

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**VPLYV SYNTETICKÝCH CHELÁTOROV ZO SKUPINY
4-ACYLPYRAZOL-5-ÓNU NA ALKOHOLDEHYDROGENÁZU**

Diplomová práce

Vedúci diplomovej práce: prof. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Marcel Hrubša

Hradec Králové 2021

Zuzana Sobolová

Prehlásenie

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného či rovnakého titulu.

Dátum:

.....

podpis

Pod'akovanie

Týmto by som sa chcela poďakovať vedúcemu mojej diplomovej práce, prof. PharmDr. Přemyslovi Mladěnkovi, Ph.D., za odborné vedenie, cenné rady a pripomienky. Ďakujem aj Mgr. Marcelovi Hrubšovi, za pomoc a spoluprácu v laboratóriu aj mimo neho. V neposlednom rade ďakujem aj mojej rodine a priateľom za trpezlivosť a rady pri písaní tejto práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študentka: Zuzana Sobolová

Školiteľ: prof. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Marcel Hrubša

Názov diplomovej práce: Vplyv syntetických chelátorov zo skupiny 4-acylpyrazol-5-ónu na alkoholdehydrogenázu

Inhibítory alkoholdehydrogenázy majú kľúčové postavenie v terapii otráv metanolom, etanolom či etylénglykolom a ich toxickými metabolitmi, a preto ich môžeme považovať za život zachraňujúce. V klinickej praxi sa používa jediná látka, fomepizol. Táto práca sa venuje skúmaniu vplyvu jedenástich experimentálnych chelátorov zo skupiny 4-acylpyrazol-5-ónu na konskú a kvasinkovú alkoholdehydrogenázu, a prípadnému vymedzeniu štruktúrnych rysov, ktoré by boli najvyhovujúcejšie pre interakciu s týmto enzýmom. Na základe schopnosti týchto látok chelatovať zinočnaté ióny sa predpokladá, že by mohli inhibovať enzým, ktorý má vo svojej štruktúre práve molekulu zinku. Princípom samotného merania je zvýšenie absorpcie pri enzymatickej aktivite dané tvorbou NADH. Toto meranie je relatívne jednoduché a efektívne, a pri využití pre stanovenie kinetiky tiež menej náchylné na ovplyvnenie absorpciou testovaných látok. Výsledky meraní preukázali, že 6 testovaných látok (HQ^{ph} , HQ^{phptBu} , HQ^{hpNO_2} , HQ^{thi} , HQ^{etCP} a HQ^{naph}) inhibovalo kvasinkový enzým pri koncentrácii 200 μM účinnejšie než fomepizol. Konský enzým inhibovali pri koncentrácii 500 μM látky HQ^{phptBu} , HQ^{phpNO_2} , HQ^{thi} , a HQ^{naph} , avšak ani jedna nebola účinnejšia než fomepizol. Výsledky následnej korelačnej analýzy preukázali, že miera inhibície ADH a miera chelatacie Zn^{2+} iónov nesúvisia. Testované látky sa teda nejavia ako vhodné inhibítory ADH z dôvodu vysokých koncentrácií nutných k ich účinku, ale nedá sa vylúčiť, že modifikáciou týchto molekúl by bolo možné pripraviť aktívnejšie inhibítory.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Zuzana Sobolová

Supervisor: Prof. Přemysl Mladěnka, Pharm.D., Ph.D.

Consultant: Marcel Hrubša, MS.c.

Title of diploma thesis: The impact of synthetic chelators from the group of 4-acylpyrazole-5-ones on alcohol dehydrogenase

Inhibitors of alcohol dehydrogenase play a key role in the treatment of poisoning caused by methanol, ethanol, ethylene glycol, and their toxic metabolites. Such treatment can therefore be considered as life-saving. In clinical practice, a single substance, fomepizole, is used. This thesis is aimed at investigation of the effect of eleven experimental chelators from the 4-acylpyrazol-5-ones group on equine and yeast alcohol dehydrogenases, and the possible definition of structural features that would be the most suitable for interaction with this enzyme. Due to the ability of these substances to chelate zinc ions, it is believed that they could inhibit an enzyme that has a zinc molecule in the structure. The measurement itself is based on principle of increase in absorbance during the enzymatic reaction, which is caused by the formation of NADH. This measurement is relatively simple, efficient and, due to used kinetic method, also less susceptible to be affected by absorbance of the tested substances. Measurement showed that six tested substances (HQ^{ph} , HQ^{phptBu} , HQ^{phpNO_2} , HQ^{thi} , HQ^{etCP} and HQ^{naph}) inhibited the yeast enzyme at a concentration of 200 μM more effectively than fomepizole. Equine enzyme was inhibited at 500 μM by HQ^{phptBu} , HQ^{phpNO_2} , HQ^{thi} , and HQ^{naph} , but none of them was more effective than fomepizole. The results of the subsequent correlation analysis showed that inhibition rate of ADH and chelation rate of Zn^{2+} ions are not related. Thus, the tested substances do not appear to be appropriate inhibitors of ADH due to high concentrations required for their effect, but it cannot be ruled out that more active inhibitors could be prepared by modifying these molecules.

Obsah

1	ZOZNAM SKRATIEK	8
2	ÚVOD.....	10
3	TEORETICKÁ ČASŤ	11
3.1	Alkoholdehydrogenáza	11
3.1.1	Význam a funkcia	12
3.1.2	Štruktúra.....	16
3.1.3	Medzidruhové rozdiely	21
3.1.4	Známe a používané inhibítory	24
3.2	4-acylpyrazol-5-óny a analogické látky.....	29
3.2.1	Štruktúra.....	29
4	CIEĽ PRÁCE	32
5	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	33
5.1	Chemikálie	33
5.2	Enzýmy	33
5.3	Testované látky	33
5.4	Prístroje a spotrebný materiál.....	36
5.4.1	Prístroje a programy.....	36
5.4.2	Spotrebný materiál.....	36
5.5	Príprava roztokov pre testovanie inhibície kvasinkového enzýmu.....	36
5.5.1	Príprava zásobných roztokov.....	36
5.5.2	Príprava pracovných roztokov	37
5.6	Príprava roztokov pre testovanie inhibície konského enzýmu.....	38
5.6.1	Príprava zásobných roztokov	38
5.6.2	Príprava pracovných roztokov	38
5.7	Metódy testovania	38
5.7.1	Testovanie inhibície aktivity kvasinkovej a konskej ADH	39
5.7.2	Metóda číslo 1- Príprava mikrotitračnej doštičky.....	40
5.7.3	Metóda číslo 2- Príprava mikroskúmaviek.....	41
5.7.4	Zmeranie absorbancie	42
5.7.5	Korelácia chelatácie Zn^{2+} a inhibičnej aktivity testovaných látok.....	42
5.8	Matematická a štatistická analýza	44
5.8.1	Výpočet miery inhibície ADH.....	44

5.8.2	Štatistická analýza	45
6	VÝSLEDKY	47
6.1	Výsledky testovania inhibície enzymatickej aktivity kvasinkového enzýmu ..	47
6.2	Výsledky testovania inhibície enzymatickej aktivity konského enzýmu	52
6.3	Výsledky korelácie miery inhibície ADH a chelatácie Zn^{2+} u testovaných látok 56	
7	DISKUSIA.....	58
8	ZÁVER	62
9	ZDROJE.....	63

1 ZOZNAM SKRATIEK

ABAD	„amyloid bounding alcoholdehydrogenase“- alkoholdehydrogenáza viažúca amyloid
ADH	alkoholdehydrogenáza
ADH _y	kvasinková alkoholdehydrogenáza
ADH _{eq}	konská alkoholdehydrogenáza
ASA	„acetylsalicylic acid“ - kyselina acetylsalicylová
β- NAD ⁺	beta nikotínamid adenín dinukleotid
NADP ⁺	nikotínamid adenín dinukleotidfosfát
BSA	„bovine serum albumin“- hovädzí sérový albumín
DMSO	dimetylsulfoxid
FAD	flavín adenín dinukleotid
H ₃ PO ₄	kyselina fosforečná
HCl	kyselina chlorovodíková
HQ ^{bn}	1-fenyl-4-(2-fenylacetyl)-3-metyl-1H-pyrazol-5(4H)-ón
HQ ^{etCP}	4-(3-cyklopentylpropanoyl)-1-fenyl-3-metyl-1H-pyrazol-5(4H)- ón
HQ ^{ph}	4-benzyol-1-fenyl-3-metyl-1H-pyrazol-5(4H)-ón
HQ ^{phpNO₂}	1-fenyl-3-metyl-4-(4-nitrobenzoyl)-1H-pyrazol-5(4H)-ón
HQ ^{phpOMe}	1-fenyl-4-(4-metoxybenzoyl)-3-metyl-1H-pyrazol-5(4H)-ón
HQ ^{phptBu}	1-fenyl-4-(4-terc-butylbenzoyl)-3-metyl-1H-pyrazol-5(4H)-ón

HQ ^{naph}	1-fenyl-3-metyl-4-(1-naftoyl)-1H-pyrazol-5(4H)-ón
HQ ^{thi}	1-fenyl-3-metyl-4-(tiofén-2-karbonyl)-1H-pyrazol-5(4H)-ón
H2PyQ	pyridín-2,6-diylbis(1-fenyl-5-hydroxy-3-metyl-1H-pyrazol-4-yl)metánón
H2Q3Q	1,5-bis (1-fenyl-3-metyl-5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)pentán-1,5-dión
H2Q4Q	1,6-bis (1-fenyl-3-metyl-5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)hexán-1,6-dión
MDR	medium chain dehydrogenase/reductase superfamily
M _w	molárna hmotnosť
Na ₄ P ₂ O ₇ ·10H ₂ O	dekahydrát fosforečnanu sodného
NaH ₂ PO ₄	dihydrogénfosforečnan sodný
Na ₂ HPO ₄	hydrogénfosforečnan disodný
PQQ	pyrochinolín chinón
TRIS	tris(hydroxymetyl)aminometán

2 ÚVOD

Alkoholdehydrogenázy sú veľmi rozsiahlou skupinou enzýmov. V ľudskom tele sú zodpovedné za metabolizmus alkoholov na príslušné aldehydy či ketóny. Existuje celá škála ich exogénnych i endogénnych substrátov, ktorých metabolity prispievajú k fyziologickému fungovaniu organizmu. Na druhej strane sú alkoholdehydrogenázy zodpovedné aj za tvorbu toxických metabolitov, ktoré môžu navodiť až život ohrozujúce stavy. Vtedy je potrebné nasadiť do liečby inhibítor alkoholdehydrogenázy. Jeho funkcia je predísť tvorbe toxických metabolitov a zabrániť kritickému stavu. V súčasnosti sa k terapii týchto intoxikácií používa fomepizol, kompetitívny inhibítor alkoholdehydrogenázy.

