3 mmol/L.

Použitím linearizace saturační křivky (Obr. 46) dle Lineweavera a Burka (Obr. 47) byla stanovena Michaelisova konstanta na 0,1 mmol/L a limitní rychlost na hodnotu 0,00018 AU/s.

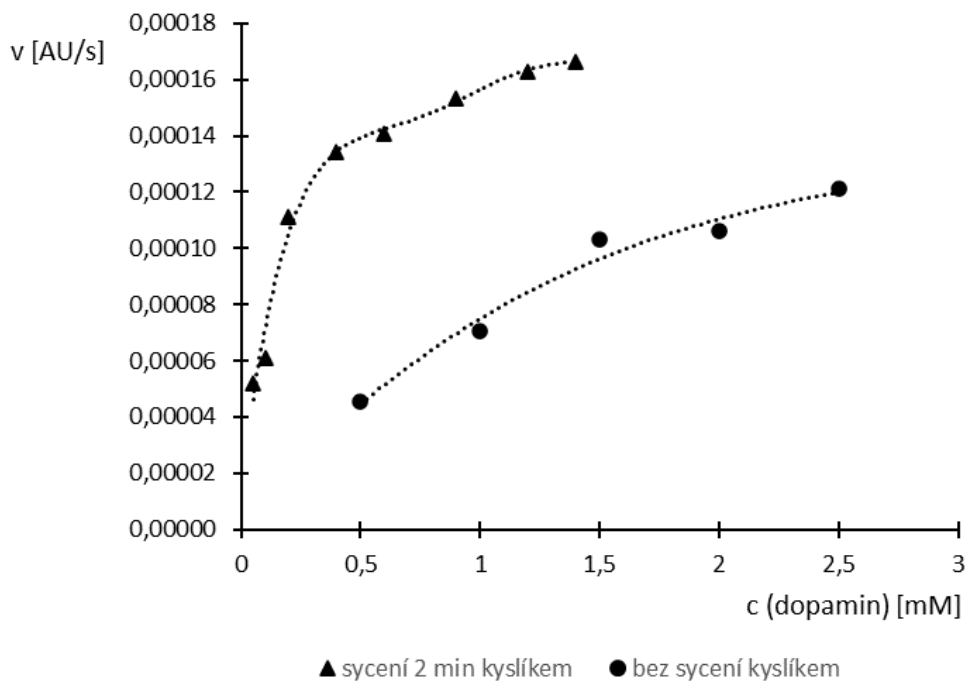


**Obrázek 46:** Saturační křivka pro oxidace dopaminu katalyzované komplexem 1 a měření ve fosfátovém pufru o pH 7 syčeném kyslíkem.



**Obrázek 47:** Linearizace dle Lineweavera a Burka pro stanovení kinetických parametrů oxidace dopaminu katalyzované komplexem 1.

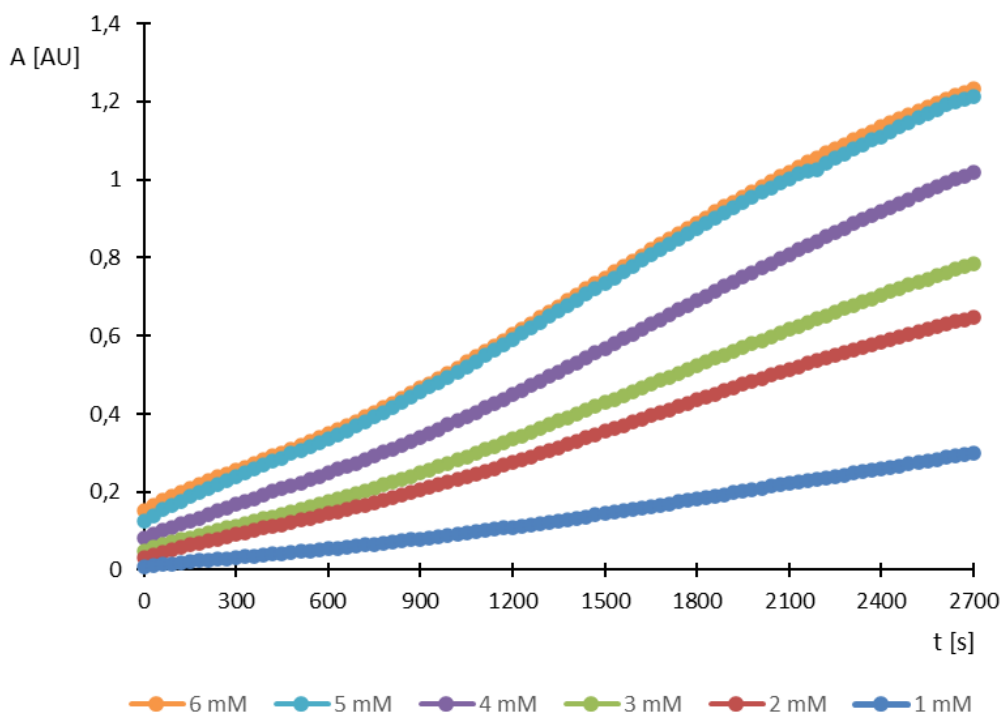
Porovnání saturační křivky pro katalyzované oxidace dopaminu měřené za podmínek přirozeného kyslíku s křivkou, kde byl kyslík přidán, představuje obrázek č. 48. Ze závislosti je patrné, že dodaný kyslík zde způsobil prudší náběh saturační křivky, což mělo následný vliv na Michaelisovu konstantu, která se tak posunula k nižší hodnotě.



**Obrázek 48:** Srovnání saturačních křivek oxidačních reakcí dopaminu katalyzovaných komplexem 1 ve fosfátovém pufru o pH 7 obsahující přirozené množství kyslíku a fosfátovém pufru s přidáním kyslíkem.

## Komplex 2

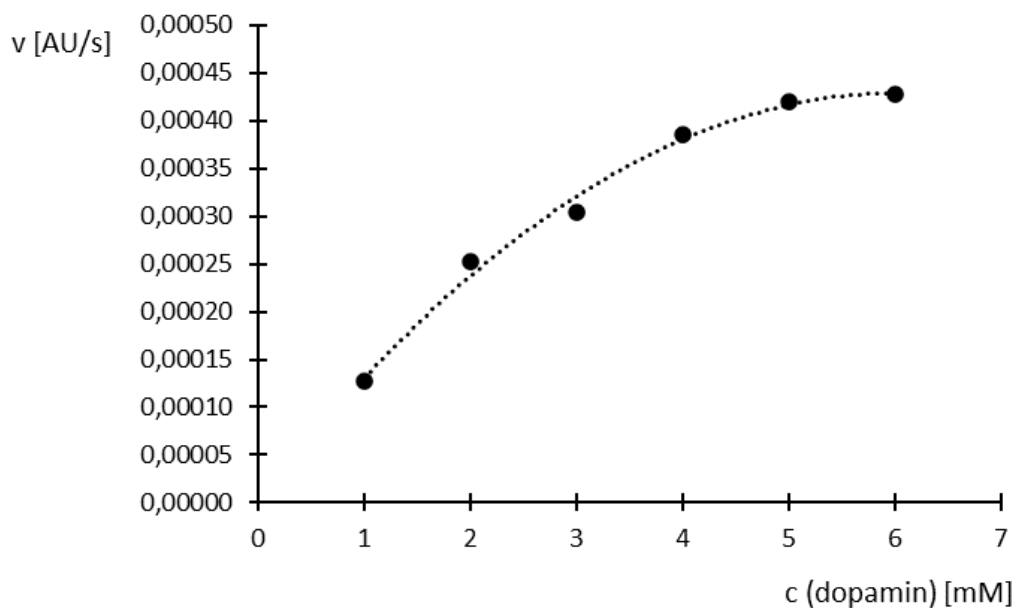
Růst absorbance během oxidací jednotlivých koncentrací dopaminu (viz legenda grafu) katalyzovaných komplexem 2 je zobrazen na obrázku č. 49. Reakce probíhaly ve fosfátovém pufru o pH 7, který byl vždy s komplexem 2 před samotným měření sycen 2 minuty kyslíkem. Z naměřených hodnot absorbance je evidentní, že přidáním kyslíku došlo ke zrychlení oxidace dopaminu.



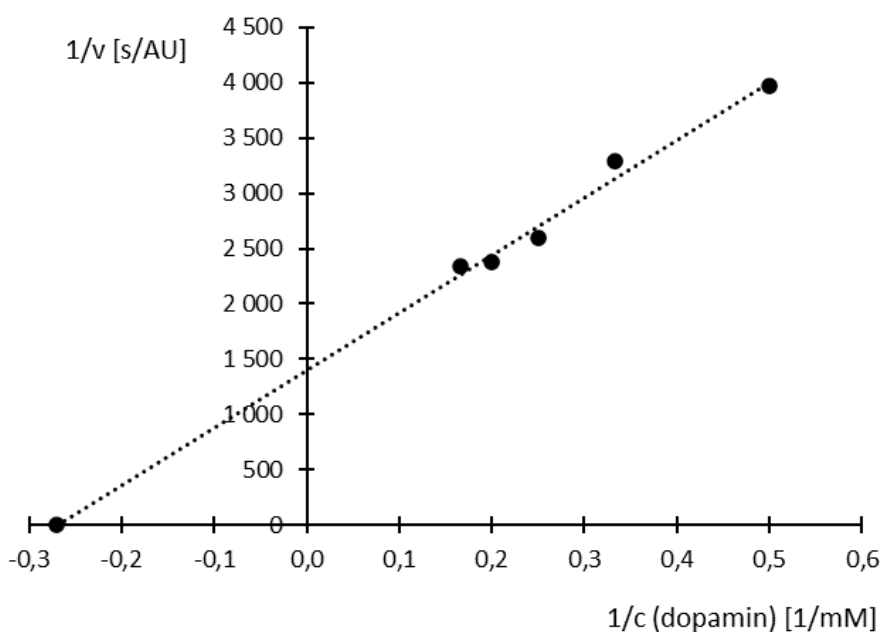
**Obrázek 49:** Závislosti absorbance na čase měřené během oxidací příslušných koncentrací dopaminu (viz legenda grafu) katalyzovaných komplexem 2. Prostředí pro měření: fosfátový pufr o pH 7 sycený kyslíkem; koncentrace komplexu 2: 0,6 mmol/L.

Pro určení kinetických parametrů byla opět volena linearizace saturační křivky (Obr. 50) dle Lineweavera a Burka (Obr. 51). Michaelisova konstanta byla tak stanovena na 3,7 mmol/L a limitní rychlost na 0,0007 AU/s. Z hodnot vyhodnocených parametrů plyne, že k nasycení komplexu 2 dopaminem dochází při vyšší koncentraci dopaminu než 6 mmol/L. Z vypočtených parametrů lze také potvrdit urychlení oxidace, které bylo již předpokládáno z naměřených závislostí absorbance na čase.



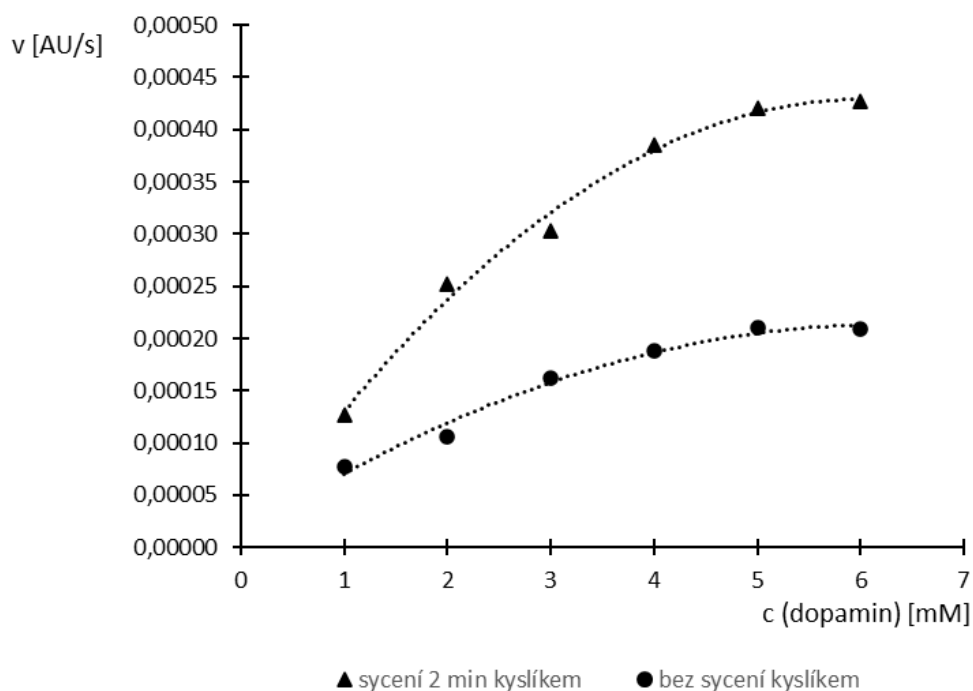


**Obrázek 50:** Saturační křivka sestavená pro oxidace dopaminu katalyzované komplexem 2 ve fosfátovém pufru o pH 7 syceném kyslíkem.



**Obrázek 51:** Linearizace dle Lineweavera a Burka využita pro stanovení kinetických parametrů oxidace dopaminu katalyzované komplexem 2.

