

Obsah práce je zaměřen na sledování vlivu pyridoxaisoniakotinoylhydrazonu na alaninaminotransferasu (EC 2. 6. 1. 2.).

Alaninaminotransferasa patří do skupiny pyridoxalových enzymů. Jak plyne z názvu, koenzymem tohoto enzymu je pyridoxalfosfát.

PIH je nestabilní in vitro a in vivo, v jeho vzorci lze rozpoznat část odpovídající pyridoxalu a isoniazidu. PIH je studován pro svou schopnost chelátovat železo. Byly také zkoumány jeho kardioprotektivní účinky využitelné při terapii kardiotoxickými antracykliny.

Z podobnosti PIH s pyridoxalfosfátem pramení představa, že by PIH mohl ovlivňovat spektrální vlastnosti pyridoxalových enzymů vazbou na aktivní místo enzymu nebo i mimo něj. Jako modelový pyridoxalový enzym vhodný pro spektrální studie byla zvolena alaninaminotransferasa. Transaminasy výrazně mění spektrum v průběhu katalyzované reakce ve srovnání s dekarboxylasou aromatických aminokyselin, která byla využívána pro předchozí pokusy s PIH (Vančurová 2006, diplomová práce). Častěji v praxi využívaná transaminasa aspartátaminotransferasa nebyla pro tyto pokusy vhodná, protože absorbuje v oblasti absorpce PIHu. Proto byla s výhodou použita ALT, jejíž pyridoxalová forma absorbuje odděleně od ostatních píků.

Byla měřena UV-VIS spektra a spektra cirkulárního dichroismu. Signály cirkulárního dichroismu poskytují pouze látky opticky aktivní. V našem případě došlo při měření CD spekter výhodně k eliminaci spektra samostatného PIHu, který není opticky aktivní.

Potvrdili jsme hlavní absorpční maxima pyridoxalové (430 nm) a pyridoxaminové (325 nm) formy ALT. Tím jsme si ověřili funkčnost vlastního enzymu, když v přítomnosti substrátu alaninu zanikl pík pyridoxalové formy a objevil se pík pyridoxaminové formy.

Zjistili jsme, že předdialýza enzymu nemá vliv na jeho spektrální vlastnosti.

Jak již bylo zmíněno výše, PIH je nestabilní. Provedli jsme pokus k ověření stability PIHu pomocí měření absorpčních spekter. Změřené spektrum PIH odpovídá údajům z literatury. Samotný PIH vykazuje maxima absorpce při 300 a 380 nm. Dochází k postupnému rozkladu PIH na směs pyridoxalu a isoniazidu.

Sledovali jsme vliv PIHu na spektra ALT. Využili jsme zejména spekter cirkulárního dichroismu, kde samotný PIH nedává signál. Zjistili jsme, že PIH nemá vliv na transaminační reakci, což je příznivé s ohledem na jeho potenciální využití v terapii.