Hoci sa môže zdať, že v 21. storočí už otravy toxickými alkoholmi nie sú aktuálnym problémom, opak je pravdou. Podľa aktuálnych dát sa rapídne zvýšil počet intoxikácií dezinfekciami, ktoré sú na báze toxických alkoholov (hlavne etanol a propanol). Tento nárast môžeme pravdepodobne pripísať práve prebiehajúcej celosvetovej pandémie. Podľa amerického National Poison Data System bolo v roku 2020 len v USA zaznamenaných viac ako 24 800 prípadov intoxikácie alkoholmi z dezinfekcií u detí mladších ako 12 rokov (National Poison Data System, AAPCC, 2020). Aj tieto dáta prispievajú k faktu, že nové účinné inhibítory alkoholdehydrogenázy by boli veľkým prínosom pre novodobú terapiu otráv alkoholmi a ich potreba je stále aktuálna.

3 TEORETICKÁ ČASŤ

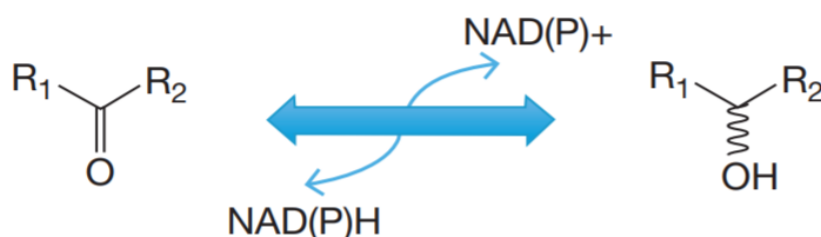
3.1 Alkoholdehydrogenáza

Alkoholdehydrogenázy – ADH sú skupinou enzýmov, ktoré sú prítomné u vyšších rastlín, húb, kvasiniek i cicavcov. Tieto enzýmy patria do skupiny oxidoreduktáz, ktoré pri katalýze využívajú rôzne akceptory elektrónov. Na základe toho ich rozdeľujeme na 3 skupiny (MacKintosh a Fewson 1987):

1. NAD(P)⁺- nikotínamid adenín dinukleotid (fosfát) - dependentné ADH,
2. dehydrogenázy využívajúce ako kofaktor PQQ- pyrochinolín chinón,
3. FAD- flavín adenín dinukleotid - dependentné irreverzibilné alkoholoxidázy

Obvykle obsahujú vo svojej molekule atóm zinku a vyskytujú sa vo forme dimérov či tetramérov. Monomér má zvyčajne molekulovú hmotnosť asi 40 kDa (Torres a Ayala 2013).

Prvá skupina, NAD(P)-dependentné alkoholdehydrogenázy, sú najlepšie popísanou skupinou, a zároveň do tejto skupiny patria aj nami sledované ADH. Ich funkciou je za prítomnosti elektrónových akceptorov, nikotínamidových kofaktorov, katalyzovať redukciu primárnych a sekundárnych alkoholov a ketónov. V neposlednom rade ich funkcia zahŕňa aj spätnú reakciu, pri ktorej vzniká ako produkt ketón a regenerovaný kofaktor, pozri **Obr. 1** (Torres a Ayala 2013).



Obr. 1 Všeobecná schéma reakcie, ktorá je katalyzovaná alkoholdehydrogenázou, alkohol/karboxylová kyselina je oxidovaná na ketón za vzniku redukovaného NAD(P)H a zároveň enzým katalyzuje aj spätnú reakciu, kedy ketón/ aldehyd je redukovaný na alkohol za vzniku oxidovaného kofaktoru.

$R_1, R_2 =$ uhl'ovodíkový zvyšok alebo H

Prevzaté z: Torres a Ayala, 2013

3.1.1 Význam a funkcia

Premena ketónov, aldehydov a alkoholov na iné zlúčeniny je esenciálna pre fungovanie eukaryotických aj prokaryotických organizmov (MacKintosh a Fewson 1987). Redukčné a oxidačné reakcie sú významné hlavne vďaka ich produktom. Či už alkoholy, pri fermentácií u anaeróbných baktérií, alebo oxidovaný kofaktor, napr. NAD^+ , ktorý je esenciálny pre fungovanie a metabolizmus buniek. Niektoré z týchto procesov sú taktiež využiteľné aj v priemysle, pri výrobe alkoholov, či rôznych rozpúšťadiel. Na druhej strane, oxidačná reakcia alkoholov je kľúčová v centrálnom metabolizme. Výsledným produktom je energia a uhlík (Reid a Fewson 1994).

Medzi mnohé z funkcií oxidoreduktáz alkoholov patrí napríklad aj produkcia kyseliny octovej u rodu *Acetobacter* spp., oxidácia aromatických alkoholov u rodu *Pseudomonas* či *Acinetobacter*. Ďalším špecifickým zástupcom je veratryl alkoholoxidáza, ktorá produkuje formaldehyd a vedľajší produkt peroxid vodíka, neskôr v metabolizme využitý na degradáciu lignínu (Reid a Fewson 1994).

ADH cicavcov je dnes už veľmi dobre definovaný systém enzýmov, v ktorom rozoznávame 6 rôznych tried. U primátov je to o jednu triedu menej, no pre obe skupiny platí, že trieda I sa ešte delí na 3 rôzne podskupiny izoenzýmov (Höög a Östberg 2011).

U ľudí sa najviac ADH vyskytuje v pečeni, ďalej v gastrointestinálnom trakte, obličkách, nosnej sliznici, semenníkoch a v maternici (Cederbaum 2012). Existuje 7 rôznych génov, kódujúcich sedem typov MDR (medium chain alcohol dehydrogenase superfamily) ADH v ľudskom organizme; ADH1A, ADH1B, ADH1C, ADH4, ADH5, ADH6 a ADH7. Všetky sa vyskytujú na chromozóme 4. Na základe podobností v sekvenciách aminokyselín a vo farmakokinetických parametroch sú tieto enzýmy rozdelené na jednotlivé triedy, pozri **Tab. 1** (Edenberg 2007, Edenberg a Bosron 2018).

Tab. 1 Rozdelenie ľudských ADH podľa tried, charakteristika génov, lokalizácie, funkcie a príslušných proteínov

Trieda	Oficiálny názov génu	Proteín	Lokalizácia	Funkcia (primárne)
I	ADH1A	α	pečeň	oxidácia etanolu
I	ADH1B	β	pečeň	oxidácia etanolu
I	ADH1C	γ	pečeň	oxidácia etanolu
II	ADH4	π	pečeň, obličky, pľúca	oxidácia etanolu, metabolizmus nor/epinefrínu
III	ADH5	χ	takmer všetky tkanivá	metabolizmus alkoholov s dlhým postranným reťazcom, lipidov a mastných kyselín, formaldehydu
V	ADH6	ADH6	pečeň, žalúdok, duodenum	veľmi málo informácií
IV	ADH7	σ	žalúdok, pažerák, ostatné sliznice	first-pass metabolizmus etanolu, premena retinolu na retinal

Všetky tieto enzýmy sú NAD(P)⁺-dependentné

Prevzaté a upravené podľa: Edenberg 2007, Cederbaum 2012, Crabb et al. 2004

Pečeňová ADH je majoritne zastúpená formou ADH I. Hlavnou funkciou pečeňovej ADH cicavcov je metabolizmus alkoholov, tj. etanolu, exogénnych xenobiotík, endogénnych alkoholov, atď. Po absorpcii zo žalúdka, putuje nezmetabolizovaný etanol portálnou žilou do pečene, kde je niekoľkonásobne vyššia koncentrácia alkoholu ako v periférnej krvi. V pečeni sa metabolizuje asi 90% alkoholu na jeho primárny produkt acetaldehyd, ktorý sa podieľa na jeho toxicite (Jiang et al. 2020). Okrem hlavného enzýmu, ADH, zabezpečuje minoritne túto premenu aj cytochróm P450 2E1 a kataláza. Metabolizmus etanolu ďalej dokončuje enzým aldehyddehydrogenáza (hlavne mikrozomálna forma 2), produkujúca netoxický acetát (Crabb et al. 2004).

Enzýmy triedy I majú síce primárnu štruktúru proteínu zhodnú na asi 93%, avšak zhoda v štruktúre miesta viažuceho substrát medzi jednotlivými podskupinami je asi iba 60%. Podskupiny (A/B/C) obsahujú príslušné proteíny α , β , γ , kódované tromi rozdielnymi génmi. Tieto proteíny môžu v rámci triedy ADH I tvoriť homodimérne, ale aj heterodimérne komplexy (Edenberg 2007, Edenberg a Bosron 2018).

Ostatné izoformy ADH u človeka neplnia iba detoxikačnú funkciu, premieňať etanol na acetaldehyd. Vďaka širokej substrátovej špecifickosti dokážu premieňať aj iné, zložitejšie alkoholy. Hrajú významnú úlohu napríklad v metabolizme NO, vitamínu A, dopamínu, serotonínu, steroidov, žlčových, či ω -mastných kyselín a lipidov. Z hľadiska významu je ADH skupina enzýmov vnímaná ako komplexný systém, ktorý plní kľúčovú rolu v metabolizme a aj v ochrane bunky pred škodlivými látkami (Brändén et al. 1975, Höög et al. 2001).

ADH II vykazuje vysokú afinitu k etanolu, okrem toho plní zásadnú funkciu v metabolizme epinefrínu a norepinefrínu v periférnom krvnom riečisku (Jelski 2008). ADH III enzým je špecifický pre alkoholy s dlhým postranným reťazcom, ktoré sú intermediátmi lipidového metabolizmu. Štruktúrne je zhodný ako glutatión-dependentná formaldehyd dehydrogenáza, významná hlavne kvôli odbúravaní toxického formaldehydu z bunky (Höög et al. 2001). Zaujímavosťou je, že ADH III nie je takmer vôbec účinná pri metabolizme etanolu v nízkych koncentráciách. Jej schopnosť premieňať etanol vo vysokých koncentráciách sa uplatňuje hlavne pri first-pass metabolizme v žalúdočnej sliznici (Haseba a Ohno, 2010). Nachádza sa takmer vo všetkých tkanivách ľudského tela.

ADH IV je forma izoenzýmu, ktorej primárnou lokalizáciou sú sliznice. Majoritne sa nachádza v žalúdku, v nižšom zastúpení aj na iných slizniciach ako nosohltan, vagína a pažerák (Crabb et al. 2004). Zabezpečuje first-pass metabolizmus, teda trávenie časti alkoholu ešte pred absorpciou do krvného obehu (Jelski 2008). Funkcia, presná štruktúra a význam formy ADH V stále nie je známa, nakoľko sa ešte nepodarilo izolovať samostatný proteín (Östberg et al. 2016).

Rozvíjajúce sa vedecké poznatky odhaľujú stále nové informácie o tom, že skupina alkoholdehydrogenáz sa podieľa na regulácii mnohých procesov ľudského organizmu, či už fyziologických alebo patologických. Zaujímavým príkladom je mitochondriálny enzým ABAD - amyloid bounding alcoholdehydrogenase. Fyziologicky sa podieľa na udržovaní rovnováhy estriolu a estrónu v neurónoch mozgu. Je to špecifická NAD^+ -dependentná oxidoreduktáza, ktorú medzi I-V ADH triedy nezaraďujeme. Patrí do „short chain alcohol dehydrogenase“ superrodiny, teda rodiny ADH s krátkym reťazcom. Neobsahuje vo svojej molekule zinok a prirodzene sa vyskytuje vo forme homotetraméru (Benek et al. 2012). Nedávne výskumy naznačujú, že prispieva k rozvoju Alzheimerovej

choroby. Inhibítory tohto enzýmu by mohli byť sľubnými liečivami v boji proti tejto chorobe (Morsy 2019).