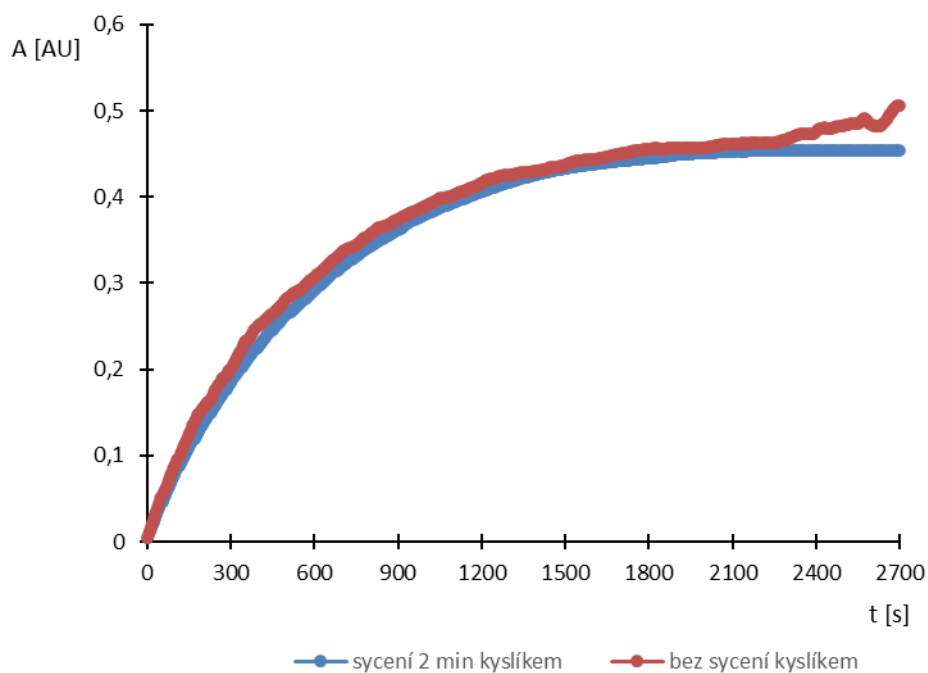
Z přímého srovnáním saturačních křivek měřených za podmínek přirozeného a přidaného kyslíku (Obr. 52) je opět patrné, že větší koncentrace kyslíku v reakční směsi způsobila urychlení katalýzy.



**Obrázek 52:** Porovnání saturačních křivek oxidací dopaminu katalyzovaných komplexem 2 měřených ve fosfátovém pufru (pH 7) za podmínek přirozeného a přidaného kyslíku.

### Tyrosináza

Obrázek č. 53 představuje srovnání závislosti absorbance na čase sledované při oxidaci 0,6mM dopaminu měřené ve fosfátovém pufru o pH 7, který byl společně s tyrosinázou sycen 2 minuty kyslíkem, s téže závislostí měřenou za podmínek přirozeného kyslíku. Uvedené křivky jsou téměř totožné, proto lze hodnotit, že množství kyslíku, které se nachází ve fosfátovém pufru je pro aktivitu tyrosinázy dostatečné a při jeho zvýšení již nedochází k jakékoli změně.



**Obrázek 53:** Srovnání závislosti absorbance na čase zaznamenaných během oxidací 0,6mM dopaminu katalyzovaných tyrosinázou ve fosfátovém pufru (pH 7) obsahující přirozené a přidané množství kyslíku (viz legenda grafu). Koncentrace tyrosinázy: 2  $\mu\text{g/mL}$ .

V tabulce č. 12 jsou prezentovány vyhodnocené kinetické parametry oxidací dopaminu katalyzovaných komplexy 1, 2 a tyrosinázou. Parametry jsou zde uvedeny jednak pro reakce, které byly měřeny ve fosfátovém pufru obsahující přirozené množství kyslíku, tak pro reakce ve fosfátovém pufru s přidaným kyslíkem.

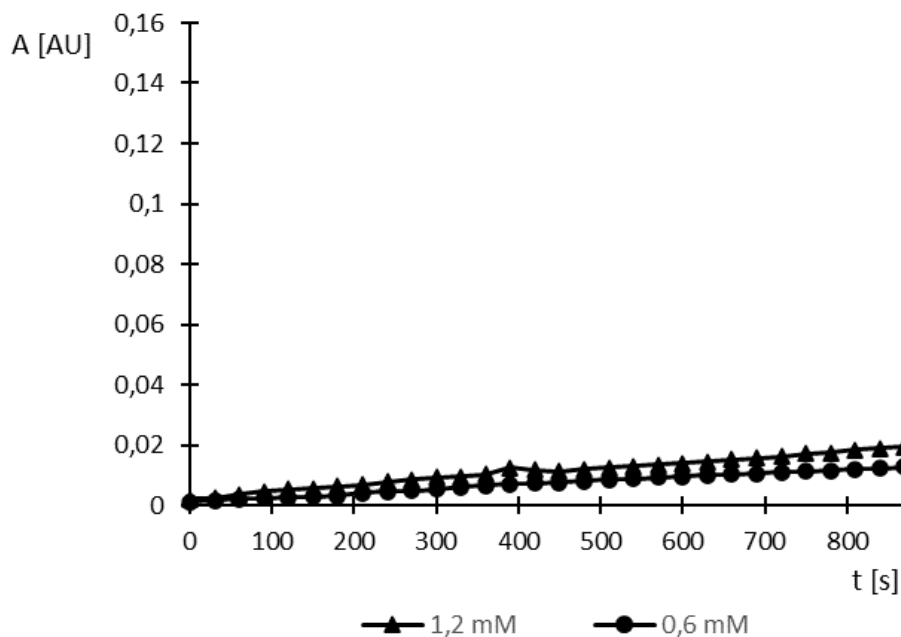
**Tabulka 12:** Souhrn stanovených kinetických parametrů oxidací dopaminu katalyzovaných komplexy 1, 2 a tyrosinázou. Linearizační technika: dle Lineweavera a Burka; metoda měření: spektrofotometrické měření vzniklého produktu; prostředí pro měření: fosfátový pufr s přirozeným obsahem kyslíku a fosfátový pufr sycený kyslíkem.

<b>Prostředí 1: Fosfátový pufr obsahující přirozené množství rozpuštěného kyslíku</b>			
<b>Komplex/tyrosináza</b>	<b>Rovnice lineární regrese *</b>	<b><math>K_m</math> [mmol/L]</b>	<b><math>V</math> [AU/s]</b>
Komplex 1	$y=8637,3x+4821,2$	1,8	0,0002
Komplex 2	$y=10335x+3016,6$	3,4	0,0003
Tyrosináza	$y=534,4x+634,35$	0,8	0,0016
<b>Prostředí 2: Fosfátový pufr sycený kyslíkem</b>			
Komplex 1	$y=680,8x+5691$	0,1	0,00018
Komplex 2	$y=5205,3x+1405,7$	3,7	0,0007

\* pozn.: pro přímky získané linearizací jednotlivých saturačních křivek dle Lineweavera a Burka

### Kontrola stability dopaminu ve vodném prostředí syceném kyslíkem

Obdobně jako u elektrochemického měření byla zkontrolována stabilita samotného dopaminu, zda nedochází během měření k jeho samovolné oxidaci. Dopamin byl sledován v koncentracích 0,6 a 1,2 mmol/L ve fosfátovém pufru syceném 2 minuty kyslíkem (Obr. 54). Nárůst absorbance byl za přibližně 15 minut u obou koncentrací zanedbatelný.

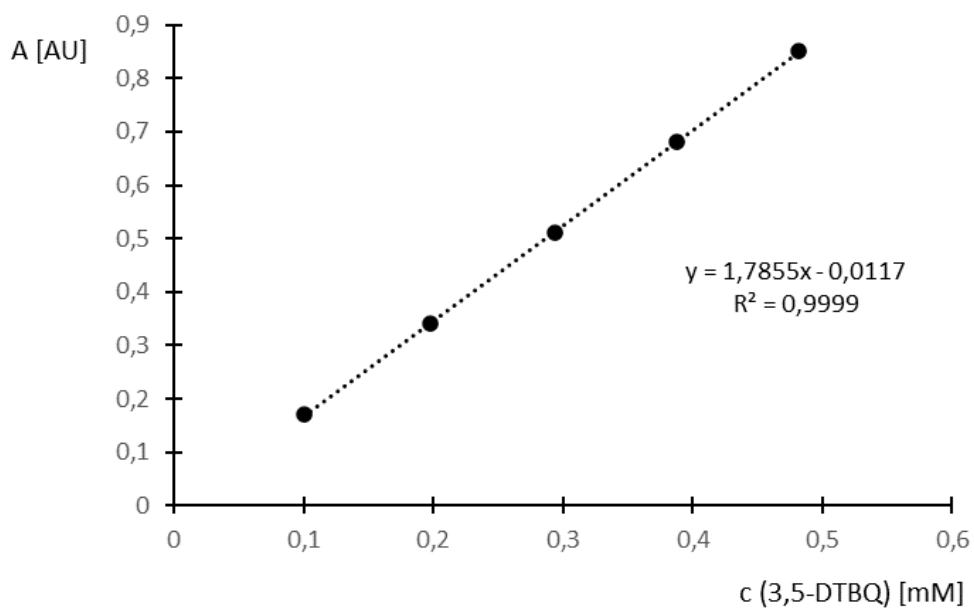


**Obrázek 54:** Závislosti absorbance na čase měřené v roztocích obsahující fosfátový pufr sycený kyslíkem a dopamin v koncentracích uvedených v legendě grafu.

### **3.2.4 Měření v prostředí acetonitrilu s přirozeným obsahem kyslíku**

#### Kalibrace na 3,5-di-tert-butyl-o-benzochinon

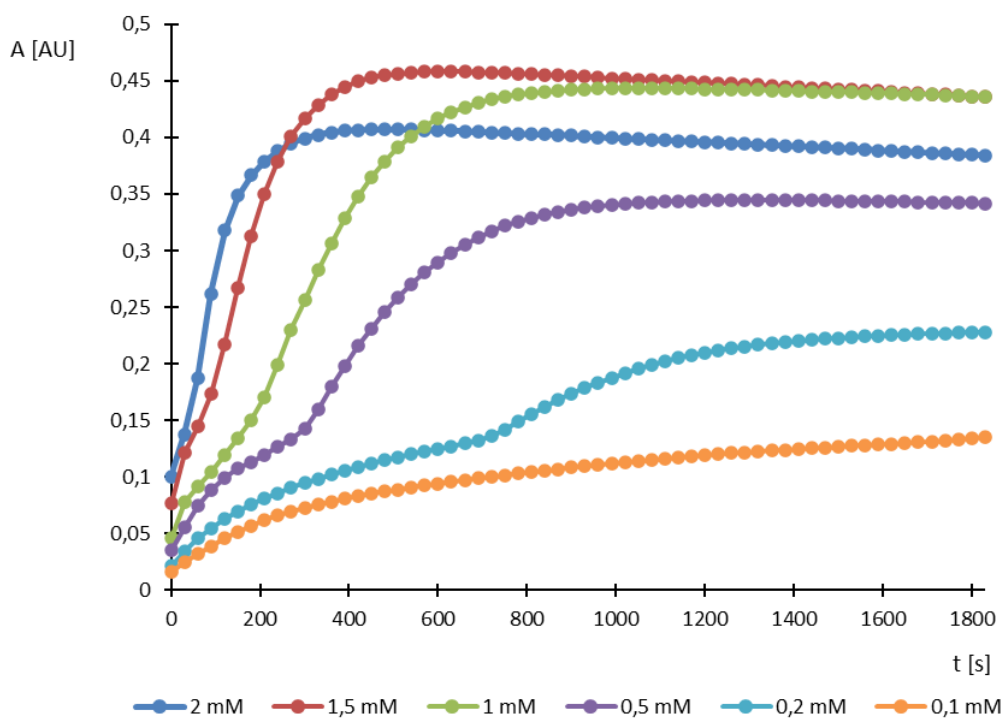
Jak již bylo uvedeno, pro měření v nevodném prostředí byl jako substrát použit 3,5-di-tert-butylcatechol. Výhodou tohoto substrátu je, že jeho oxidací vzniká definovatelný a stabilní produkt, kterým je 3,5-di-tert-butyl-o-benzochinon. Z tohoto důvodu lze provést na tento produkt kalibraci a stanovit tak další kinetický parametr, kterým je katalytická konstanta. Hodnota katalytické konstanty odpovídá podílu zjištěné limitní rychlosti a koncentrace příslušného komplexu v reakční směsi. Kalibrace byla provedena dle postupu popsáném v podkapitole 2.6. Křivka kalibrační závislosti včetně rovnice lineární regrese je zobrazena na obrázku č. 55.



**Obrázek 55:** Závislost absorbance na koncentraci kalibrační řady 3,5-DTBQ.

### Komplex 1

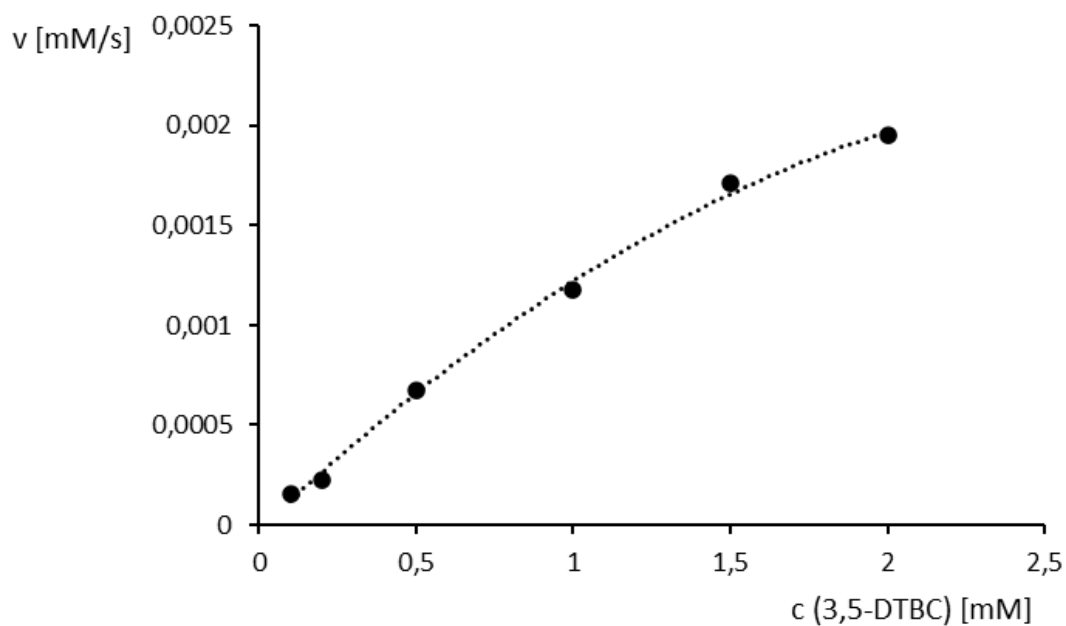
Na obrázku č. 56 lze vidět závislosti absorbance na čase, které byly naměřené během oxidací příslušných koncentracích 3,5-di-tert-butylkatecholu, jejichž výčet se nachází v legendě grafu. Prostředí pro reakce katalyzované komplexem 1 tvořil acetonitril (pro HPLC), který nebyl zvláště obohacován kyslíkem. U jednotlivých křivek si je možné povšimnout jisté hodnoty absorbance, při které dochází k zastavení růstu a následnému ustálení. Při těchto absorbancích byl veškerý 3,5-DTBC zoxidován na 3,5-DTBQ.



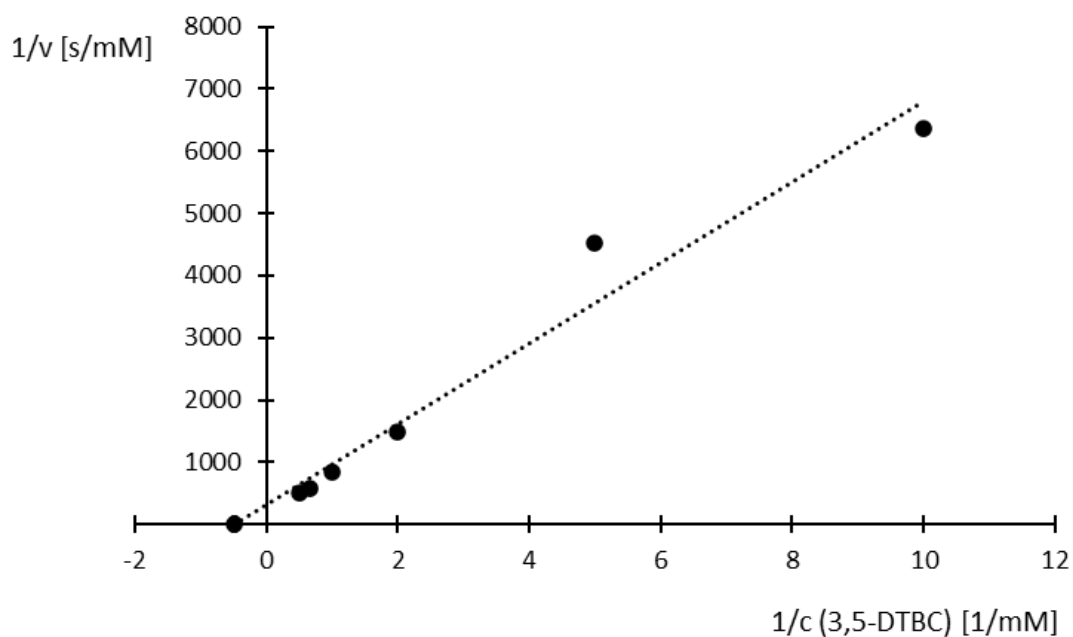
**Obrázek 56:** Závislosti absorbance na čase změřené během oxidací jednotlivých koncentrací 3,5-DTBC (viz legenda grafu) katalyzovaných komplexem 1. Prostředí pro měření: acetonitril s přirozeným obsahem kyslíku; koncentrace komplexu 1: 0,3 mmol/L.

Pro sestavení saturační křivky (Obr. 57) bylo nutné veškeré změřené absorbance pomocí rovnice lineární regrese z kalibrační závislosti převést na příslušné koncentrace 3,5-di-tert-butyl-*o*-benzochinonu. Způsob, jakým byla následně křivka vytvořena, byl již popsán v podkapitole 2.6. Tímto postupem byly vyhodnoceny i další saturační křivky pro oxidace 3,5-DTBC měřené spektrofotometricky.

Na základě linearizace dle Lineweavera a Burka (Obr. 58) byly zjištěny kinetické parametry sledovaných oxidací 3,5-DTBC. Michaelisova konstanta tak činila 2,1 mmol/L a limitní rychlost 0,0032 mmol/L.s. Velikosti stanovených parametrů vypovídají o tom, že k nasycení komplexu 1 dochází při vyšší koncentraci 3,5-DTBC než 2 mmol/L. Také byla vypočtena katalytická konstanta, jejíž hodnota byla 38,4 h<sup>-1</sup>.



**Obrázek 57:** Saturační křivka pro oxidace 3,5-DTBC katalyzované komplexem 1 a měřené v prostředí acetonitrilu obsahující kyslík v přirozeném množství.



**Obrázek 58:** Linearizace dle Lineweavera a Burka pro určení kinetických parametrů oxidace 3,5-DTBC katalyzované komplexem 1.

- Vzorový výpočet kinetických parametrů:

Rovnice lineární regrese:

$$y = 648,2x + 315,6$$

### 1. Michaelisova konstanta

$$K_m = \frac{1}{\frac{315,6}{648,2}} \doteq 2,1 \text{ mmol/L}$$

### 2. Limitní rychlost

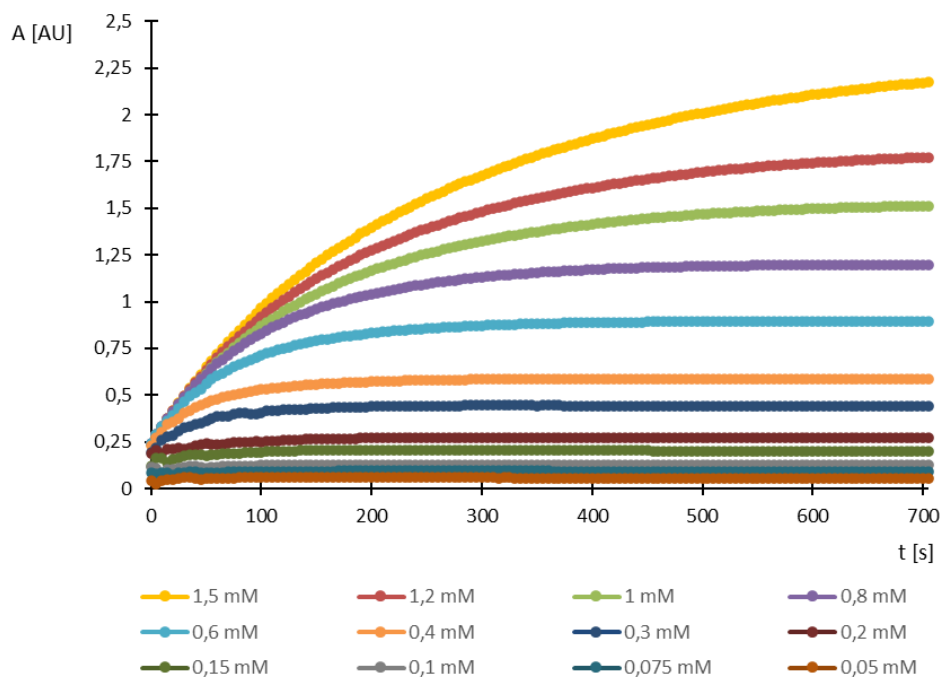
$$V_{max} = \frac{1}{315,6} \doteq 0,0032 \text{ mmol/L} \cdot s$$

Výpočet katalytické konstanty:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{c_{komplex}} = \frac{0,0032}{0,3} \cdot 3600 \doteq 38,4 \text{ h}^{-1}$$

### Komplex 3

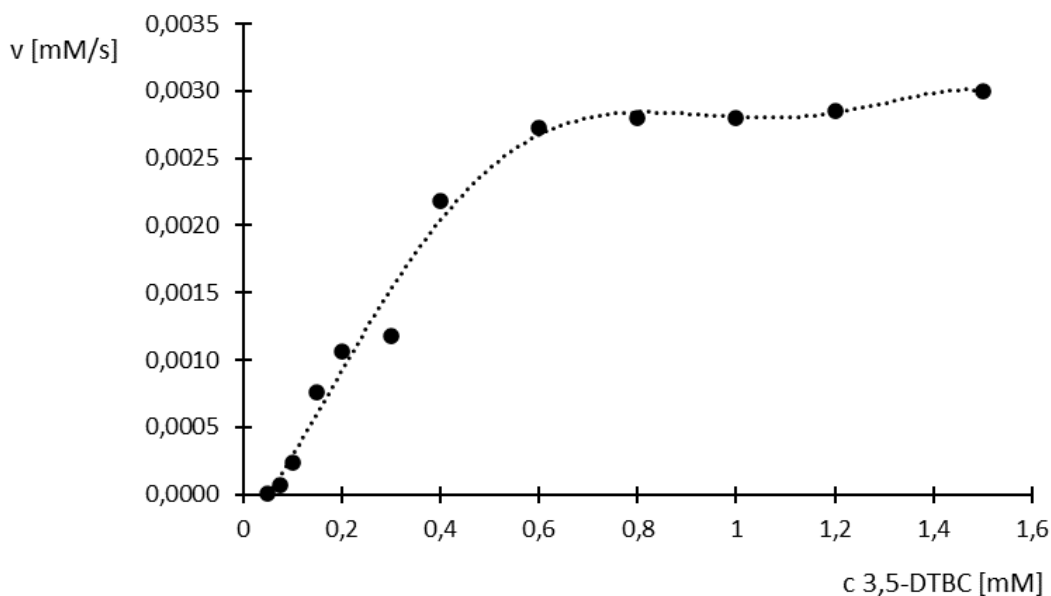
Obrázek č. 59 prezentuje naměřené závislosti absorbance na čase při oxidacích 3,5-DTBC, který byl v koncentracích představených v legendě grafu. Reakce katalyzované komplexem 3 byly sledované v prostředí acetonitrilu (pro HPLC), který obsahoval kyslík v jeho přirozeném množství. Z grafu si lze všimnout, že všechny křivky mají velmi pravidelný charakter. U nižších koncentrací, a to zejména u 0,2 až 0,05 mmol/L, dochází ke vzniku pouze malého množství 3,5-DTBQ. Z tohoto důvodu nedochází k přílišnému nárůstu absorbance a příslušné křivky se tak jeví od počátku téměř konstantně.



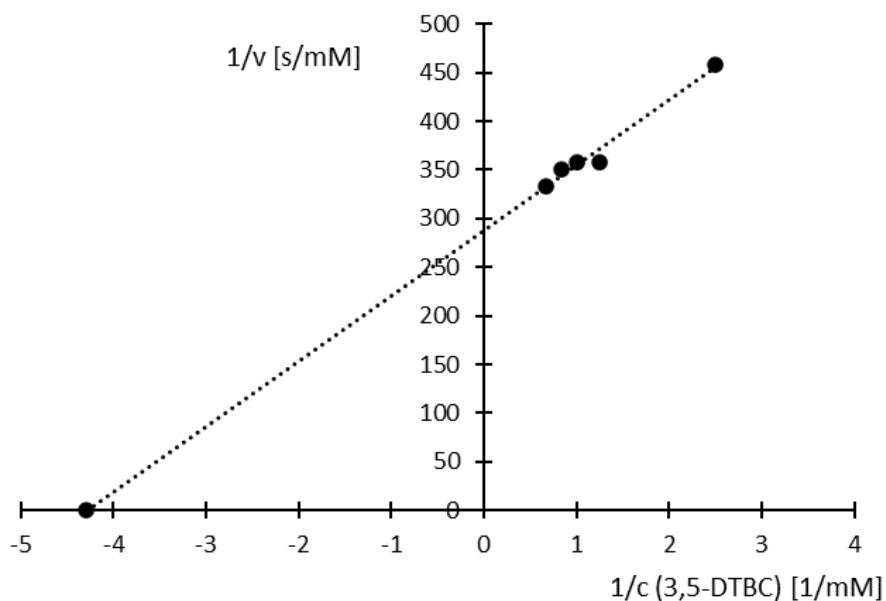
**Obrázek 59:** Závislosti absorbance na čase změřené během oxidací příslušných koncentrací 3,5-DTBC (viz legenda grafu) katalyzovaných komplexem 3. Prostředí pro měření: acetonitril s přirozeným obsahem kyslíku; koncentrace komplexu 3: 0,15 mmol/L.



Michaelisova konstanta stanovená pomocí linearizace saturační křivky (Obr. 60) dle Lineweavera a Burka (Obr. 61) činila 0,2 mmol/L a limitní rychlost 0,0035 mmol/L.s. Zároveň byla vypočítaná katalytická konstanta, jejíž výsledná hodnota byla  $84 \text{ h}^{-1}$ . Pomocí tohoto kinetického parametru lze porovnat aktivitu komplexů navzájem, jelikož je vztažena na jejich koncentraci. Katalytická konstanta v případě komplexu 3 je přibližně dvakrát vyšší než u komplexu 1, a tudíž ho lze za těchto podmínek hodnotit jako dvojnásobně aktivnější.

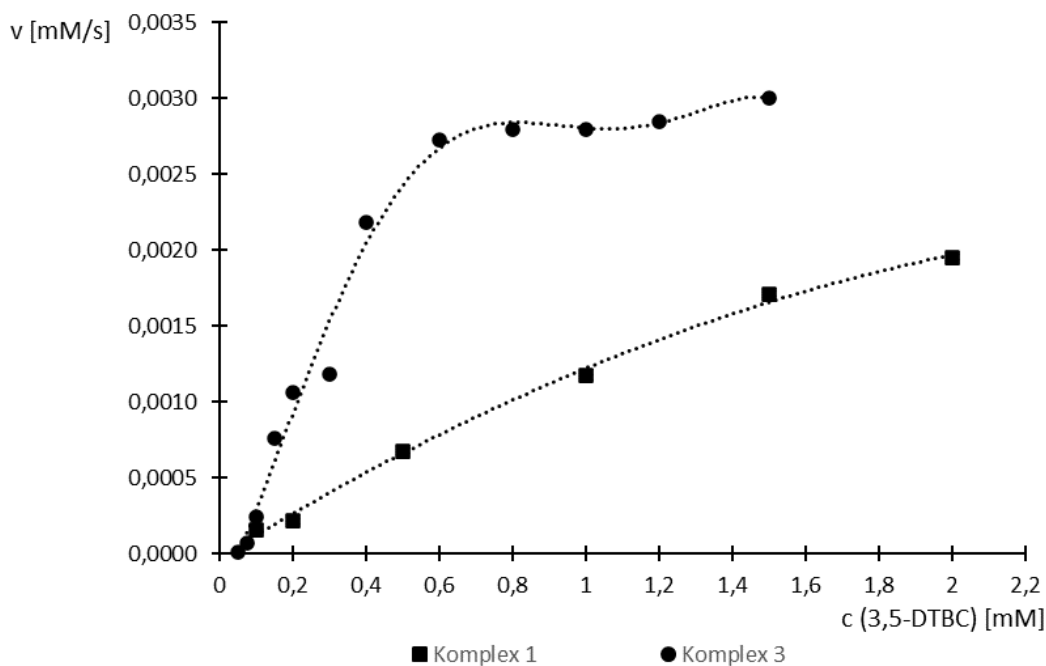


**Obrázek 60:** Saturační křivka pro oxidační reakce 3,5-DTBC katalyzované komplexem 3 v prostředí acetonitrilu obsahující přirozené množství kyslíku.