ADH I sa taktiež podieľa na patologickom procese. Bolo dokázané, že aktivita ADH I v rakovinových bunkách pečene je o 26% vyššia ako v zdravom tkanive, a tým prispieva k zvýšenej produkcii toxického kancerogénneho acetaldehydu. Na druhej strane, aktivita aldehyddehydrogenázy je v rakovinových bunkách nižšia, čo patologický proces len umocňuje a prispieva k rýchlejšej kancerogenéze (Jelski 2008).

V neposlednom rade sa ADH môže podieľať aj na zvýšenom riziku alkoholizmu. Príčinou sú rôzne genetické varianty jednotlivých druhov ADH I. Ľudia, ktorí sú nositeľmi génov pre rýchlejšiu degradáciu alkoholu, *ADH1B*·2 a *ADH1C*·1 alel, majú zvýšené riziko vzniku alkoholizmu, než ľudia s alelami *ADH1B*·1 a *ADH1C*·2. Príčina je jednoduchá. Jedinci, ktorí sú rýchlymi metabolizátormi, sú schopní naraz skonzumovať väčšie množstvá alkoholu, čo môže viesť k rýchlejšiemu návyku na pravidelnú konzumáciu (Tolstrup et al. 2008).

Okrem významnej úlohy ADH v živých organizmoch sa jej účinky využívajú aj v priemysle. Tieto enzýmy sú využiteľné najmä v prípadoch potreby syntézy chirálneho produktu, čo umožňuje ich špecifické aktívne miesto. Výhodou ich používania je, že produktom oxidoredukčnej reakcie katalyzovanej enzýmom je len jeden enantiomér. Negatívom naopak fakt, že v súčasnosti je ich využitie obmedzené len na produkty, ktoré sú len málo rozpustné vo vode (Zheng et al. 2017). ADH môžu byť ako biokatalyzátory využité pri syntéze mnohých liečív, napríklad antidepresív, antiastmatík, statínov, antihipertenzív, antiepileptík, beta laktámov, antitrombotík či protizápalových látok. V súčasnosti sa k tejto ceste „zelenej chémie“ prikláňa stále viac vedcov, nakoľko využitie enzýmov je ekologickejšie, než používanie chemických katalyzátorov. Pozitívom využitia samostatného enzýmu je minimalizácia vedľajších reakcií a čistota produktu. Používanie celých geneticky modifikovaných buniek predstavuje výhodu v stabilite a sebestačnosti, to znamená, že odpadá riešenie problému regenerácie kofaktoru, či zabezpečenie druhého enzýmového systému pre túto funkciu (Torres a Ayala 2013, Zheng et al. 2017).

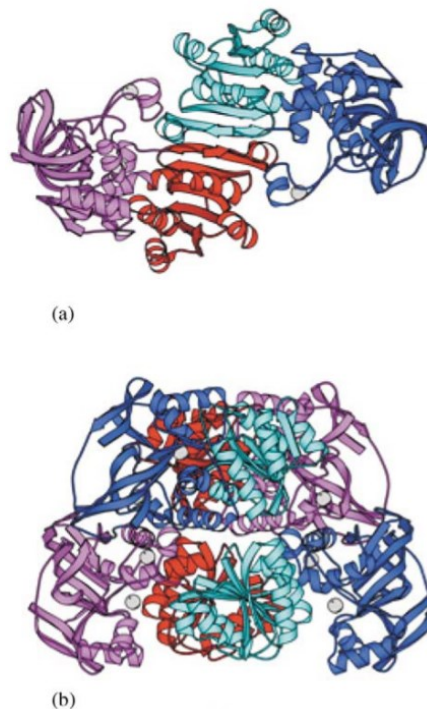
3.1.2 Štruktúra

Podľa dĺžky aminokyselinového reťazca sa skupina alkoholdehydrogenáz delí na 3 superrodiny; long chain, vyššie zmienené MDR a short chain superfamily. Najlepšie charakterizovanou skupinou z alkoholdehydrogenáz sú zinok-dependentné ADH, patriace do MDR - medium-chain dehydrogenase/reductase superfamily, teda superrodiny enzýmov charakteristickej aminokyselinovým reťazcom strednej dĺžky (250 - 350 aminokyselín). Do tejto skupiny patrí aj všetkých 5 tried ľudskej ADH. 40% ADH z MDR v molekule neobsahuje žiadny kovový prvok, kým asi 48% ich obsahuje dokonca dva (Jörnvall et al. 2013). Štruktúru alkoholdehydrogenáz z MDR skupiny dobre vyjadruje konská pečenoá ADH. Môžeme ju považovať za prototyp a jednotlivé podtypy sa líšia len minimálnymi obmenami (Baker et al. 2009).

Terciárna štruktúra

Vo všeobecnosti majú tieto enzýmy variabilný počet podjednotiek, pričom každá podjednotka enzýmu je rozdelená vždy na 2 domény. Prvú, doménu obsahujúcu aktívne miesto - väzbové miesto pre substrát, a druhú, doménu viažucu kofaktor. Doména s aktívnym miestom, inak nazývaná aj katalytická, je menšia a charakteristická pre skupinu dehydrogenáz. Druhá doména poskytuje miesto pre väzbu koenzýmu a obsahuje skupiny potrebné pre samotnú oxidačno-redukčnú reakciu. Dve domény, na ktoré sa viaže koenzým, tvoria centrálnu jednotku molekuly (Eklund 1983, Baker et al. 2009).

ADH získaná z baktérie *Escherichia coli* je štruktúrne veľmi podobná ľudskej ADH I a tiež patrí do MDR. Jej katalytickú doménu tvorí komplex β -skladaných listov a 5 α -helixov. Doména viažuca koenzým je jedným z najsymetrickejších Rossmannových sendvičových záhybov. Tie sú charakteristické tým, že jeden β -skladaný list je obklopený dvomi α -helixmi, pozri **Obr. 2A**) (Karlsson et al. 2003).



Obr. 2 Zobrazenie štruktúry enzýmov ADH z organizmu *E. Coli*

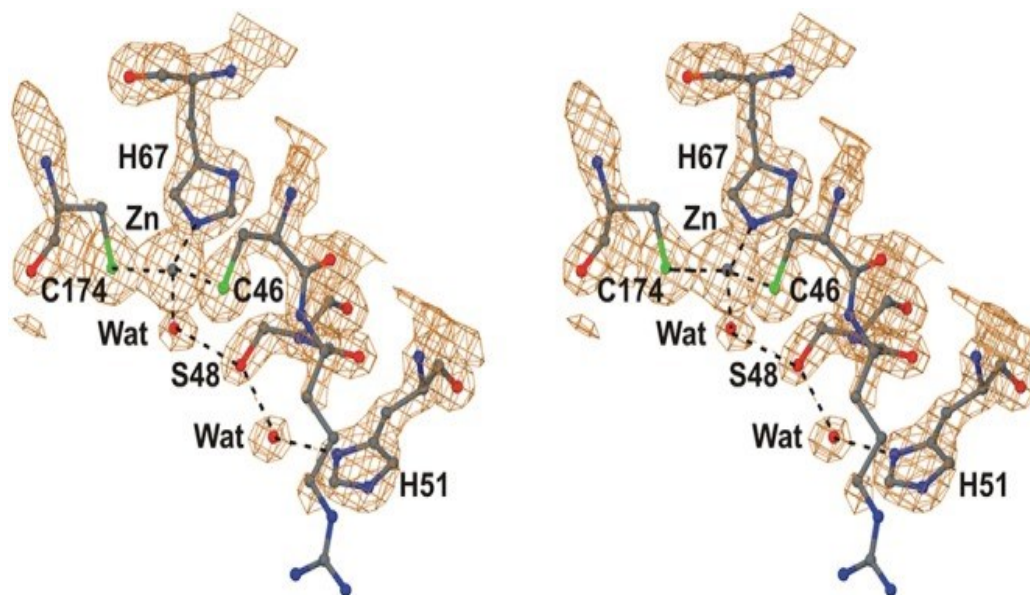
A) Dimér s jednotlivými doménami odlišenými farebne; domény viažuce koenzým slabomodrou a červenou farbou (tvoria Rossmannove záhyby), katalytické domény ružovou a tmavomodrou farbou.

B) Zobrazený tetramér, dimér dvoch dimérov

Prevzaté z: Karlsson et al. 2003

Aktívne centrum konskej pečenej ADH

Obe domény sú spojené esenciálnym atómom zinku, ktorý medzi nimi vytvára štrbinu. Tento koordináčne viazaný zinok je neoddeliteľnou súčasťou aktívneho miesta enzýmu. To však nie je jediná molekula zinku v štruktúre tohto enzýmu. Okrem toho ADH obsahuje ešte jeden, nazývaný aj štruktúrny zinok, ktorého presná funkcia nie je známa (Raj et al. 2014). V neprítomnosti substrátu je atóm zinku aktívneho centra v konformácii tetraédra. Viaže na seba 3 zvyšky aminokyselín katalytickej domény, u konskej pečenej ADH sú to Cys-46, His-67, Cys-174 a molekulu vody, pozri **Obr. 3** (Baker et al. 2009).



Obr. 3 Zobrazenie koordinácie zinku v aktívnom mieste apoenzýmu konskej pečenej *ADH*. K zinku sa koordináčnou väzbou viaže molekula vody a 3 aminokyselinové zvyšky; Cys-46 a 174, a His-67, počas katalytickej reakcie si alkohol vymení miesto s molekulou vody alebo vzniknú nestále intermediáty.

Zn- zinok, *Wat*- molekula vody,

Prevzaté z: Plapp et al. 2017

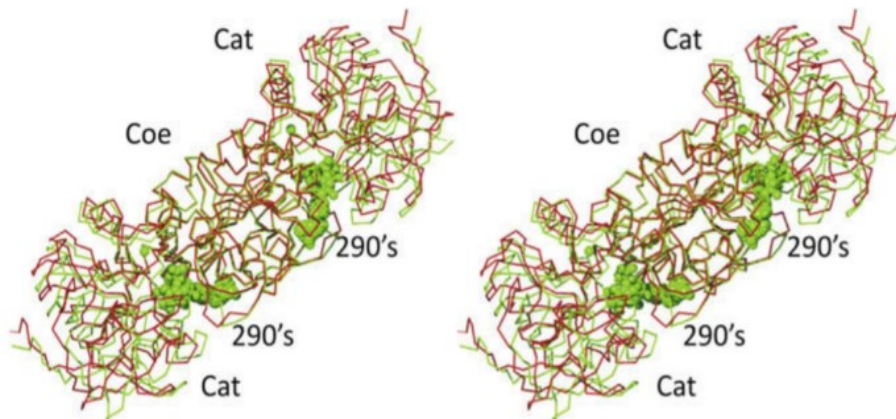
Dynamické zmeny

Štúdie dynamických zmien MDR počas katalýzy dokazujú, že proces je veľmi podobný u všetkých enzýmov z tejto superrodiny. Hoci primárna štruktúra aktívneho miesta nemusí byť úplne totožná, zachová sa acidita, či pozícia v priestore. Príslušné zvyšky aminokyselín sú väčšinou ekvivalentné. Podrobnosti katalytického procesu nie sú úplne známe (Plapp et al. 2016, Plapp et al. 2017). Existuje viac hypotéz. Prvá je spojená s vytvorením dvoch prechodných pentakoordinovaných intermediátov na zinku aktívneho centra. Tieto prechodné stavy by boli len veľmi krátkodobé a následne by aj tak vznikol tetrakoordinovaný produkt s naviazaným alkoholom (Kleifeld et al. 2003). Druhou hypotézou je odpojenie jedného aminokyselinového zvyšku a výmena za substrát (Plapp et al. 2016).