**Obrázek 61:** Linearizace dle Lineweavera a Burka použita pro stanovení kinetických parametrů oxidace 3,5-DTBC katalyzované komplexem 3.

Z přímého porovnání saturační křivky z obrázku č. 60 se saturační křivku sestavenou pro oxidace 3,5-DTBC katalyzované za stejných podmínek komplexem 1 (Obr. 62) je evidentní, že katalyticky aktivnější je komplex 3. Křivka náležící katalýze komplexu 3 má mnohem prudší náběh, což zároveň napovídá o nižší hodnotě Michaelisovy konstanty ve srovnání s komplexem 1.

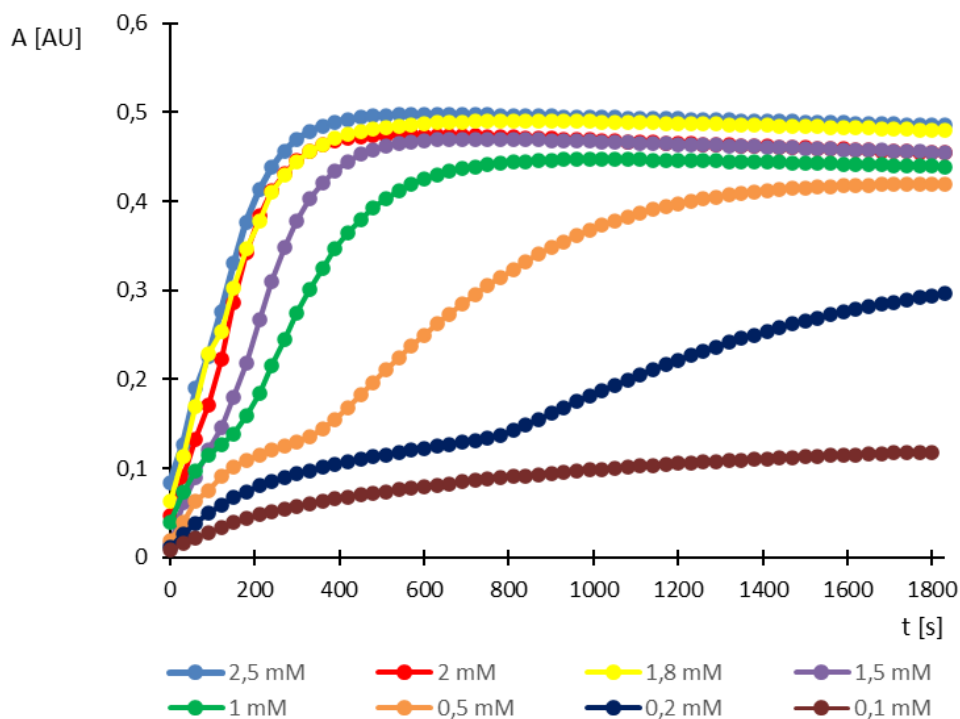


**Obrázek 62:** Srovnání saturačních křivek oxidací 3,5-DTBC katalyzovaných za stejných podmínek komplexem 1 a komplexem 3.

### 3.2.5 Měření v prostředí acetonitrilu syćeném kyslíkem

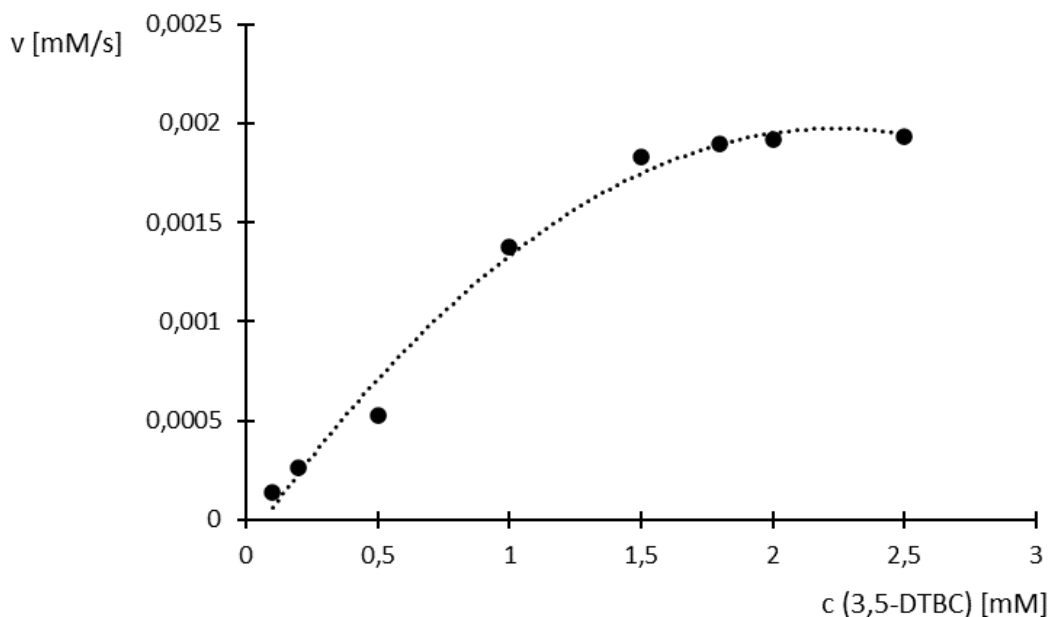
#### Komplex 1

Záznamy růstu absorbance při oxidacích jednotlivých koncentrací 3,5-DTBC představuje obrázek č. 63. Příslušné reakce katalyzované komplexem 1 byly měřeny v prostředí acetonitrilu (pro HPLC), který byl předem nasycen kyslíkem. Na první pohled křivky uvedených závislostí nemají v porovnání s křivkami naměřenými za přirozeného kyslíku příliš odlišný charakter.

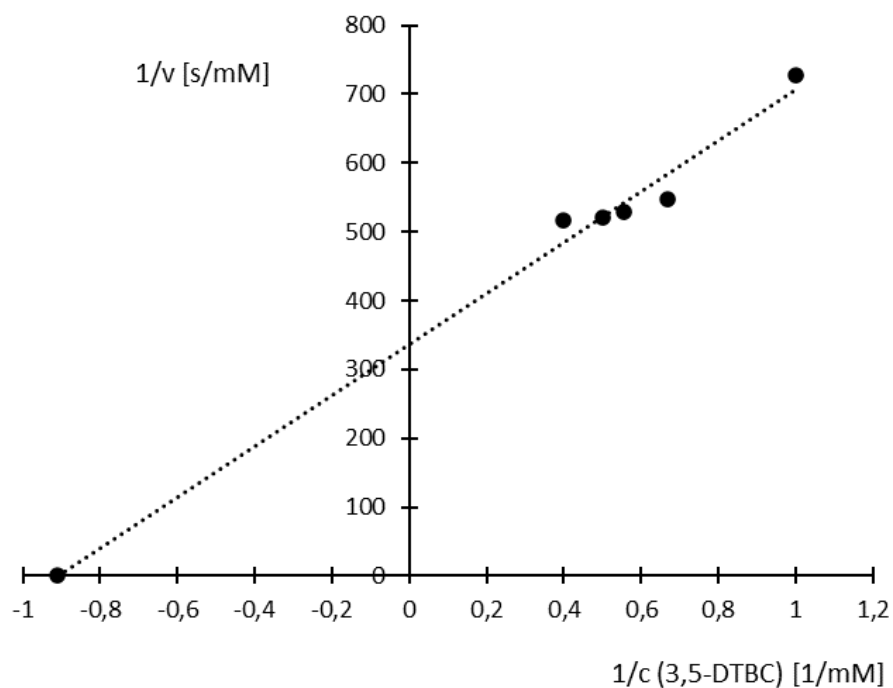


**Obrázek 63:** Závislosti absorbance na čase zaznamenané během oxidací 3,5-DTBC v koncentracích (viz legenda grafu) katalyzovaných komplexem 1. Prostředí pro měření: acetonitril sycený kyslíkem; koncentrace komplexu 1: 0,3 mmol/L.

Pomocí linearizace saturační křivky (Obr. 64) dle Lineweavera a Burka (Obr. 65) byla vyčíslena Michaelisova konstanta na hodnotu 1,1 mmol/L a limitní rychlost na 0,003 mmol/L.s. Následně byla vypočtena katalytická konstanta, která činila  $36 \text{ h}^{-1}$ . Z rozměrů stanovených kinetických parametrů lze vyvodit, že vlivem kyslíku došlo ke snížení Michaelisovy konstanty neboli koncentrace, při které je komplex 1 z poloviny nasycen 3,5-DTBC. Důležitým poznatkem také je, že zvýšenou koncentrací kyslíku nedošlo ke změně katalytické konstanty, z čehož plyne, že komplex stejně rychle katalyzuje přeměnu 3,5-DTBC jako za podmínek bez sycení.

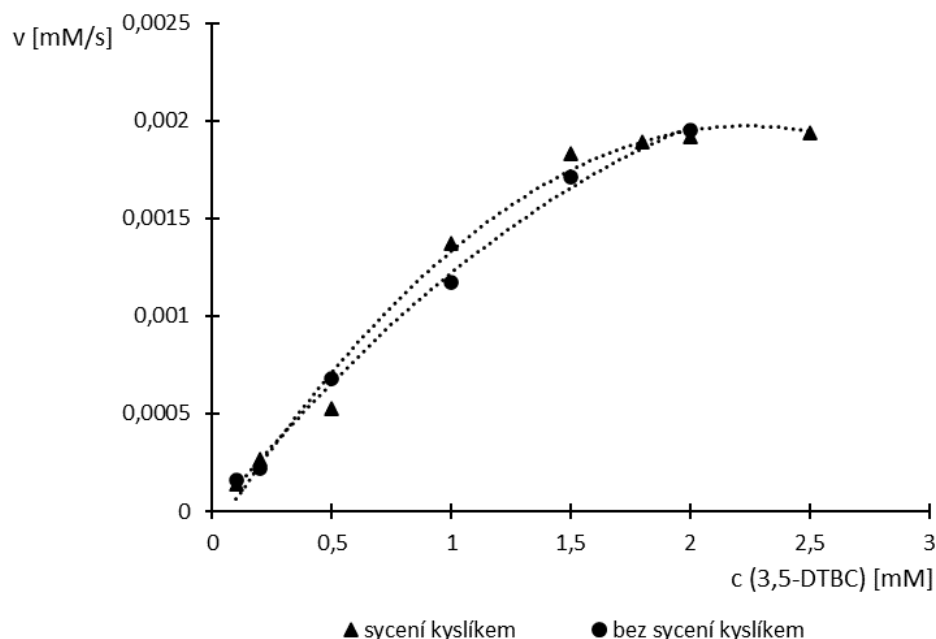


**Obrázek 64:** Saturační křivka vytvořená pro oxidace 3,5-DTBC katalyzované komplexem 1 v acetonitrilu syceném kyslíkem.



**Obrázek 65:** Linearizace dle Lineweavera a Burka použitá pro vyhodnocení kinetických parametrů oxidace 3,5-DTBC katalyzované komplexem 1.

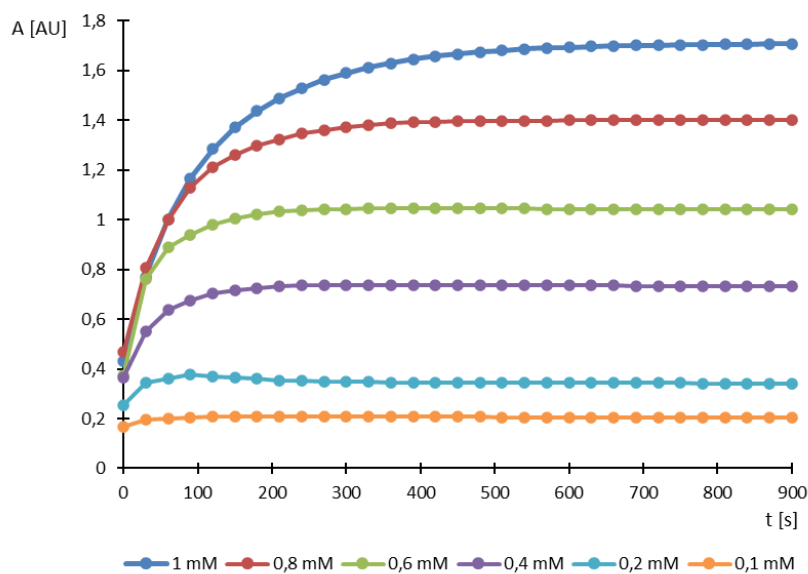
Srovnání saturačních křivek na obr. 66 ukazuje, že vliv sycení acetonitrilu kyslíkem je v tomto případě minimální, což může být také způsobeno tím, že obě křivky nedosáhly limitní rychlosti (viz kinetické parametry vyhodnocené linearizací). V každém případě i zde má křivka, sestavená na základě měření v prostředí syceném kyslíkem, patrně strmější charakter.



**Obrázek 66:** Srovnání satručních křivek oxidací 3,5-DTBC katalyzovaných komplexem 1 a měřených v acetonitrilu bez a s přidaným kyslíkem.

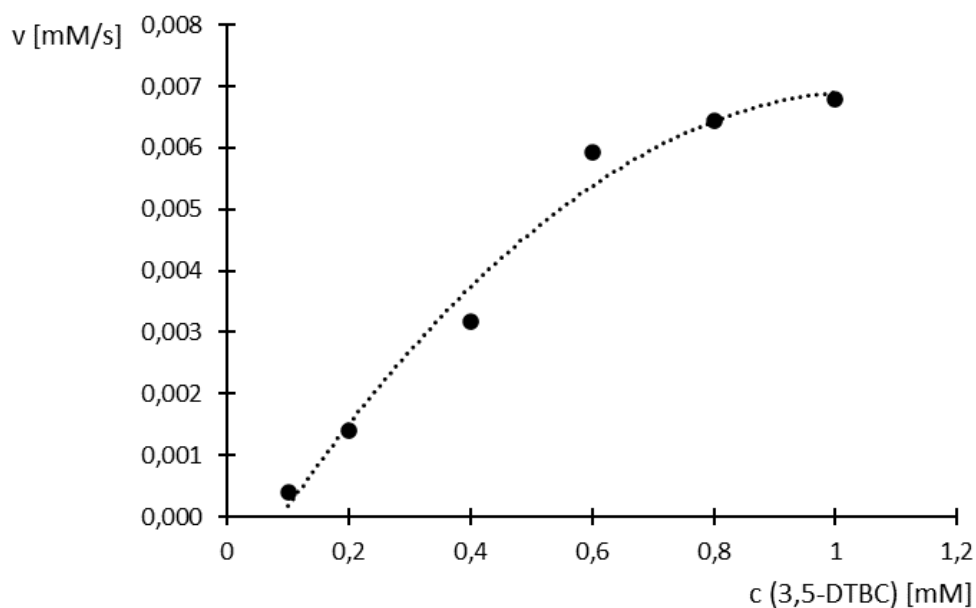
### Komplex 3

Naměřené křivky pro rostoucí absorbance v čase během oxidací jednotlivých koncentrací 3,5-DTBC (viz legenda grafu) jsou prezentovány na obrázku č. 67. Příslušné reakce probíhaly za katalýzy komplexu 3 v prostředí acetonitrilu, který byl před měření nasycen kyslíkem. Z uvedených závislostí je patrné, že přidaný kyslík ovlivnil rychlejší nárůst absorbance.

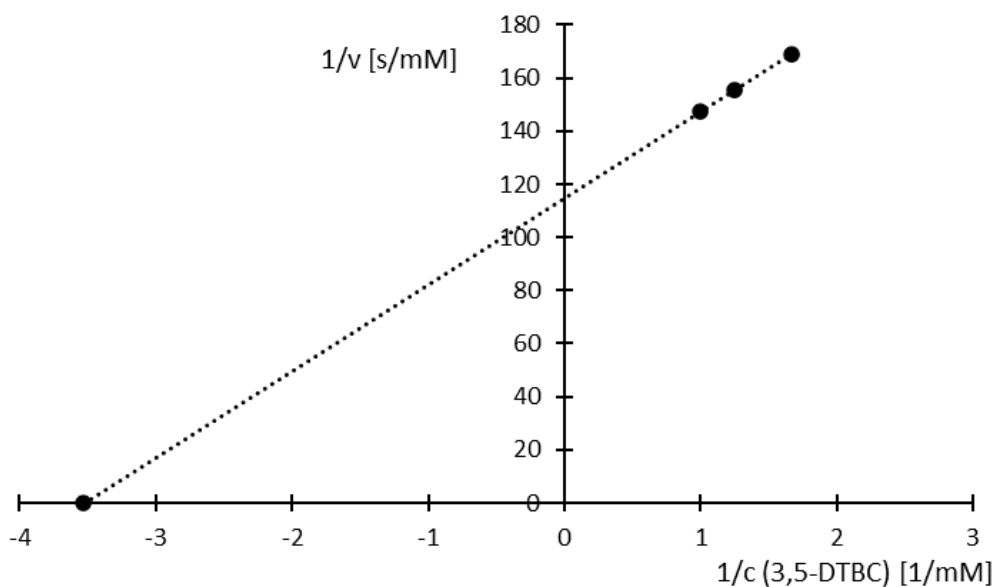


**Obrázek 67:** Změřené závislosti absorbance na čase při oxidacích 3,5-DTBC v koncentracích (viz legenda grafu) katalyzovaných komplexem 3. Prostředí pro měření: acetonitril sycený kyslíkem; koncentrace komplexu 3: 0,15 mmol/L.

Linearizací saturační křivky (Obr. 68) dle Lineweavera a Burka (Obr. 69) byla stanovena Michaelisova konstanta na hodnotu 0,3 mmol/L a limitní rychlost na 0,0087 mmol/L.s. Pro dosažení limitní rychlosti je tedy třeba o něco vyšší koncentrace 3,5-DTBC než 1 mmol/L. Hodnota katalytické konstanty byla vyčíslena na 208,8 h<sup>-1</sup>. Z uvedených výsledků lze tedy říci, že zvýšení koncentrace kyslíku v použitém acetonitrilu způsobilo urychlení katalýzy komplexu 3 o více než dvojnásobek.

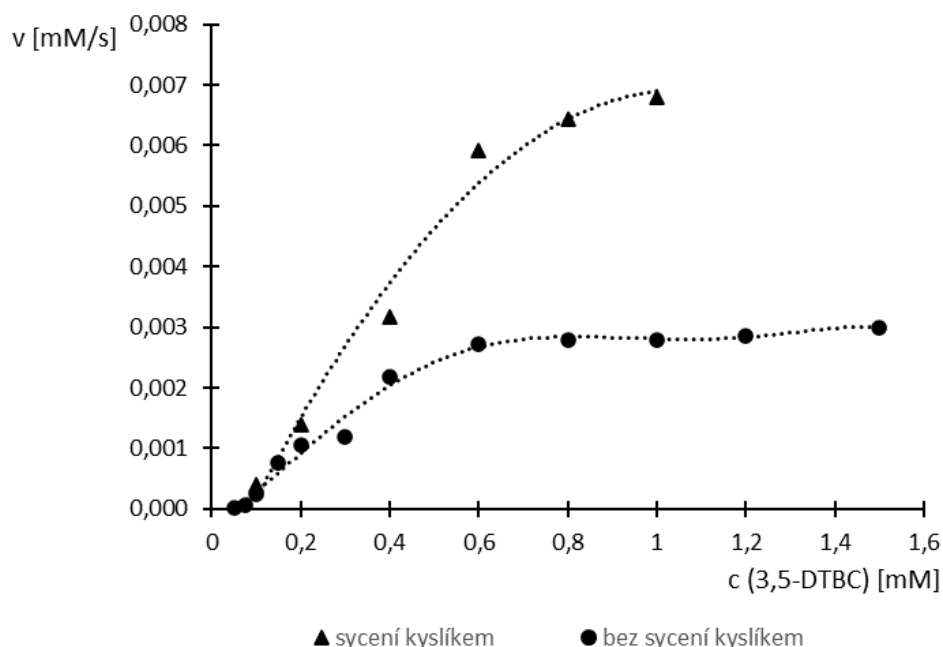


**Obrázek 68:** Saturační křivka sestavená na základě oxidačních reakcí 3,5-DTBC katalyzovaných komplexem 3 v acetonitrilu syceném kyslíkem.



**Obrázek 69:** Linearizace dle Lineweavera a Burka pro určení kinetických parametrů oxidace 3,5-DTBC katalyzované komplexem 3.

Z porovnání saturačních křivek (Obr. 71) měřených v acetonitrilu za přirozeného a přidaného kyslíku je opět zjevné, že zvýšením koncentrace kyslíku došlo u komplexu 3 k urychlení katalýzy.



**Obrázek 70:** Srovnání saturačních křivek oxidací 3,5-DTBC katalyzovaných komplexem 3 získaných z měření v acetonitrilu s přidaným a přirozeným kyslíkem.

V tabulce č. 13 jsou uvedeny kinetické parametry pro oxidace 3,5-DTBC katalyzované komplexy 1 a 3 v prostředí acetonitrilu obsahující přirozené a přidané množství kyslíku.

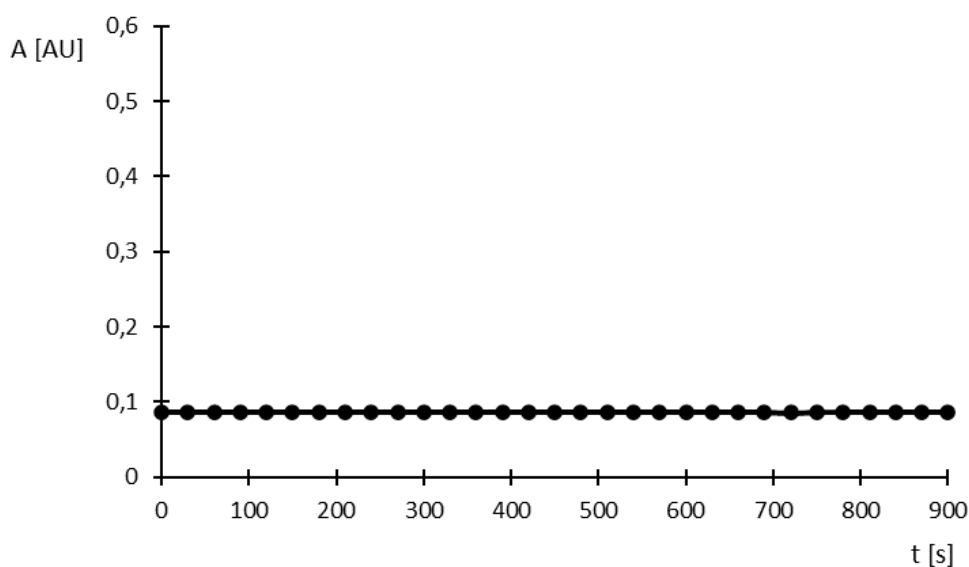
**Tabulka 13:** Přehled stanovených kinetických parametrů oxidací 3,5-DTBC katalyzovaných komplexy 1 a 3. Linearizační technika: dle Lineweavera a Burka; metoda měření: spektrofotometrické měření vzniklého produktu; prostředí pro měření: acetonitril s přirozeným obsahem kyslíku a acetonitril sycený kyslíkem

<b>Prostředí 1: Acetonitril obsahující přirozené množství rozpuštěného kyslíku</b>				
<b>Komplex</b>	<b>Rovnice lineární regrese</b>	<b><math>K_m</math> [mmol/L]</b>	<b><math>V</math> [mmol/L.s]</b>	<b><math>k_{cat}</math> [<math>h^{-1}</math>]</b>
Komplex 1	$y=648,2x+315,6$	2,1	0,0032	38,4
Komplex 3	$y=67,075x+287,6$	0,2	0,0035	84
<b>Prostředí 2: Acetonitril sycený kyslíkem</b>				
Komplex 1	$y=370,22x+336,74$	1,1	0,003	36
Komplex 3	$y=32,513x+114,75$	0,3	0,0087	208,8

\* pozn.: pro přímky získané linearizací jednotlivých saturačních křivek dle Lineweavera a Burka

### Kontrola stability 3,5-DTBC v prostředí acetonitrilu syceném kyslíkem

Ověření, zda v průběhu měření nedochází k samovolné oxidaci, bylo provedeno i u 3,5-di-tert-butylkatecholu. Stabilita byla kontrolována dvěma způsoby. Jedním z nich bylo sledování absorbance v roztoku tvořeném kyslíkem nasyceným acetonitrem a 3,5-DTBC v koncentraci 1 mmol/L po dobu 15 minut (Obr. 71). Z uvedené závislosti je zjevné, že během měření nedošlo k žádné tvorbě 3,5-DTBQ. Dále byla stabilita za téže podmínek pozorovaná i v rámci celého dne. Nejprve byla změřena absorbance čerstvě připraveného 3,5-DTBC, jejíž hodnota činila 0,0023 AU. Po dokončení experimentů příslušného dne, což v tomto případě bylo po přibližně 7 hodinách, hodnota absorbance vzrostla pouze na 0,0095 AU. Zjištěný rozdíl absorbancí byl velmi malý, a tak bylo potvrzeno, že ani během dne nedochází k samovolné oxidaci.



**Obrázek 71:** Závislost absorbance na čase sledovaná v roztoku obsahující acetonitril sycený kyslíkem a 3,5-DTBC v koncentraci 1 mmol/L.

### **3.2.6 Souhrnný komentář k experimentům založených na měření vzniklého produktu (spektrofotometricky)**

Při porovnání katalytických aktivit komplexů 1 a 2, které byly sledovány s dopaminem ve fosfátovém pufru s přirozeným obsahem kyslíku, je nutné zohlednit jejich rozdílnou koncentraci v reakční směsi. Komplex 2 byl přidáván ve dvojnásobně větším množství než komplex 1, ale i přesto nejevil větší aktivitu. Na základě Michaelisových konstant komplexů stanovených za těchto podmínek, lze hodnotit, že k polovičnímu nasycení komplexu 1 dochází při přibližně dvakrát nižší koncentraci dopaminu než v případě komplexu 2. Také zde bylo zjištěno, že katecholázovou aktivitou se tyrosináze více přibližuje komplex 1 (Tab. 12).



Dále byl pozorován rozdíl v aktivitě jednotlivých komplexů za podmínek přirozené a zvýšené koncentrace kyslíku ve fosfátovém pufru. Vlivem většího množství kyslíku došlo u komplexu 1 o řádové snížení Michaelisovy konstanty, ale limitní rychlost zůstala téměř stejná. Naopak v případě komplexu 2 se hodnota Michaelisovy konstanty prakticky nezměnila, ale zvýšila se limitní rychlost (Tab. 12). Pro tyrosinázu byl přirozený obsah kyslíku ve fosfátovém pufru dostačující, a tudíž se její katalytická aktivita po jeho zvýšení nezměnila.

V prostředí acetonitrilu byla sledovaná katecholázová aktivita komplexu 1 a komplexu 3. Jako substrát byl použit 3,5-di-tert-butylkatechol, který oxidací poskytuje stabilní 3,5-di-tert-butyl-*o*-benzochinon. Pomocí kalibrace na vznikající 3,5-DTBQ mohly být následně vyjádřeny jednotlivé katalytické konstanty a díky nim objektivně porovnány aktivity komplexů. Z uvedených měření je naprosto evidentní, že katalyticky aktivnější byl komplex 3 (Tab. 13).