Odhladnuc od presných dynamických zmien je známe, že *ADH* na seba naviaže naraz minimálne 2 substráty. Prvým je kofaktor NAD^+ , tým druhým je alkohol (aldehyd).

Hlavnou funkciou tohto enzýmu je teda poskytnúť dvom reaktantom prostredie, výhodné pre priebeh chemickej reakcie (Eklund 1983).

Pečeňová konská ADH bola jedným z prvých enzýmov, ktoré boli preskúmané kryštalograficky v podobe holoenzýmu, ale aj apoenzýmu, pozri **Obr. 4**. Zistila sa zmena konformácie po naviazaní NAD^+ . U konskej ADH je charakterizovaná ako rotácia oboch domén asi o 10° a privretie charakteristickej štrbiny, čo korešponduje aj s ľudskou, či s inými druhmi ADH. Apoenzým sa vyskytuje obvykle v „otvorenom“ stave, holoenzým s naviazaným kofaktorom v „zatvorenom“, kedy sa zvyšky aminokyselín aktívneho centra premiestnia bližšie a vytvoria miesto pre naviazanie substrátu. Táto konformačná zmena je kľúčová k správnej funkcii enzýmu. Slučka obsahujúca aminokyselínové zvyšky 292-299 zmení svoje rozloženie, čo umožní, že katalytické domény sa taktiež môžu presunúť. Výsledok je aktívne miesto výhodné pre naviazanie substrátu (Plapp 2010).



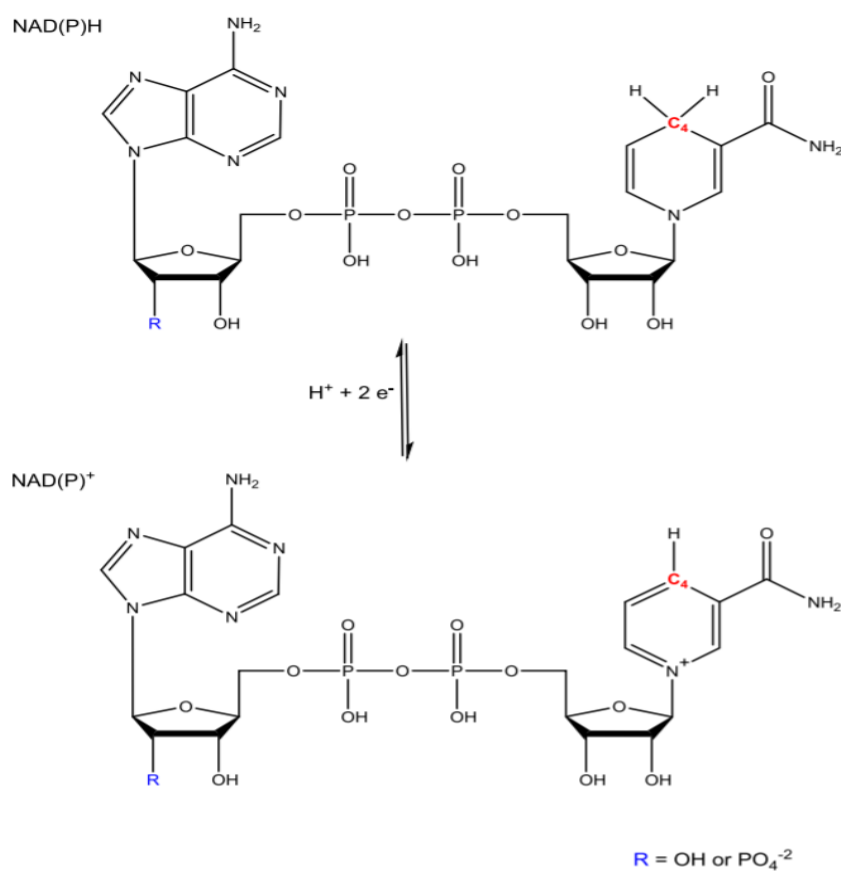
Obr. 4 Grafické zobrazenie kryštálovej analýzy enzýmu. Konformačná zmena konskej pečeňovej ADH, po naviazaní koenzýmu NAD^+ . Červenou farbou zobrazený apoenzým - otvorený stav, zelenou farbou holoenzým - zatvorený stav

Coe- domény viažúce koenzým, Cat- katalytické domény, 290's – slučka obsahujúca aminokyseliny 292-299

Prevzaté z: Plapp 2010

Kofaktor NAD⁺

NAD⁺ je pyridínový nukleotid, hrajúci dôležitú úlohu v metabolizme buniek. Keďže ADH patrí medzi enzýmy, ktoré ako kofaktor využívajú NAD(P)⁺, bez tejto molekuly by samotná enzymatická reakcia neprebehla. Oxidácia substrátu prebieha transferom katiónu (H⁺) na tento kofaktor, slúžiaci aj ako akceptor elektrónov. Výsledkom je redukovaný kofaktor NADH či NADPH a oxidovaný alkohol. Nikotínamidový kruh je priamo zúčastnený na transfere elektrónov, kým C4 atóm dusíka vystupuje ako akceptor/ donor H⁺, pozri **Obr. 5** (Meijers et al. 2001).



Obr. 5 Molekula NAD(P)⁺/NAD(P)H, obsahuje adenínový a nikotínamidový nukleosid, ktoré sú spojené pomocou svojich fosfátových skupín, tvoria pyrofosfátovú väzbu. Redukovaný kofaktor je na obrázku hore, oxidovaný kofaktor dolu. Nikotínamidový kruh je akceptor/donor elektrónov a C4 atóm uhlíka (zobrazený červenou farbou) je akceptor/donor H⁺. NAD⁺/NADP⁺ kofaktory sa líšia substituentom R. U NAD⁺/NADH je R = OH, u NADP⁺/NADPH R = PO₄

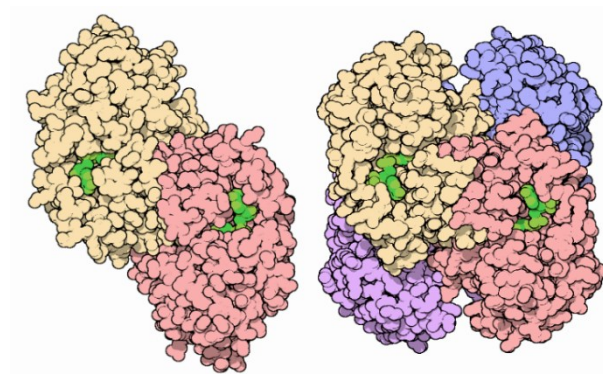
Prevzaté z: Sellés et al. 2018

Kvartérna štruktúra

Obvykle sa ADH vyskytuje ako polymér, takže v jednej molekule enzýmu môže súčasne prebiehať viac enzymatických premien naraz. Z hľadiska kvartérnej štruktúry sa molekuly vyskytujú najčastejšie v dimérnej či tetramérnej forme. Aj keď sa to môže zdať ako signifikantný rozdiel, tetramérna štruktúra je obvykle veľmi podobná dimérnej, v podstate molekuly dimérov tvoria diméry pozri **Obr. 2** (Karlsson et al. 2003, Raj et al. 2014).

3.1.3 Medzidruhové rozdiely

Hlavným rozdielom medzi ADH vyšších eukaryotických organizmov (rastliny a zvieratá), a prokaryotov a nižších eukaryotov (kvasinky), je v ich kvartérnej štruktúre – počte podjednotiek. Vyššie eukaryoty majú obvykle ADH v podobe diméru, druhá skupina jednoduchších organizmov obsahuje väčšinou ADH tetramérnej štruktúry, pozri (Raj et al. 2014).



Obr. 6 Porovnanie kvartérnej štruktúry molekúl, rozdiel medzi ľudskou dimérnou ADH (vľavo) a bakteriálnou tetramérnou ADH (vpravo). Všetky jednotlivé podjednotky sú farebne rozlíšené. Kofaktor je znázornený zelenou.

Prevzaté z: *Godsell 2001*

Kvasinková ADH

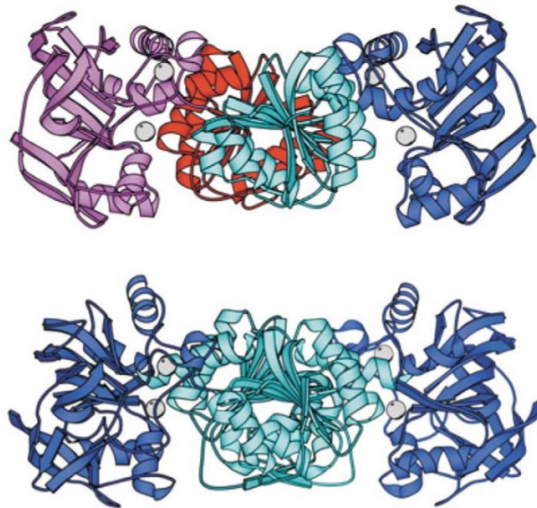
Pri porovnávaní štruktúry konskej pečenej a kvasinkovej ADH sa zistilo, že napriek mnohým odlišnostiam a tomu, že ich sekvencia aminokyselín je zhodná iba asi na 32%, sa časti dôležité pre funkciu enzýmu líšia iba minimálne (Reid a Fewson 1994). V primárnej štruktúre sú pre ďalšie usporiadanie v priestore dôležité najmä špecifické

oblasti hydrofóbných aminokyselinových zvyškov, kde 90 z 93 aminokyselín zodpovedá rovnakej pozícii, čo značí veľkú podobnosť enzýmov. Podobne na tom sú aj aminokyseliny zodpovedné za hlavné enzymatické mechanizmy, teda aktívne miesto, či miesto viažuce kofaktor. U kvasinkového enzýmu bola zistená mierna odlišnosť, a to prítomnosť objemnejších aminokyselinových zvyškov v mieste naviazania substrátu. Toto môže viesť k vyššej substrátovej špecificke. Napriek tomu, že enzýmy nemajú rovnakú štruktúru, dá sa tvrdiť, že aminokyselinové zvyšky zodpovedné za terciárnu štruktúru sú zachované v oboch enzýmoch. Hlavným rozdielom je kvartérna štruktúra. Napriek veľkej podobnosti sa konský enzým vyskytuje ako dimér, kvasinkový ako tetramér. Príčina tohto rozdielu je pripisovaná hlavne rozdielnym 114-122 aminokyselinovým reziduám, avšak táto teória nebola preukázaná (Raj et al. 2014, Jörnvall et al. 1978).

Skúmaním kvasinkového enzýmu ADH zo *Saccharomyces cerevisiae* sa ďalej zistilo, že hoci je enzým zložený zo 4 podjednotiek, jednotlivé podjednotky sú usporiadané ako dvojice dimérov, a teda významne sa podobajú na konskú ADH. Každá podjednotka má typicky 2 domény a charakteristickú štruktúru. Tieto 4 rozdielne podjednotky sa môžu vyskytovať v rôznom zastúpení. Klasickou alternatívou je zastúpenie všetkých štyroch, ako AB:CD, kedy je aktívne miesto situované medzi dvomi dimérmi, preto je aj menej prístupné pre substrát. Ďalšou možnosťou je konformácia AB:AB/CD:CD, čo reprezentuje kvartérnu štruktúru, ktorá má prístupnejšie aktívne miesto, orientované k povrchu molekuly (Raj et al. 2014).

Bakteriálna ADH

V bakteriálnych bunkách bolo izolovaných viac foriem ADH enzýmov (rôzne fermentačné či MDR formy). Štruktúrne najzaujímavejšou je tetramérna ADH, ktorá je považovaná za príbuznú kvasinkovému enzýmu. Zároveň sú jej jednotlivé podjednotky veľmi blízke ľudskej ADH I/konskej pečenej ADH. Všetky tieto enzýmy sú rovnako členené na 2 domény, katalytickú a koenzýmovú. Oproti konskej pečenej ADH vykazuje taktiež iba malé obmeny aminokyselinových zvyškov a mierne skrátenie reťazca. Obe molekuly majú takmer identické podjednotky, pozri **Obr. 7** ale samozrejme, alkoholom indukovaná NADP⁺-dependentná bakteriálna ADH, sa vyskytuje v tetramérnej forme (Karlsson et al. 2003)

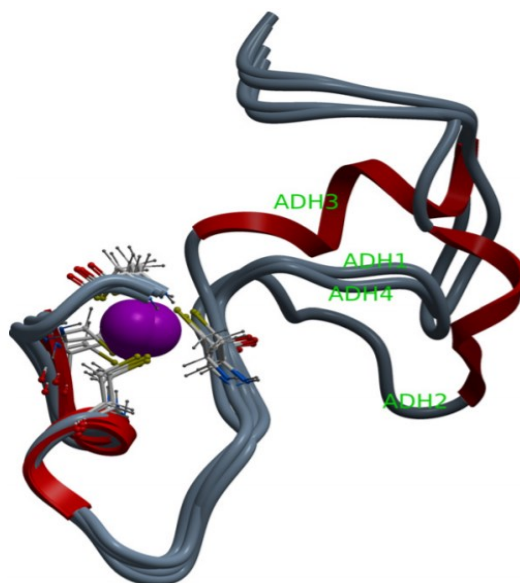


Obr. 7 Dimér ADH z organizmu *E. Coli* (hore) porovnaný s príslušným dimérom, kompletnou molekulou konskej pečenej ADH (dole), napriek tomu, že sa bakteriálna ADH prirodzene vyskytuje vo forme tetraméru, pri porovnaní dimérov enzýmov môžeme pozorovať, že sú s konskou pečenej ADH veľmi podobné.

Prevzaté z: Karlsson et al. 2003

Ludské ADH enzýmy

Ludské ADH sú dimérmymi enzýmami, ktoré sa fyziologicky nachádzajú v cytosole bunky. Ako bolo spomenuté vyššie, rozoznávame niekoľko tried, na základe špecificity k substrátu, senzitivity a lokalizácie, pozri **Tab. 1**. Rozdiel medzi primárnymi štruktúrami týchto enzýmov je u tried 1-4 asi 40% (Jelski 2008). Po analýze aminokyselinových sekvencií jednotlivých tried a izoenzýmov sa zistilo, že najväčšia variabilita sa nachádza práve v aminokyselinovej slučke, nasledujúcej v tesnej blízkosti po atóme zinku aktívneho miesta enzýmu, pozri **Obr. 8**. Samozrejmosťou je, že aj v tomto úseku existujú sekvencie, ktoré sú u všetkých tried totožné, hlavne Cys-97, Cys-100, Cys-103 a Cys-111 (Höög a Östberg 2011).



Obr. 8 Zobrazenie variability štruktúry jednotlivých tried enzýmov ľudskej ADH 1-4, slučka nasledujúca po atóme zinku je rovnaká u ADH 1 a 4, u triedy 2 a 3 tvorí rôzne α -helixové štruktúry, katalytický atóm zinku zobrazený fialovo.

Prevzaté z: Höög a Östberg 2011

3.1.4 Známe a používané inhibítory

Enzým ADH hrá významnú úlohu v metabolizme etanolu, metanolu a etylénglykolu. Tieto látky boli (a etanol aj do dnešného dňa je) častými pôvodcami akútnych otráv ich toxickými metabolitmi. Na takéto intoxikácie v minulosti neexistovalo účinné liečivo, a preto sa vedecká obec snažila nájsť vysoko účinný liek. Konvenčná liečba spočívala v infúznom podávaní etanolu, ktorý s metanolom súťaží ako substrát o aktívne miesto na enzýme. Dnes už liečba etanolom nie je odporúčaná, pretože nesie so sebou aj mnohé riziká (Mycyk a Leikin 2003).

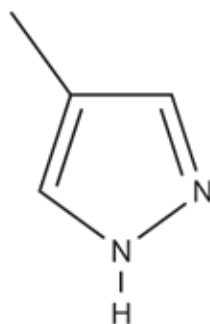
Už v 60. rokoch minulého storočia sa zistilo, že pyrazol zvyšuje šancu prežitia u intoxikovaných zvierat inhibíciou ADH, zodpovednej za premenu látok na ich toxické metabolity. Toto bolo začiatkom rozsiahleho výskumu. Pyrazol sa ukázal ako veľmi účinný inhibítor, avšak pre jeho hepatotoxicitu nebolo možné ho bezpečne podávať ľuďom. Na základe jeho inhibičnej aktivity sa substitučnými obmenami podarilo získať inhibítor vysoko účinný, ale zároveň pre človeka len minimálne toxický (Baud et al. 1986, Mycyk a Leikin 2003).

Najznámejším a úspešne klinicky používaným inhibítorom alkoholdehydrogenázy sa stal fomepizol, 4-metylpyrazol. V roku 1998 ho US Food and Drug Administration schválil najprv ako liečivo akútnej otravy etylénglykolom, zakrátko aj k liečbe intoxikácie metanolom (Mycyk a Leikin 2003). Na základe mnohých štúdií môžeme tvrdiť, že ako jediný zo známych inhibítorov enzýmu sa v praxi používa práve kvôli jeho účinkom na ADH. Ďalšími známymi inhibítormi sú látky v klinickej praxi využívané na iné indikácie. Inhibícia ADH je skôr vedľajším účinkom, ktorý je potrebné poznať. Pre účely tejto práce boli vybrané ďalšie 3 známe liečivá používané v terapii, u ktorých bola dokázaná inhibičná aktivita voči enzýmu ADH.

Fomepizol

Štruktúrnym vzorcom je to 4-metylpyrazol (pozri **Obr. 9**), kompetitívny inhibítor ľudskej ADH, konkrétne druhov ADH1A, ADH1B1, ADH1B2, ADH1C1 a ADH1C2, a nekompetitívny inhibítor ADH1B3, ADH2 a ADH4. Jedine aktivita ADH3 izoenzýmu nie je inhibovaná (Lee et al. 2011).

Fomepizol je bežne užívaný v klinickej praxi. Jeho výhodou je nízka toxicita a malá incidencia (cca 12%) nežiadúcich účinkov, medzi ktoré patria bolesti hlavy, závrate, hnačka, vyrážka, nystagmus či mierne omámenie. Všetky z týchto nežiadúcich účinkov sú však iba veľmi mierne a majú krátku dobu trvania (Jacobsen et al. 1990, Theorell et al. 1969, Mycyk a Leikin 2003).



Obr. 9 Vzorec *fomepizolu*, 4-metylpyrazolu

Fomepizol má vysokú mieru distribúcie do tkanív (až 0,6-1,0 l/kg) a veľmi nepatrnú mieru väzby na proteíny, čo značí, že je aj ľahko dialyzovateľný (Jobard et al. 1996).

Ako bolo spomenuté vyššie, nemá takmer žiadne vedľajšie účinky a oproti etanolu, ktorý bol na terapiu otráv využívaný pred ním, má mnoho výhod. Na enzým sa viaže s viac ako 8000-krát vyššou afinitou, než etanol (Bestic et al. 2009). Pôsobí dlhšie a má vyššiu aktivitu (Baud et al. 1996). Jeho sérové hladiny nie je nutné monitorovať tak často ako u etanolu, keďže u fomepizolu nie je taký široký interindividuálny rozdiel v metabolizme. Takisto monitorovanie mozgových funkcií pacienta je jednoduchšie, keďže pri podávaní etanolu hrozí útlm centrálného mozgového systému (Mycyk a Leikin 2003). Navyše je u detí pri podávaní etanolu aj zvýšená potreba monitorovania glukózy v krvi, čo pri podávaní fomepizolu nie je nutné (Boyer et al. 2001). Negatívom fomepizolu je najmä jeho vyššia cena oproti etanolu a zároveň fakt, že nie je dostupný vo všetkých krajinách (McMartin et al. 2012).

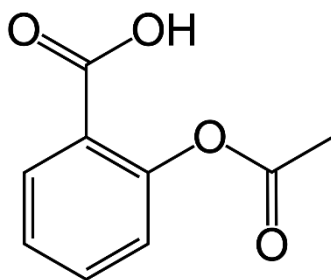
Tento inhibítor ADH je indikovaný u všetkých pacientov s podozrením na otravu metanolom či etylénglykolom, bez ohľadu na to, či nastúpila metabolická acidóza alebo nie. Nespornou výhodou fomepizolu je fakt, že v prípade rýchleho podania, kedy metanol nestihol byť premenený enzýmom ADH, otrava ani nemusí nastať. Podanie je intravenózne, s nasycovacou dávkou 15 mg/kg a následne 10 mg/kg každých 12 hodín. Finálna koncentrácia fomepizolu v plazme je 0,8 µg/ml (10 µmol/l) (Brent et al. 2001).

Kyselina acetylsalicylová a salicylát

Podávanie ASA - kyseliny acetylsalicylovej (**Obr. 10**), jedného z najvyužívanejších liekov proti zápalu, bolesti či ako antiagregans, je spojené so zvýšením hladiny etanolu v krvi, čo potencuje aj jeho nežiaduce účinky. Efekt sa pripisuje inhibícii first-pass metabolizmu etanolu. Tieto spojitosti boli známe už od roku 1990, kedy sa prvý krát podarilo experimentálne dokázať, že po podaní aspirínu sa metabolizmus etanolu v žalúdku zníži a jeho koncentrácia v krvi vzrastie. Podmienkou inhibičného účinku bolo, že etanol sa podal už 1 hodinu po ASA, predchádzajúce pokusy s dlhšími časovými intervalmi neboli úspešné (Roine et al 1990).