Poté bylo zjišťováno, zda bude mít na aktivitu komplexů vliv zvýšený obsah kyslíku v acetonitrilu. Vyšší koncentrace kyslíku u komplexu 1 způsobila pouze lehké snížení Michaelisovy konstanty. Hodnota katalytické konstanty zůstala téměř stejná, což vypovídá o tom, že komplex 1 je schopen stejně rychle katalyzovat oxidaci 3,5-DTBC v acetonitrilu bez i s přidaným kyslíkem. Zatímco u komplexu 3 měl zvýšený obsah kyslíku v acetonitrilu poměrně podstatný vliv na rychlost katalýzy, která více jak dvojnásobně vzrostla. Hodnota Michaelisovy konstanty se zde prakticky nezměnila (Tab. 13).

### **3.3 Zakotvení komplexu 3 na magnetické částice, sledování katecholázové aktivity**

Závěrečné experimenty se týkaly kovalentního zakotvení komplexu 3 na magnetické částice, jejich charakterizací, stanovení aktivity zakotveného komplexu a stability jeho vazby na částice.

#### **3.3.1 Charakterizace magnetických částic s vázaným komplexem**

K měření byly použity částice z hydrazidové magnetické perlové celulózy o velikosti 50 až 150  $\mu\text{m}$ . Komplex 3 byl na částice navázán dle postupu uvedeného v podkapitole 2.4. Jelikož se jednalo o kovalentní interakce aldehydové skupiny na komplexu s amino skupinami na částicích, došlo tak ke vzniku tzv. Schiffových bází.

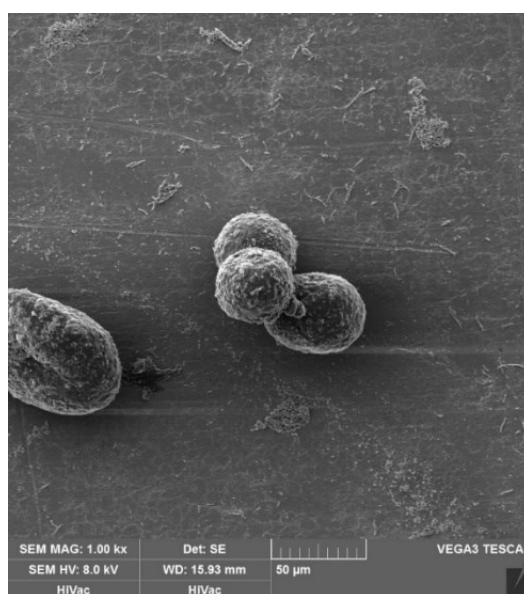
#### **Stanovení obsahu vody ve vybraných rozpouštědlech metodou dle Karl Fischera**

Magnetické částice lze dlouhodobě uchovávat pouze ve vodném prostředí. Problémem je, že komplex 3 v přítomnosti již malého množství vody ztrácí svou katalytickou aktivitu a také degraduje. Zároveň vazba komplexu s částicemi není vůči vodě příliš odolná a může docházet

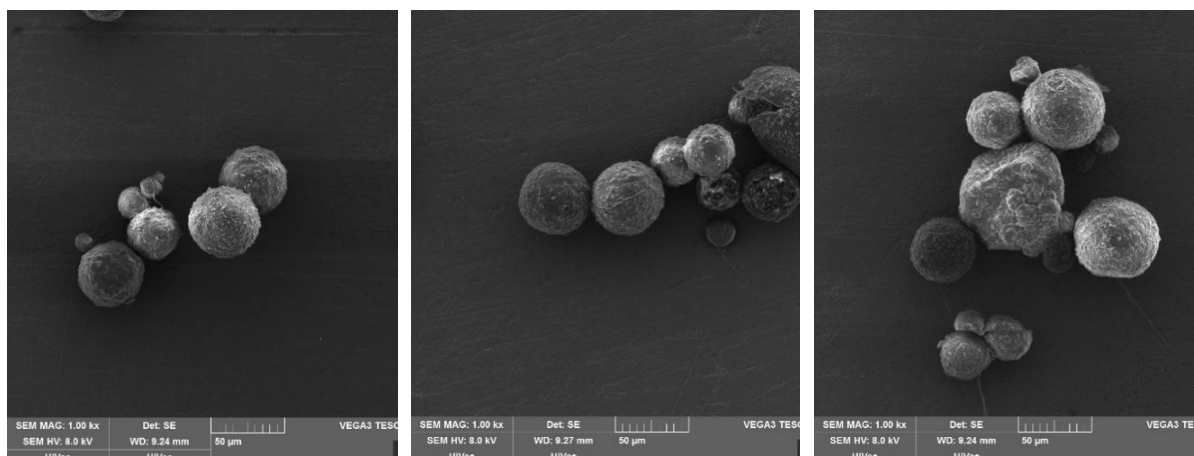
k její hydrolýze. Proto veškerá měření musela být provedena v prostředí s co nejmenším obsahem vody. Z tohoto důvodu byl její obsah zjišťován metodou dle Karl Fischera v použitých organických rozpouštědlech, kterými byly absolutní ethanol, acetonitril pro HPLC a bezvodý acetonitril. Největší koncentrace vody byla stanovena v absolutním ethanolu a to 0,8 mg/mL, Poté následoval acetonitril pro HPLC, ve kterém byla obsažena ve 0,2 mg/mL. Nejmenší množství vody bylo zaznamenáno v bezvodém acetonitrilu, kde byla pouze v 0,02 mg/mL, a proto byl zvolen jako reakční prostředí pro jednotlivé experimenty.

#### Sledování povrchu částic metodou skenovací elektronové mikroskopie

Povrch částic bez a s navázaným komplexem byl charakterizován pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Nejprve byl pozorován povrch magnetických částic bez komplexu (Obr. 72). Dále na obrázku č. 73 jsou představeny 3 snímky, na nichž jsou částice se zakotveným komplexem v určitých stavech. Na levém snímku je zobrazena struktura částic s čerstvě zakotveným komplexem 3. Částice mají pravidelný tvar a nejsou nijak zvlášť porušené. Na středním snímku se nachází částice s navázaným komplexem 3, které byly podrobeny jednodennímu spektrofotometrickému měření. U těchto částic je patrná lehká deformace, což mohlo být způsobeno acetonitrilem, který byl použit jako reakční prostředí pro stanovení katecholázové aktivity vázaného komplexu 3. Snímek napravo představuje strukturu částic, na které byl komplex 3 celkem dvakrát zakotvován a zároveň byly použity k několikadennímu měření. Zde je patrný poměrně poničený povrch částic a některé z nich jsou dokonce zcela rozpadlé. Tyto změny mohou být výsledkem jednak opakovaného zakotvování komplexu 3 při 70 °C v ethanolu, měření a přechovávání v acetonitrilu či opakované manipulace.



**Obrázek 72:** Snímek magnetických částic bez komplexu získané metodou SEM.



**Obrázek 73:** Snímky magnetických částic s navázaným komplexem 3 pořízené metodou SEM. Snímek vlevo: částice se zakotveným komplexem, neměřené; snímek uprostřed: částice se zakotveným komplexem, měřené jeden den; snímek vpravo: částice s opakovaně kotveným komplexem, měřené více dní.

#### Stanovení obsahu mědi na částicích se zakotveným komplexem metodou ICP-MS

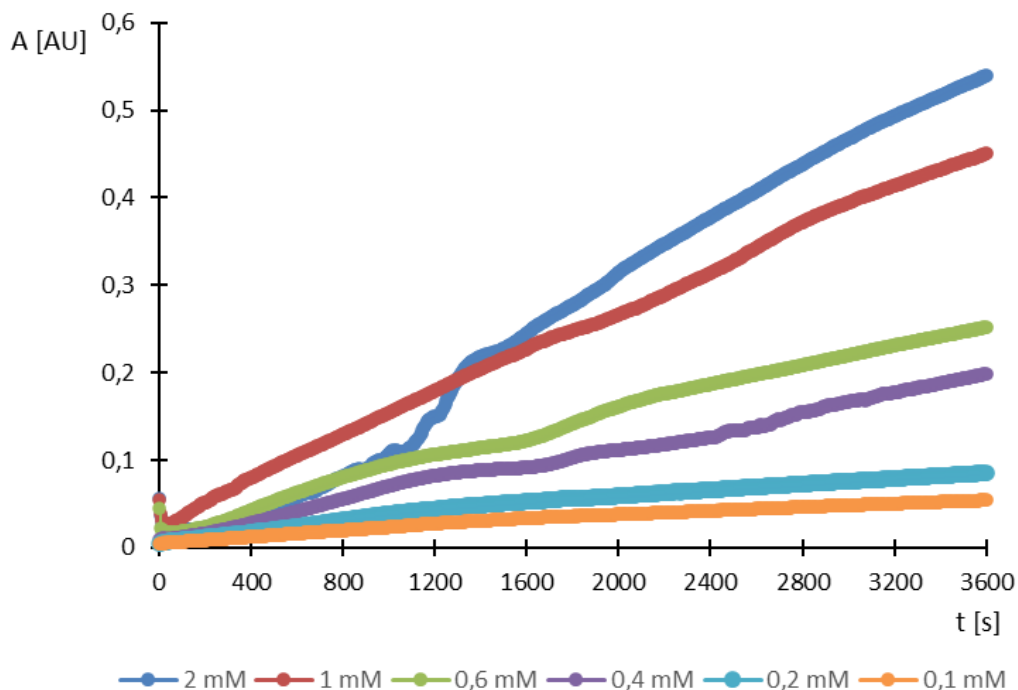
U částic s vázaným komplexem 3, které byly již studované pomocí skenovací elektronové mikroskopie, byl navíc stanoven obsah mědi. K tomuto účelu byla použita hmotnostní spektrometrie s ionizací v indukčně vázaném plazmatu (ICP-MS). V tabulce č. 14 jsou prezentovány naměřené koncentrace mědi na jednotlivých částicích. Množstvím stanovené mědi na částicích s čerstvě zakotveným komplexem bylo vyjádřeno, kolik mg komplexu se na částice během procesu zakotvení bylo schopné navázat. Z původně navážených 7 mg komplexu se na částice navázalo pouze 0,65 mg. Koncentrace mědi na částicích, které byly již použity ke spektrofotometrickému proměřování, následně vypovídala o stabilitě vazby s komplexem. U částic, které byly použity k jednodennímu měření, byla zjištěna hmotnost komplexu 0,33 mg, což je téměř o polovinu méně, než bylo zakotveno. Z uvedeného výsledku plyne, že během měření došlo k částečnému rozpadu vazby. Stabilita vazby těchto částic s komplexem byla také sledovaná spektrofotometricky (více v podkapitole 3.3.3). Ze stanoveného obsahu mědi na částicích, na kterých byl komplex opakovaně zakotvován a byly proměřovány v rámci více dní, lze hodnotit pouze o něco nižší množství vázaného komplexu jako u předchozích částic.

**Tabulka 14:** Stanovení koncentrace mědi metodou ICP-MS na částicích se zakotveným komplexem 3 ve třech sledovaných stavech.

Stav magnetických částic	Koncentrace mědi [mg/g]
Částice se zakotveným komplexem, neměřené	10,58
Částice se zakotveným komplexem, měřené jeden den	5,48
Částice s opakovaně kotveným komplexem, měřené více dní	4,68

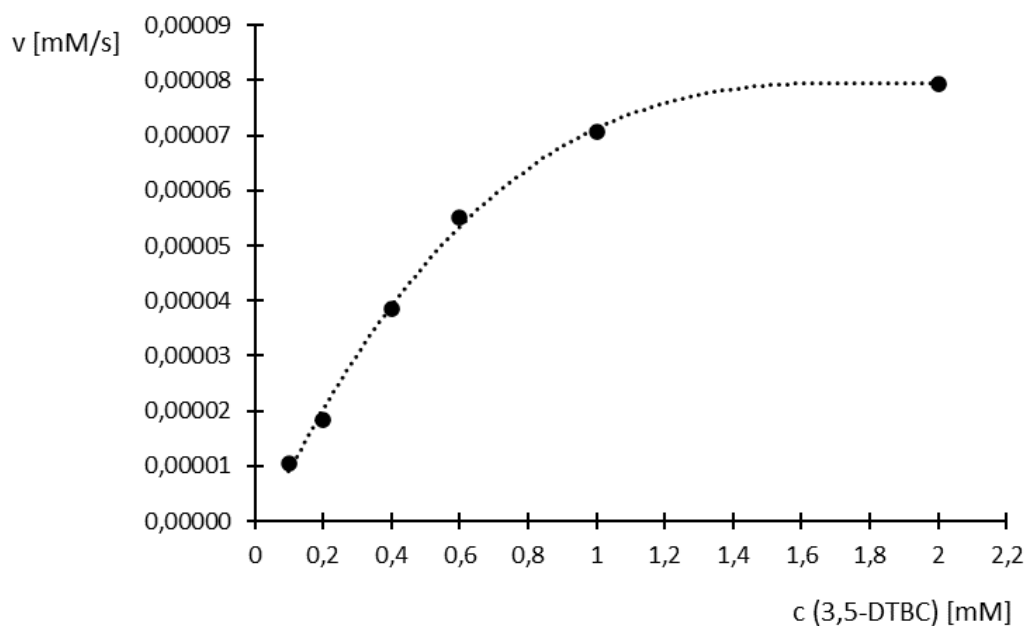
### 3.3.2 Stanovení katecholázové aktivity komplexu 3 zakotveného na magnetických částicích

Obrázek č. 74 představuje naměřené závislosti absorbance na čase během oxidací příslušných koncentrací 3,5-DTBC (viz legenda grafu). Reakce v prostředí bezvodého acetonitrilu byly katalyzované komplexem 3, který byl zakotven na magnetických částicích.