Salicylát je jedným z jej hlavných metabolitov a kompetitívny inhibítor takmer všetkých tried ľudskej ADH, okrem ADH1B2 a ADH1B3, kde vystupuje ako nekompetitívny inhibítor. Jeho inhibičné schopnosti sú niekoľkonásobne vyššie než u ASA. Pri vysokých terapeutických hladinách môže salicylát dosahovať hodnoty 75-86% inhibície aktivity

ADH, pri nízkych hladinách v plazme až 68-48%, čo značí, že tieto hodnoty nie sú zanedbateľné (Lee et al. 2015).



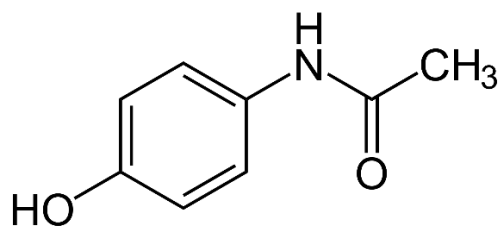
Obr. 10 Vzorec kyseliny acetylsalicylovej, 2-acetyloxybenzoovej

Paracetamol (N-acetyl-p-aminofenol, acetaminophen)

Užívanie paracetamolu (**Obr. 11**), jedného z najviac používaných voľnopredajných antipyretík a analgetík, je často spojené aj s konzumáciou alkoholu. Prvou závažnou interakciou týchto dvoch látok je indukcia enzýmu CYP2E1 etanolom, čo vedie k zvýšenej tvorbe toxických metabolitov paracetamolu a jeho nadmernej hepatotoxicite (Riordan a Williams 2002).

Druhou, menej známou interakciou je inhibícia ADH, a teda zvýšená koncentrácia etanolu v organizme, kvôli inhibícií first-pass metabolizmu v žalúdku (Palmer et al. 1991).

Okrem inhibície gastrickej ADH, paracetamol pôsobí ako kompetitívny inhibítor aj u všetkých ostatných tried ľudskej ADH. Najväčšiu inhibičnú aktivitu nesú triedy II a IV (Lee et al. 2013).



Obr. 11 Vzorec paracetamolu, N-acetyl-p-aminofenol

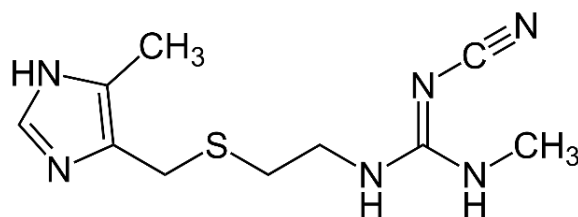
H₂ blokátory

H₂ blokátory, antagonisti histamínových receptorov typu 2, boli v minulosti jedny z najpoužívanejších „over-the-counter“ liečiv. Pri týchto prípravkoch, ktoré nie sú

viazané na predpis sa predpokladá, že sú častejšie podávané v kombinácii s alkoholom. Navyše pravidelná konzumácia alkoholu môže spôsobovať dyspepsie, predstavujúce jeden z hlavných dôvodov užívania týchto liečív, pretože zmierňujú ich symptómy (Grugler 1994).

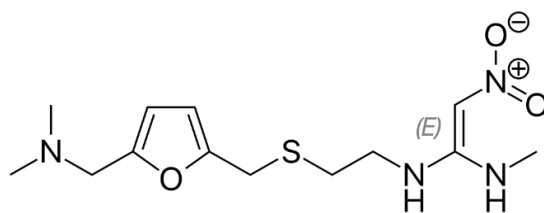
Pri meta-analýze 24 štúdií zaoberajúcich sa efektom H₂ blokátorov na hladiny alkoholu v krvi sa zistilo, že cimetidín a ranitidín môžu hladiny alkoholu zvyšovať. Táto interakcia sa však zdala byť natoľko slabá, že nebola považovaná za klinicky relevantnú (Weinberg et al. 1998). U famotidínu, tretieho známeho zástupcu skupiny, táto interakcia úplne chýba (Grugler 1994).

Pri ďalších skúšaníach, konkrétne cimetidínu (pozri **Obr. 12**), s ľudským enzýmom ADH, bola potvrdená jeho inhibičná aktivita, avšak iba pri vyšších koncentráciách liečiva. Tieto koncentrácie môžu byť spôsobené akumuláciou H₂ blokátora v bunkách pri pravidelnom užívaní. Inhibované boli takmer všetky triedy ľudskej ADH, najvyššia miera inhibície bola až 44% u ADH1B3 izoenzýmu (Lai et al. 2013).



Obr. 12 Vzorec cimetidínu

V inej štúdií, ktorá skúmala toxicitu metanolu na potkanoch, bolo dokázané, že podanie ranitidínu (pozri **Obr. 13**) zabránilo retinopatiám dokonca úspešnejšie, než fomepizol. Chýbajú však ďalšie poznatky. Stále nie je známe, či to bolo z dôvodu inhibície ADH, vďaka jeho antioxidantným schopnostiam alebo iným mechanizmom (El-Bakary et al. 2010).



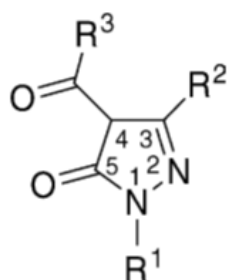
Obr. 13 Vzorec ranitidínu

3.2 4-acylpyrazol-5-óny a analogické látky

4-acylpyrazol-5-óny patria do skupiny β -diketónov, ktoré sú známe hlavne vďaka svojim chelatačným schopnostiam, pomocou koordinačnej väzby s iónmi rôznych kovov (Marchetti et al. 2005, Filipický et al. 2012). Pre ich schopnosť viazať ióny sa s výhodou využívajú hlavne ako analytické činidlá, pri detekcii a izolácii kovov. Výsledné komplexy sú stabilné a majú charakteristické sfarbenie (Nisihama et al. 2001).

3.2.1 Štruktúra

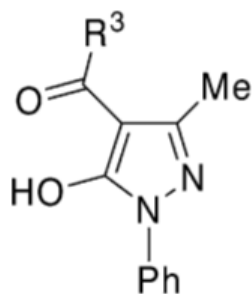
V tejto práci sa budeme zaoberať len malou skupinou substituovaných 4-acylpyrazol-5-ónov. Vo všeobecnosti tieto látky z hľadiska chemickej štruktúry všetky obsahujú pyrazolónové jadro, bohato substituované v polohách 1,3,4 a 5, pozri **Obr. 14**. Ďalším spoločným štruktúrnym rysom je usporiadanie diketo skupiny, tvoriacej kruh, ktorý je schopný chelatovať ióny.



Obr. 14 Všeobecný vzorec spoločnej štruktúry substituovaných 4-acylpyrazol-5-ónov, R^1, R^2, R^3 sú substituenty, ktoré môžu byť rôzne.

Prevzaté z: Marchetti et al. 2005

Spoločnú štruktúru je možné ešte upresniť. V testovaných látkach sa objavujú v polohe R^1 vždy fenylové jadro a v polohe R^2 vždy metylová skupina, čo umožňuje všeobecný vzorec viac zjednodušiť a všetky obmeny sa uskutočňujú iba na substituenty v polohe 4, pozri **Obr. 15**.



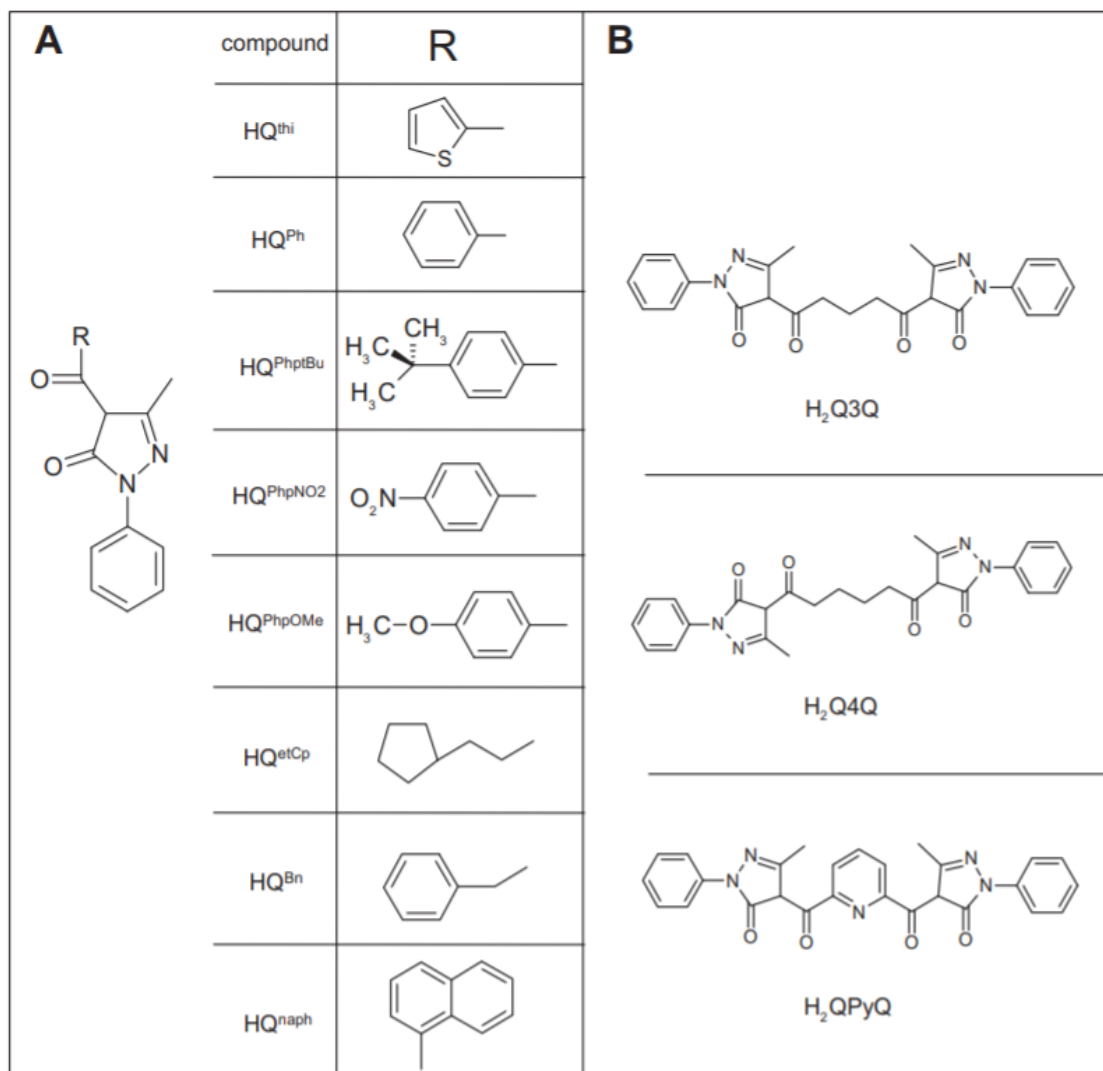
Obr. 15 Všeobecný vzorec spoločnej štruktúry 1-fenyl-3-metyl-4-acylpyrazol-5-ónov

Prevzaté z: Marchetti et al. 2005

Ako je už z predchádzajúcich obrázkov zrejmé, všetky tieto látky majú schopnosť tvoriť oxo a enol tautoméry (**Obr. 14** a **Obr. 15**). Delokalizácia π -elektrónov v pyrazolónovom jadre a zároveň prítomná dvojitá väzba medzi uhlíkmi 4 a 5 spôsobuje, že 4-acylpyrazol-5-óny majú schopnosť vytvoriť dokonca až 5 rôznych tautomérnych foriem (Marchetti et al. 2005).

Pyrazolový kruh, ktorý má elektronegativitu porovnateľnú s trifluorometylovým aniónom, významne ovplyvňuje vlastnosti týchto molekúl a ich príslušných komplexov s kovmi (Pettinari et al. 2003). Práve nami testované látky už boli v minulosti preukázané ako chelátory železa (Filipský et al 2012) a zinku (Nováková 2020).

Týchto 11 látok, ktoré sme skúmali ako potencionálne inhibítory ADH, sa štruktúrne líšia iba substituentom R^3 na polohe 4 pyrazolónu, pozri **Obr. 16**. Podľa povahy substituentu ich ešte môžeme rozdeliť na látky s jednoduchou štruktúrou a látky, ktoré obsahujú bis(4-acylpyrazol-5-ón).



Obr. 16 Zobrazenie rozdielnych substituentov R na polohe 4 pyrazolonového jadra, na nami testovaných 4-acylpyrazol-5-ónoch.

A) látky s jednoduchou štruktúrou

B) látky s bis(4-acylpyrazol-5-ón)ovu štruktúrou

Prevzaté z: Filipský et al. 2012

4 CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto práce bolo zistiť, či sú syntetické chelátory zo skupiny 4-acylpyrazol-5-ónu schopné zablokovať účinky dvoch rôznych alkoholdehydrogenáz. Podkladom pre túto domnienku bola ich schopnosť chelatovať kovy. V našom prípade je významná hlavne chelatácia zinku, ktorý je, ako bolo uvedené vyššie, integrálnou súčasťou molekuly oboch skúmaných ADH. Sekundárnym cieľom bolo definovať najvýhodnejšie štruktúrne vlastnosti pre inhibíciu ADH v testovanej skupine látok.

5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

5.1 Chemikálie

Superčistá voda, pripravená prístrojom Milli-Q RG (Merck Millipore, Massachusetts, USA)

Ľad

Etanol 96% (v/v) Sigma-Aldrich (Nemecko)

Hydroxid sodný (NaOH) Sigma-Aldrich (Nemecko)

Kyselina chlorovodíková (HCl) Sigma-Aldrich (Nemecko)

Dekahydrát fosforečnanu sodného ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) Sigma-Aldrich (Nemecko)

Kyselina fosforečná (H_3PO_4) Sigma-Aldrich (Nemecko)

Dihydrogenfosforečnan sodný (NaH_2PO_4) Sigma-Aldrich (Nemecko)

Hydrogenfosforečnan disodný (Na_2HPO_4) Sigma-Aldrich (Nemecko)

Dimetylsulfoxid (DMSO) Lach-Ner (Czech Republic)

BSA- hovädzí sérový albumín Sigma-Aldrich (Nemecko)

β -NAD⁺- β -nikotínamid adenín dinukleotid Sigma-Aldrich (Nemecko)

TRIS - tris(hydroxymetyl)aminometán Sigma-Aldrich (Nemecko)

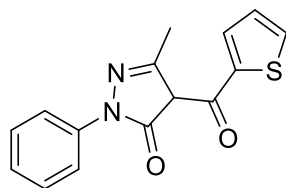
5.2 Enzýmy

ADH_y - kvasinková alkoholdehydrogenáza Sigma-Aldrich (Nemecko)

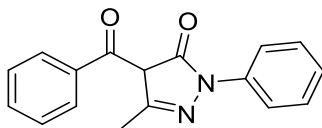
ADH_{eq}- konská alkoholdehydrogenáza Sigma-Aldrich (Nemecko)

5.3 Testované látky

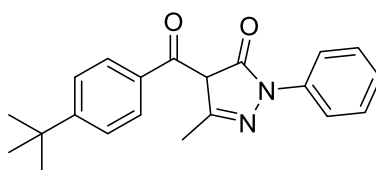
Vzorce testovaných látok zo skupiny 4-acylpyrazol-5-ónov používaných v experimente, pozri **Obr. 17- Obr. 27**.



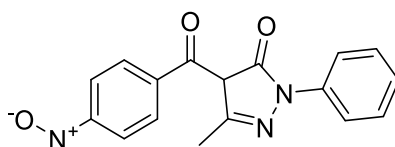
Obr. 17 Vzorec HQ^{thi} , 1-fenyl-3-metyl-4-(tiofén-2-karbonyl)-1H-pyrazol-5(4H)-ón



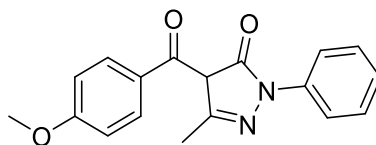
Obr. 18 Vzorec HQ^{ph} , 4-benzyol-1-fenyl-3-metyl-1H-pyrazol-5(4H)-ón



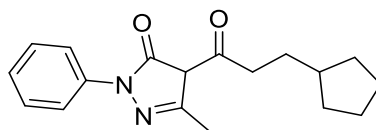
Obr. 19 Vzorec HQ^{ph^tBu} , 4-(4-terc-butylbenzoyl)-fenyl-3-metyl-1-1H-pyrazol-5(4H)-ón



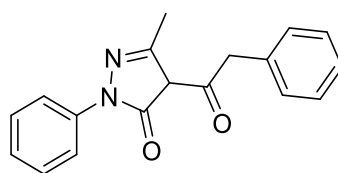
Obr. 20 Vzorec HQ^{phNO_2} , 1-fenyl-3-metyl-4-(4-nitrobenzoyl)-1H-pyrazol-5(4H)-ón



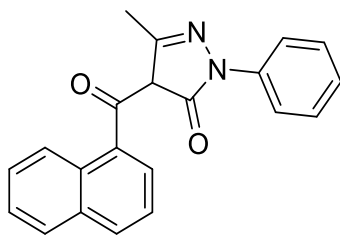
Obr. 21 Vzorec HQ^{phOMe} , 1-fenyl-4-(4-metoxybenzoyl)-3-metyl-1H-pyrazol-5(4H)-ón



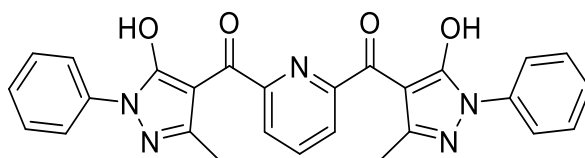
Obr. 22 Vzorec HQ^{etCP} , 4-(3-cyklopentylpropanoyl)-1-fenyl-3-metyl-1H-pyrazol-5(4H)-
ón



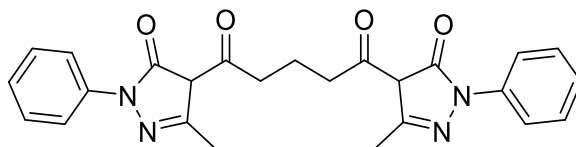
Obr. 23 Vzorec HQ^{bn} , 1-fenyl-4-(2-fenylacetyl)-3-metyl-1H-pyrazol-5(4H)-ón



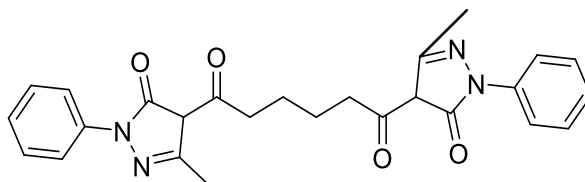
Obr. 24 Vzorec HQ^{naph} , 1-fenyl-3-metyl-4-(1-naftoyl)-1H-pyrazol-5(4H)-ón



Obr. 25 Vzorec H_2PyQ , pyridín-2,6-diylbis(1-fenyl-5-hydroxy-3-metyl-1H-pyrazol-4-yl)metánón



Obr. 26 Vzorec H_2Q_3Q , 1,5-bis(1-fenyl-3-metyl-5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)pentán-1,5-dión



Obr. 27 Vzorec H_2Q_4Q , 1,6-bis(1-fenyl-3-metyl-5-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)hexán-1,6-dión

Všetky testované 4-acylpyrazol-5-óny boli pripravené v laboratóriu Prof. Pettinariho (School of Pharmacy, Universita Camerino, Taliansko).

Spolu s potenciálnymi inhibítormi bol ako pozitívna kontrola testovaný aj fomepizol (4-metylpyrazol), ktorého vzorec je uvedený vyššie na **Obr. 9**, Sigma-Aldrich (Nemecko).

5.4 Prístroje a spotrebný materiál

5.4.1 Prístroje a programy

Jednokanálové pipety Eppendorf - Nemecko

Multikanálové pipety Eppendorf - Nemecko

Analytické váhy Kern ALT 220-4NM (Kern & Sohn GmbH, Balingen) - Nemecko

Vortex mixér IKA Vortex Genius 3 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG) - Nemecko

WTW pH 538 pH/mV-Meter (WTW) - Nemecko

Absorbancia bola zmeraná na Hidex Sense multiplate reader (Hidex) - Fínsko

Grafické výsledky inhibície boli spracované pomocou programu GraphPad Prism verzia 8.0 pre Windows, GraphPad Software (San Diego), USA.

Výpočty, korelácia a graf korelácie boli spracované v programe Microsoft Excel, verzia 2013.

Vzorce boli vytvorené v programe ChemDraw verzia 12.0 (PerkinElmer, USA).

5.4.2 Spotrebný materiál

Mikrotitračná doštička	Brand (Nemecko)
Mikroskúmavky 1,5 ml	Eppendorf (Nemecko)
Špičky k pipetám	Eppendorf (Nemecko)
Skúmavky 15 ml	Eppendorf (Nemecko)
Skúmavky 50 ml	Eppendorf (Nemecko)

5.5 Príprava roztokov pre testovanie inhibície kvasinkového enzýmu

5.5.1 Príprava zásobných roztokov

Všetky zásobné roztoky sa pripravujú navážením príslušnej chemikálie na analytických váhach a dopočítaním objemu kvapaliny, ak nie je uvedené inak.