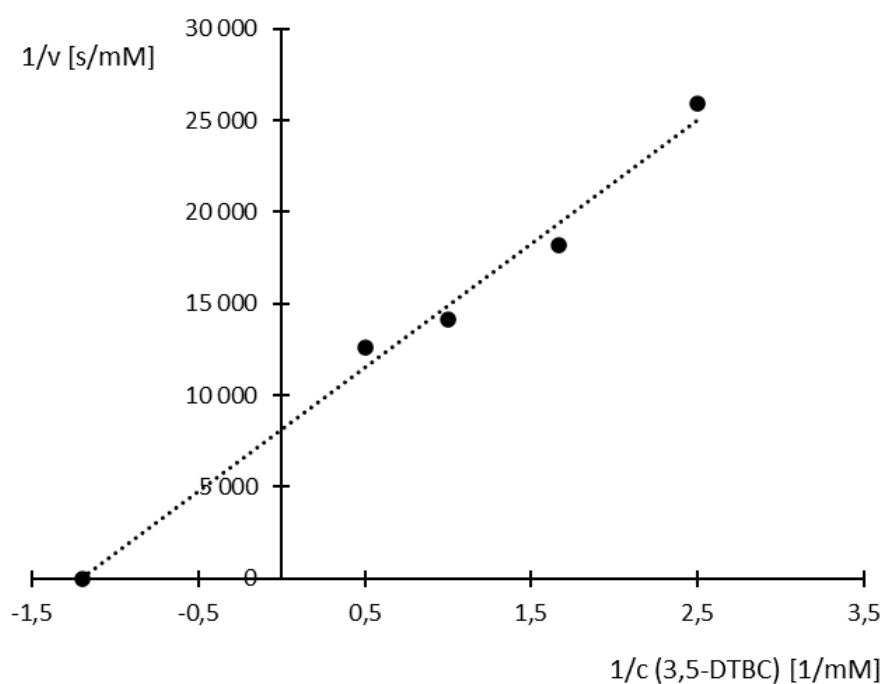


**Obrázek 74:** Závislosti absorbance na čase měřené při oxidacích 3,5-DTBC v koncentracích (viz legenda grafu) katalyzovaných komplexem 3 navázaným na magnetické částice. Prostředí pro měření: bezvodý acetonitril.

Pro určení kinetických parametrů reakce byla opět volena linearizace saturační křivky (Obr.75) dle Lineweavera a Burka (Obr. 76). Rovnice lineární regrese pro tuto závislost byla  $y=6766,1x+8126,2$ . Hodnota Michaelisovy konstanty byla tak stanovena na 0,8 mmol/L a limitní rychlost na 0,00012 mmol/L.s. Následně byla vyjádřena katalytická konstanta, jejíž hodnota činila  $1,38 \text{ h}^{-1}$ . Z porovnání této hodnoty s hodnotou pro nezakotvený komplex 3, která byla  $84 \text{ h}^{-1}$ , lze vyčíst podstatné zpomalení katalýzy. Vliv na snížení katalytické aktivity mohla mít stabilita vazby komplexu na částicích, o které již bylo pojednáno u stanovení obsahu mědi a ještě bude v následující podkapitole 3.3.3.



**Obrázek 75:** Saturační křivka pro oxidační reakce 3,5-DTBC katalyzované komplexem 3 zakotveným na magnetických částicích.



**Obrázek 76:** Linearizace dle Lineweavera a Burka použitá pro stanovení kinetických parametrů oxidace 3,5-DTBC katalyzované komplexem 3 vázaným na magnetické částice.

Výpočet koncentrace komplexu 3 v reakční směsi:

$$n_{\text{komplex}} (\text{na částicích}) = \frac{m_{\text{komplex}} (\text{na částicích})}{M_{\text{komplex}}}$$

$$n_{\text{komplex (na částicích)}} = \frac{0,65 \cdot 10^{-3}}{692,2} = 9,39 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$$

$$c_{\text{komplex(v reak. směsi)}} = \frac{n_{\text{komplex (na částicích)}}}{V_{\text{reak. směs}}}$$

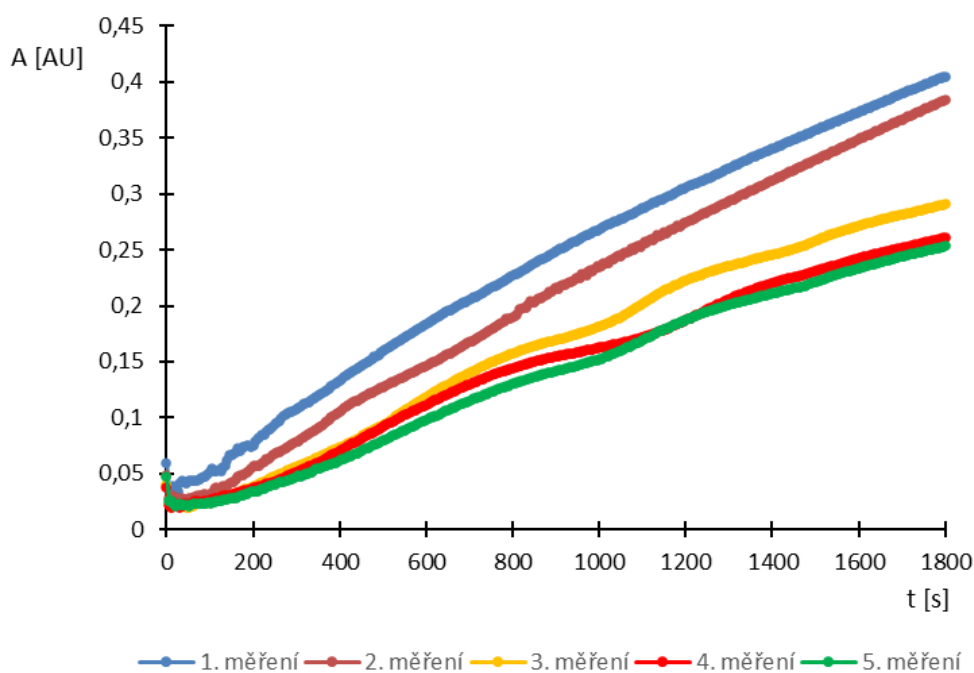
$$c_{\text{komplex(v reak. směsi)}} = \frac{9,39 \cdot 10^{-7}}{3 \cdot 10^{-3}} = 3,13 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L} = 0,313 \text{ mmol/L}$$

Výpočet katalytické konstanty:

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{c_{\text{komplex}}} = \frac{0,00012}{0,313} \cdot 3600 \doteq 1,38 \text{ h}^{-1}$$

### 3.3.3 Ověření stability vazby komplexu 3 na magnetických částicích

Stabilita vazby byla sledována v prostředí bezvodého acetonitrilu na základě opakovaného měření nárůstu absorbance během oxidace 1mM 3,5-DTBC katalyzované komplexem 3 zakotveným na částice (Obr. 77). Jednotlivá spektrofotometrická měření, která trvala vždy 30 minut, byla provedena hned po sobě. Z uvedených závislostí je patrný pokles směrnice křivky již při třetím měření. Příčinou této změny byl částečný rozpad vazby komplexu na částicích. Komplex byl poté nejspíš v procesu pročišťování částic od zoxidovaného substrátu postupně odstraňován, čímž se snižovala jeho koncentrace v reakční směsi.



**Obrázek 77:** Opakované měření závislosti absorbance na čase při oxidaci 3,5-DTBC v koncentraci 1 mmol/L katalyzované komplexem 3 navázaným na magnetické částice. Prostředí pro měření: bezvodý acetonitril.

### **3.3.4 Souhrnný komentář k provedeným experimentům týkající se magnetických částic s vázaným komplexem 3**

Z výše uvedených výsledků měření s komplexem 3 navázaného na částicích je patrné, že lze tímto způsobem určit katecholázovou aktivitu komplexu, avšak je s tím spojena řada problémů. Částice totiž pro zachování jejich stability vyžadují vodné prostředí, které je zároveň nevhodné pro komplex 3. Voleným prostředím byl bezvodý acetonitril, který sice komplexu vyhovoval, ale v jeho přítomnosti docházelo k rozpadu vazby s částicemi a také k znehodnocení samotných částic. Z tohoto důvodu nebylo jednoduché stanovit katecholázovou aktivitu komplexu, jelikož se postupně snižovala jeho koncentrace na částicích, a tím i v reakční směsi. Vyhodnocené kinetické parametry mohou být proto zkreslené.

## 4 Závěr

Záměrem této diplomové práce bylo stanovit katecholázovou aktivitu zvolených biometických komplexů mědi. Aktivity jednotlivých komplexů byly následně porovnány navzájem mezi sebou, ale také, bylo-li to možné, vůči enzymu tyrosináza. Pro veškeré reakce probíhající ve vodném prostředí byl jako substrát vybrán dopamin a pro reakce v nevodném prostředí 3,5-di-tert-butylkatechol.

Na základě elektrochemického měření úbytku kyslíku během oxidace dopaminu ve fosfátovém pufru katalyzované komplexy 1 a 2 lze říci, že jako katalyticky aktivnější se osvědčil komplex 1. Tento komplex se tak nejvíce připodobnil tyrosináze, a to i přesto, že v porovnání s její aktivitou katalyzoval přibližně třikrát pomaleji. Zároveň je důležité poznamenat, že tyrosináza byla schopna stanovené katecholázové aktivity dosáhnout v přibližně tisíckrát nižší koncentraci, než ve které byly komplexy. Katecholázová aktivita komplexu 3 byla pozorována v methanolu s 3,5-DTBC. Jak se ukázalo, tento komplex je schopen velmi rychle katalyzovat přeměnu 3,5-DTBC na 3,5-DTBQ, ale zde jej nebylo možné s ostatními porovnat, jelikož byl měřen za odlišných podmínek.

Poté byly katecholázové aktivity komplexů/tyrosinázy stanovovány pomocí spektrofotometrického zaznamenávání vzniklého oxidačního produktu. Zde byl navíc testován vliv kyslíku na rychlosti jednotlivých katalýz. Na základě měření s komplexy 1 a 2 s dopaminem ve fosfátovém pufru obsahující přirozené množství kyslíku, bylo zjištěno, že k polovičnímu nasycení komplexu 1 dochází při přibližně dvakrát nižší koncentraci dopaminu než v případě komplexu 2. Také je třeba podotknout, že v porovnání s komplexem 2, byl komplex 1 ve dvojnásobně nižší koncentraci, a i tak se aktivitou více blížil tyrosináze, která byla měřena také za stejných podmínek. V dalších experimentech byl roztok pufru syčen kyslíkem, který u komplexu 1 sice způsobil řádové snížení Michaelisovy konstanty, ale limitní rychlost zůstala stejná. Na komplex 2 měl kyslík opačný vliv. Hodnota Michaelisovy konstanty se nezměnila, zatímco limitní rychlost vzrostla více než dvakrát. Na činnost tyrosinázy neměl přidaný kyslík jakýkoli vliv, jelikož vykazovala stejnou aktivitu jako v prostředí neobohacovaném kyslíkem. Následně byla pozorovány katecholázová aktivita komplexu 1 a 3 s 3,5-DTBC v acetonitrilu jednak s přirozeným, ale také s přidaným kyslíkem. Za obou podmínek se zde jako katalyticky aktivnější projevil komplex 3. Zvýšený obsah kyslíku příliš nepůsobil na aktivitu komplexu 1, která byla prakticky totožná jako v nesyčeném prostředí. Naopak u komplexu 3 došlo vlivem větší koncentrace kyslíku k více jak dvojnásobnému urychlení katalýzy.



Závěrečné experimenty byly věnovány magnetickým částicím, na které byl zakotvován komplex 3. Morfologie částic s komplexem byla studována pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Ze snímků částic s navázaným komplexem, které byly již použity k měření, bylo zřejmé, že samotným částicím příliš nevyhovovalo zvolené reakční prostředí (bezvodý acetonitril), jelikož byly již znatelně degradované. Následně byl u částic se zakotveným komplexem stanoven obsah mědi metodou ICP-MS. Z naměřených koncentrací bylo zjištěno jednak množství komplexu, které bylo během imobilizace navázáno, ale také to, že postupně (při měření, uchovávání) docházelo k rozpadu vazby komplexu s částicemi. Příčinou nestability vazby mohlo být opět volené prostředí, ale rovněž i mechanické zacházení s částicemi. Stanovení katecholázové aktivity navázaného komplexu bylo provedeno pomocí spektrofotometrie. V rámci tohoto měření byla také zkoumána stabilita vazby částic s komplexem. Z výsledků měření se bohužel i zde potvrdilo, že vazba nebyla příliš odolná vůči podmínkám, ve kterých byla měření prováděna. Pro částice je sice ideální voda, ale ta zároveň degraduje komplex 3. Řešením by bylo přesunout celou reakci do vodného prostředí, a navrhnout celý systém tak, aby komplex vykazoval příslušnou aktivitu a zároveň ho bylo možné kovalentně zakotvit na magnetických částicích. Nabízí se také strukturální modifikace komplexu 1 v kombinaci s jiným typem částic. Zde je nutné také poznamenat, že experimenty provedené s kovalentně vázaným komplexem na magnetické částice patří mezi prvotní v této oblasti.

Stanovení katecholázové aktivity vybraných biomimetických komplexů mědi, které bylo náplní této diplomové práce, tvoří zároveň základ pro výzkum vedoucí k vývoji biomimetických senzorů. Myšlenka navázání komplexu na magnetické částice, tak navíc otevírá další možnosti pro realizace nových typů těchto senzorů.

## Použitá literatura

- [1] ILESANMI O. S., ADEWALE I. O., Physicochemical properties of free and immobilized tyrosinase from different species of yam (*Dioscorea spp*). *Biotechnology Reports*. **27**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00499>.
- [2] ROS J. R., RODRÍGUEZ-LÓPEZ J. N., ESPÍN J. C., VARÓN R., GARCÍA-CÁNOVAS F., Oxymetric and spectrophotometric study of the ascorbate oxidase activity shown by frog epidermis tyrosinase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **28**(8), 1996, 917-923.
- [3] NAWAZ A., SHAFI T., KHALIQ A., MUKHTAR H., HAQ I., Tyrosinase: Sources, structure and applications. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering*. **3**(5), 2017, 142-148.
- [4] FALGUERA V., GATIUS F., PAGÁN J., IBARZ A., Kinetic analysis of melanogenesis by means of *Agaricus bisporus* tyrosinase. *Food Research International*. **43**(4), 2010, 1174-1179.
- [5] HAŁDYS K., GOLDEMAN W., JEWGIŃSKI M., WOLIŃSKA E., ANGER N., ROS-SOWSKA J., LATAJKA R., Inhibitory properties of aromatic thiosemicarbazones on mushroom tyrosinase: Synthesis, kinetic studies, molecular docking and effectiveness in melanogenesis inhibition. *Bioorganic Chemistry*. **81**, 2018, 577-586.
- [6] LI J., FENG L., LIU L., WANG F., OUYANG L., ZHANG L., HU X., WANG G., Recent advances in the design and discovery of synthetic tyrosinase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **224**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113744>
- [7] KIM Y.-J., UYAMA H., Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **62**, 2005, 1707-1723.
- [8] STREFFER K., *Highly sensitive measurements of substrates and inhibitors on the basis of tyrosinase sensors and recycling system*. Postdam, 2002. Disertační práce. University of Potsdam.
- [9] ISMAYA W. T., ROZEBOOM H. J., WEIJN A., MES J. J., FUSETTI F., WICHERS H. J., DIJKSTRA B. W., Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: Identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry*. **50**(24), 2011, 5477-5486.

- [10] ZAIDI K. U., Ali A. S., Ali. S. A., NAAZ I., Microbial tyrosinases: Promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry. *Biochemistry Research International*. **2014**, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/854687>
- [11] KIM D., PARK J., KIM J., HAN C., YOON J., KIM N., LEE C., Flavonoids as mushroom tyrosinase inhibitors: A Fluorescence quenching study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**(3), 2006, 935-941.
- [12] GAŚOWSKA B., FRĄCKOWIAK B., WOJTASEK H., Indirect oxidation of amino acid phenylhydrazides by mushroom tyrosinase. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1760**(9), 2006, 1373-1379.
- [13] RESCIGNO A., SOLLAI F., PISU B., RINALDI A., SANJUST E., Tyrosinase inhibition: General and applied aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. **17**(4), 2002, 207-218.
- [14] MESSERSCHMIDT A., Copper metalloenzymes. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*. Edited by Liu H.-W., Mander L., Elsevier Science, Oxford, 2010. ISBN 978-0-08-045382-8.
- [15] CHAI W.-M., YU Z.-Y., LIN M.-Z., WEI Q.-M., SONG S., 5-Methoxy-2-mercaptobenzimidazole as an efficient inhibitor on tyrosinase: Inhibitory activity and mechanism. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **131**(4), 2021, 356-363.
- [16] CHEN Q.-X., KUBO I., Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**(14), 2002, 4108-4112.
- [17] VALIPOUR E., ARIKAN B., Increased production of tyrosinase from *Bacillus megaterium* strain M36 by the response surface method. *Archives of Biological Sciences*. **68**(3), 2016, 659-668.
- [18] ARORA P. K., KUMAR M., CHAUHAN A., RAGHAVA G. P. S., JAIN R. K., OxDBase: A database of oxygenases involved in biodegradation. *BMC Research Notes*. **2**, 2009. DOI: 10.1186/1756-0500-2-67
- [19] HAYAISHI O., Oxygenases. *Encyclopedia of Biological Chemistry*. 2., Edited by Lennarz W. J., Lane M. D., Academic Press, San Diego, 2013. ISBN 978-0-12-378631-9.

- [20] YAMAZAKI S.-I., ITOH S., Kinetic evaluation of phenolase activity of tyrosinase using simplified catalytic reaction system. *Journal of the American Chemical Society*. **125**(43), 2003, 13034-13035.
- [21] OGURTSOV V. I., HYNES J., WILL Y., PAPKOVSKY D. B., Data analysis algorithm for high throughput enzymatic oxygen consumption assays based on quenched-fluorescence detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. **129**(2), 2008, 581-590.
- [22] TOKO K., *Biomimetic Sensor Technology*. 1. Cambridge University Press, Cambridge, 2000. ISBN 9781139425544.
- [23] SAWYERA D. T., Electrochemistry. *Encyclopedia of Physical Science and Technology*. 3., Edited by Meyers R. A., Academic Press, San Diego, 2000. ISBN 978-0-12-227410-7.
- [24] GNAIGER E., Polarographic oxygen sensors, the oxygraph, and high-resolution respirometry to assess mitochondrial function. *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction*. Edited by Dykens J., Will Y., John Wiley & Sons, Hoboken, 2008. ISBN 978-0-470-37252-4.
- [25] GNAIGER E., *Mitochondrial pathways and respiratory control: An introduction to OX-PHOS analysis*. 4., Steiger Druck GmbH, Axams, 2014. ISBN 978-3-9502399-8-0.
- [26] DI RUSSO N. V., BRUNER S. D., ROITBERG A. E., Applicability of fluorescence-based sensors to the determination of kinetic parameters for O<sub>2</sub> in oxygenases. *Analytical Biochemistry*. **475**, 2015, 53-55. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.01.009>
- [27] DIEPART C., VERRAX J., BUC CALDERON P., FERON O., JORDAN B. F., GALLET B., Comparison of methods for measuring oxygen consumption in tumor cells in vitro. *Analytical Biochemistry*. **396**(2), 2010, 250-256.
- [28] NAGAR S., ARGIKAR U. A., TWEEDIE D. J., *Enzyme kinetics in drug metabolism: Fundamentals and applications*. Humana Press, New York, 2014. ISBN 978-1-62703-757-0.
- [29] JOHNSON K. A., GOODY R. S., The original Michaelis constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten paper. *Biochemistry*. **50**(39), 2011, 8264-8269.
- [30] NISHIORI D., WADSWORTH B. L., MOORE G. F., Parallels between enzyme catalysis, electrocatalysis, and photoelectrosynthesis. *Chem Catalysis*. **1**(5), 2021, 978-996.
- [31] DORAN P. M., Homogeneous reactions. *Bioprocess Engineering Principles*. 2., Academic Press, San Diego, 2013. ISBN 978-0-12-220851-5.

- [32] OCHS R. S., Understanding enzyme inhibition. *Journal of Chemical Education*. **77**(11), 2000, 1453-1456.
- [33] HOCHACHKA P. W., LEWIS J. K., Interacting effects of pH and temperature on the  $K_m$  values for fish tissue lactate dehydrogenases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. **39**(4), 1971, 925-933.
- [34] CHO Y.-S., LIM H.-S., Comparison of various estimation methods for the parameters of Michaelis-Menten equation based on in vitro elimination kinetic simulation data. *Translational and Clinical Pharmacology*. **26**(1), 2018, 39-47.
- [35] MIYANAGA K., UNNO H., Reaction kinetics and stoichiometry. *Comprehensive Biotechnology*. Edited by Moo-Young M., 2., Elsevier Science, Oxford, 2011. ISBN 978-0-08-088504-9.
- [36] MARASOVIĆ M., MARASOVIĆ T., MILOŠ M., Robust nonlinear regression in enzyme kinetic parameters estimation. *Journal of Chemistry*. **2017**, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/6560983>
- [37] KUAH E., TOH S., YEE J., MA Q., GAO Z., Enzyme mimics: Advances and applications. *Chemistry - A European Journal*. **22**(25), 2016, 8404-8430.
- [38] WANG T., FAN X., HOU C., LIU J., Design of artificial enzymes by supramolecular strategies. *Current Opinion in Structural Biology*. **51**, 2018, 19-27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.02.003>
- [39] DEY S. K., MUKHERJEE A., Catechol oxidase and phenoxazinone synthase: Biomimetic functional models and mechanistic studies. *Coordination Chemistry Reviews*. **310**, 2016, 80-115. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.11.002>
- [40] DEUSS P. J., DEN HEETEN R., LAAN W., KAMER P. C. J., Bioinspired catalyst design and artificial metalloenzymes. *Chemistry - A European Journal*. **17**(17), 2011, 4680-4698.
- [41] KREBS B., MERKEL M., ROMPEL A., Catechol oxidase and biomimetic approaches. *The Journal of the Argentine Chemical Society*. **92**(1), 2004, 1-15.
- [42] SOTOMAYOR M. D. P. T., TANAKA A. A., KUBOTA L. T., Tris (2,2'-bipyridil) copper (II) chloride complex: a biomimetic tyrosinase catalyst in the amperometric sensor construction. *Electrochimica Acta*. **48**(7), 2003, 855-865.

- [43] PALAVICINI S., Biomimetic copper complexes. *Scientifica Acta*. **1**(1),2007, 9-12.
- [44] RAMADAN A. E.-M. M., Ibrahim M. M., Shaban S. Y., Synthesis, characterization, and tyrosinase biomimetic catalytic activity of copper(II) complexes with schiff base ligands derived from  $\alpha$ -diketones with 2-methyl-3-amino-(3H)-quinazolin-4-one. *Journal of Molecular Structure*. **1006**(1-3), 2011, 348-355.
- [45] CASELLA L., GULLOTTI M., RADAELLI R., DI GENNARO P., A tyrosinase model system. Phenol *ortho*-hydroxylation by a binuclear three-coordinate copper(I) complex and dioxygen. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. (22), 1991, 1611-1612. DOI: <https://doi.org/10.1039/C39910001611>
- [46] ROLFF M., SCHOTTENHEIM J., DECKER H., TUCZEK F., Copper–O<sub>2</sub> reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: Molecular mechanism and comparison with the enzyme. *Chemical Society Reviews*. **40**(7), 2011, 4077-4098.
- [47] CASELLA L., Monzani E., Gullotti M., Cavagnino D., Cerina G., Santagostini L., Ugo R., Functional modeling of tyrosinase. Mechanism of phenol *ortho*-hydroxylation by dinuclear copper complexes. *Inorganic Chemistry*. **35**(26), 1996, 7516-7525.
- [48] OISHI N., NISHIDA Y., IDA K., KIDA S., Reaction between various copper(II) complexes and ascorbic acid or 3,5-di-*t*-butylcatechol. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. **53**(10), 1980, 2847-2850.
- [49] MALACHOWSKI M. R., DAVIDSON M. G.M., Novel mono- and binuclear Cu(II) complexes: Synthesis, characterization and catecholase activity. *Inorganica Chimica Acta*. **162**(2), 1989, 199-204.
- [50] OISHI N., TAKEUCHI M., NISHIDA Y., KIDA S., Catalytic activity of binuclear planar copper(II) complexes for the decomposition of hydrogen peroxide. *Polyhedron*. **3**(2), 1984, 157-160.
- [51] MUKHERJEE J., MUKHERJEE R., Catecholase activity of dinuclear copper(II) complexes with variable endogenous and exogenous bridge. *Inorganica Chimica Acta*. **337**, 2002, 429-438. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(02\)01106-4](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(02)01106-4)

- [52] NEVES A., ROSSI L. M., BORTOLUZZI A. J., SZPOGANICZ B., WIEZBICKI C., SCHWINGEL E., HAASE W., OSTROVSKY S., Catecholase activity of a series of dicopper(II) complexes with variable Cu–OH(phenol) moieties. *Inorganic Chemistry*. **41**(7), 2002, 1788-1794.
- [53] BANU K. S., MUKHERJEE M., GUHA A., BHATTACHARJEE S., ZANGRANDO E., DAS D., Dinuclear copper(II) complexes: Solvent dependent catecholase activity. *Polyhedron*. **45**(1), 2012, 245-254.
- [54] SÝS M., MUKHERJEE A., JASHARI G., ADAM V., ASHRAFI A. M., NOVÁK M., RICHTERA L., Bis(2,2'-bipyridil)copper(II) chloride complex: Tyrosinase biomimetic catalyst or redox mediator?. *Materials*. **14**(1), 2020, 1-17.
- [55] MOSCHOVITIS K., BANTI C. N., KOURKOU MELIS N., MOUSHI E. E., LAZARIDES T., HADJIKAKOU S. K., Fluorescence of copper(I) and mixed valence copper(I/II) complexes with dipicolinic acid and their catalytic activity on catechol oxidation. *Inorganica Chimica Acta*. **500**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ica.2019.119209>
- [56] KLIKAROVÁ J., NOVÁK M., KOCÁBOVÁ J., MIKYSEK T., BÁRTOVÁ M., SOKOLOVÁ R., SÝS M., Effect of electron-donating methoxy group and type of counterions on catecholase activity of mononuclear copper(II) complexes towards neurotransmitters. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, submitted.
- [57] SÝS M., SOKOLOVÁ R., KOCÁBOVÁ J., KLIKAROVÁ J., NOVÁK M., KOLIVOŠKA V., OBLUKOVÁ M., MIKYSEK T., Comparison of mononuclear and dinuclear copper(II) biomimetic complexes: Spectroelectrochemical mechanistic study of their catalytic pathways. *Dalton Transactions*, submitted.
- [58] MOORE K., VIGEE G. S., The synthesis of binuclear copper(II) complexes and the study of their catecholase activity. *Inorganica Chimica Acta*. **66**, 1982, 125-130. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)85801-6](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)85801-6)
- [59] SHEORAN M., BHAR K., JAIN S., RANA M., KHAN T. A., SHARMA A. K., Phenoxo-bridged dicopper complexes: Syntheses, characterizations, crystal structures and catecholase activity. *Polyhedron*. **161**, 2019, 169-178. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.poly.2019.01.008>
- [60] SÝS M., OBLUKOVÁ M., KOLIVOŠKA V., SOKOLOVÁ R., KORECKÁ L., MIKYSEK T., Catalytic properties of variously immobilized mushroom tyrosinase: A kinetic study

for future development of biomimetic amperometric biosensors. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **864**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114066>

[61] NEVES A., ROSSI L. M., BORTOLUZZI A. J., MANGRICH A. S., HAASE W., WERNER R., Synthesis, structure, physicochemical properties and catecholase-like activity of a new dicopper(II) complex. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **12**(6), 2001, 747-754.

[62] YOKOYAMA K., KAYANUMA Y., Cyclic voltammetric simulation for electrochemically mediated enzyme reaction and determination of enzyme kinetic constants. *Analytical Chemistry*. **70**(16), 1998, 3368-3376.

[63] RASSAEI L., CUI J., GOLUCH E. D., LEMAY S. G., Substrate-dependent kinetics in tyrosinase-based biosensing: Amperometry vs. spectrophotometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **403**(6), 2012, 1577-1584.

[64] MOBIN S. M., SANGHAVI B. J., SRIVASTAVA A. K., MATHUR P., LAHIRI G. K., Biomimetic sensor for certain phenols employing a copper(II) complex. *Analytical Chemistry*. **82**(14), 2010, 5983-5992.

[65] SANGHAVI B. J., MOBIN S. M., MATHUR P., LAHIRI G. K., SRIVASTAVA A. K., Biomimetic sensor for certain catecholamines employing copper(II) complex and silver nanoparticle modified glassy carbon paste electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. **39**(1), 2013, 124-132.