- **1M roztok NaOH** v ultračistej vode ($M_w = 39,997 \text{ g/mol}$)
- **1M roztok HCl** v ultračistej vode ($M_w = 36,64 \text{ g/mol}$)

- **9,5% (v/v) H_3PO_4** v ultračistej vode ($M_w = 97,994$ g/mol). Skladovanie 2-8°C.
- **50mM Pufer fosforečnanu sodného, pH 8,8** (25°C). Pripravuje sa navážením $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ ($M_w = 446,055$ g/mol), rozpustením v ultračistej vode. Následne sa upraví pH na 8,8 pri teplote 25°C roztokom 9,5% H_3PO_4 . Skladuje sa v chladničke.
- **Zásobný roztok dihydrogénfosforečnanu sodného (NaH_2PO_4) 0,5M** ($M_w = 119,98$ g/mol) v ultračistej vode. Skladuje sa v chladničke.
- **Zásobný roztok hydrogénfosforečnanu disodného (Na_2HPO_4) 0,5M** ($M_w = 141,96$ g/mol) v ultračistej vode. Skladuje sa v chladničke.
- **10mM Pufer fosforečnanu sodného, pH 7,5** (25°C). Na prípravu 250 ml pufru sa zriedi 4,2 ml *pufer fosforečnanu sodného* a 800 μ l zásobným roztokom NaH_2PO_4 , objem sa doplní ultračistou vodou. Následne sa pomocou roztokov 1M HCl a 1M NaOH upraví hodnota pH na 7,5 pri 25°C.
- **BSA stock- zásobný roztok BSA 10mg/ml** v ultračistej vode. Skladovanie -20°C.

5.5.2 Príprava pracovných roztokov

Pracovné roztoky sa pripravovali čerstvé, vždy v deň experimentu.

- **Roztoky testovaných látok** sa pripravili navážením látky a jej rozpustením v dopočítanom objeme DMSO. Vo výslednom hodnotení je nutné prihliadnuť na riedenie vzorky priamo v mikrotitračnej doštičke, pripravili sme roztok 28-krát viac koncentrovanej, ako požadovaná výsledná koncentrácia.
- **Rozpúšťadlo enzýmu** (10 mM pufer fosforečnanu sodného, pH 7,5 s 0,1% (w/v) BSA). Pripraví sa roztok BSA 1mg/ml v 10 mM pufer fosforečnanu sodného, pH 7,5, použije sa BSA stock. pH sa upraví na 7,5 (25°C) pomocou 1M HCl a 1M NaOH. Skladuje sa v chladničke.
- **15 mM β -NAD⁺ (11,6 mg/ml)** v ultračistej vode. Skladuje sa v ľade, je veľmi citlivý na teplo a svetlo.
- **ADH_y zásobný roztok** 1 mg/ml ADH_y v studenom (2-8°C) 10 mM pufer fosforečnanu sodného, pH 7,5. Skladuje sa v ľade, maximálne 90 min.
- **ADH_y pracovný roztok 2 μ g/ml** Pripraví sa zriedením ADH_y zásobného roztoku a (2-8°C) rozpúšťadla enzýmu. Skladuje sa v ľade, ihneď sa spotrebuje.

5.6 Príprava roztokov pre testovanie inhibície konského enzýmu

5.6.1 Príprava zásobných roztokov

- *1M roztok NaOH* v ultračistej vode ($M_w = 39,997$ g/mol)
- *1M roztok HCl* v ultračistej vode ($M_w = 36,64$ g/mol)
- *0,1M roztok TRIS, pH 9,5* v ultračistej vode ($M_w = 121,14$ g/mol). Po pripravení sa pH na 9,5 upravuje roztokmi *1M NaOH* a *1M HCl*. Skladuje sa v chladničke.

5.6.2 Príprava pracovných roztokov

- *Roztoky testovaných látok* sa pripravujú navážením látky a rozpustením v *DMSO*. Vo výslednom hodnotení je nutné prihliadnuť na riedenie vzorky priamo v mikrotitračnej doštičke, preto sme pripravovali roztok 28x viac koncentrovanej, ako požadovaná výsledná koncentrácia.
- *15 mM β -NAD⁺* (11,6 mg/ml) v ultračistej vode.
- *ADH_{eq} roztok 10 mg/ml* v studenom roztoku (2-8°C) *0,1M TRIS, pH 9,5*. Skladuje sa v ľade, stráca svoju aktivitu približne po 90 min. od nariadenia.

5.7 Metódy testovania

Pri oboch metódach testovania sme využívali mikrotitračnú doštičku a merali sme absorbanciu daných vzoriek v čase. Samotné meranie trvalo 6 minút, každých 60 sekúnd prístroj nameral 1 hodnotu absorbancie pre každú jamku doštičky.

Bežne som merala 7 rôznych vzoriek (č.1-7) a 1 kontrolnú vzorku, pozri **Tab. 2**, ktorá bola nevyhnutná pri každom meraní, pre overenie správnosti a prevenciu falošnej pozitivity. Pre prevenciu falošnej negativity a vytvorenie presnejšej krivky sa pri každom meraní ako jedna vzorka testovala vždy iná koncentrácia fomepizolu, inhibítora ADH.

Hodnota absorbancie kontrolnej vzorky ukazuje aktivitu enzýmu v danom roztoku bez akýchkoľvek inhibítorov. Slepé vzorky jednotlivých vzoriek látok poskytujú hodnoty absorbancie roztokov jednotlivých testovaných látok bez enzýmu, takže po odčítaní hodnôt absorbancie slepých vzoriek sa zistí zmena aktivity enzýmu.

Testované vzorky číslo 1-7 boli buď vzorkami rozdielnych látok alebo rozdielnych koncentrácií jednej látky.

5.7.1 Testovanie inhibície aktivity kvasinkovej a konskej ADH

Pri testovaní inhibície enzymatickej aktivity kvasinkovej ADH_y, sme otestovali 11 látok zo skupiny 4-acylpyrazol-5-ónov. Prvým krokom bolo u každej látky otestovať finálnu koncentráciu 200 μ M, 100 μ M a 50 μ M, prípadne 20 μ M alebo 150 μ M. Následne sme podľa výsledkov meraní inhibičnej aktivity pokračovali v testovaní ďalších koncentrácií pre doplnenie priebehu grafu závislosti inhibičnej aktivity látky od koncentrácie roztoku.

Pri testovaní konského enzýmu sa postupovalo obdobne, u každej z 11 testovaných látok sa najprv premerali 2 koncentrácie; 100 μ M a 200 μ M, ktoré slúžili ako screening. Pri ňom sa potvrdil/vyvrátil predpoklad, či látky, ktoré nejavili inhibičnú aktivitu kvasinkovej ADH_y, neinhibujú konský enzým. Meranie ďalších koncentrácií prebehlo iba u látok, u ktorých sa preukázala inhibičná aktivita už v prvých meraniach.

Každá testovaná vzorka mala na mikrotitračnej doštičke 4 jamky (Vzorka č.X^{1,2,3,4}), v ktorých sa testuje inhibícia enzýmu a 2 jamky slepých vzoriek (Slepá vzorka č.X^{1,2}), ktoré slúžili na odčítanie hodnoty absorbancie roztoku danej látky. Rozloženie jednotlivých vzoriek, pozri **Tab. 2**. Mikrotitračná doštička sa pripravovala buď metódou číslo 1 alebo 2.

Tab. 2 Rozloženie vzoriek na mikrotitračnej doštičke, posledný riadok vysvetľuje odoberanie z mikroskúmaviek pri metóde č. 2.

	1	2	3	4	5	6
A	kontrolná vzorka ¹	kontrolná vzorka ²	kontrolná vzorka ³	kontrolná vzorka ⁴	kontrolná slepá vz. ¹	kontrolná slepá vz. ²
B	vzorka č.1 ¹	vzorka č.1 ²	vzorka č.1 ³	vzorka č.1 ⁴	slepá vz. č.1 ¹	slepá vz. č.1 ²
C	vzorka č.2 ¹	vzorka č.2 ²	vzorka č.2 ³	vzorka č.2 ⁴	slepá vz. č.2 ¹	slepá vz. č.2 ²
D	vzorka č.3 ¹	vzorka č.3 ²	vzorka č.3 ³	vzorka č.3 ⁴	slepá vz. č.3 ¹	slepá vz. č.3 ²
E	vzorka č.4 ¹	vzorka č.4 ²	vzorka č.4 ³	vzorka č.4 ⁴	slepá vz. č.4 ¹	slepá vz. č.4 ²
F	vzorka č.5 ¹	vzorka č.5 ²	vzorka č.5 ³	vzorka č.5 ⁴	slepá vz. č.5 ¹	slepá vz. č.5 ²
G	vzorka č.6 ¹	vzorka č.6 ²	vzorka č.6 ³	vzorka č.6 ⁴	slepá vz. č.6 ¹	slepá vz. č.6 ²
H	vzorka č.7 ¹	vzorka č.7 ²	vzorka č.7 ³	vzorka č.7 ⁴	slepá vz. č.7 ¹	slepá vz. č.7 ²
	1.mikroskúmavka		2.mikroskúmavka		3.mikroskúmavka	

5.7.2 Metóda číslo 1- Príprava mikrotitračnej doštičky

Metóda číslo 1 je základnou metódou a využívala sa pri testovaní inhibície enzymatickej aktivity kvasinkového aj konského enzýmu. Do jamiek mikrotitračnej doštičky sa napipetovali presné objemy roztokov, pozri **Tab. 3** a **Tab. 4**

- a) Objemy roztokov použité pri testovaní inhibície aktivity kvasinkového enzýmu ADH_y zobrazuje **Tab. 3**

Tab. 3 Rozpis roztokov pre prípravu mikrotitračnej doštičky pri testovaní inhibície kvasinkového enzýmu metódou č. 1

roztok	vzorka (μl)	kontrolná vzorka (μl)	slepá vzorka (μl)	kontrolná slepá vz. (μl)
50 mM pufer fosforečnanu sodného, pH 8,8	96	96	96	96
ADH _y pracovný roztok 2 μg/ml	9	9	-	-
Rozpúšťadlo enzýmu	-	-	9	9
Roztok testovanej látky	10	-	10	-
Rozpúšťadlo testovanej látky	-	10	-	10

- b) Objemy roztokov použité pri testovaní inhibície konského enzýmu ADH_{eq} zobrazuje **Tab. 4**

Tab. 4 Rozpis roztokov pre prípravu mikrotitračnej doštičky pri testovaní inhibície konského enzýmu metódou č. 1

roztok	vzorka (μl)	kontrolná vzorka (μl)	slepá vzorka (μl)	kontrolná slepá vz. (μl)
100 mM pufer TRIS, pH 9,5	96	96	96	96
ADH _{eq} roztok 10 mg/ml	9	9	-	-
Rozpúšťadlo enzýmu	-	-	9	9
Roztok testovanej látky	10	-	10	-
Rozpúšťadlo testovanej látky	-	10	-	10

Pri testovaní oboch enzýmov sa na koniec do každej jamky pridalo postupne

- 20 μl 96% etanolu
- 100 μl príslušného pufru,
- a nakoniec 45 μl 15 mM β-NAD⁺ roztoku, ktorý spustil reakciu.

5.7.3 Metóda číslo 2- Príprava mikroskúmaviek

Druhá metóda je metódou záložnou, použila sa teda vtedy, ak prvá nebola dostačujúca. Pri testovaní kvasinkovej ADH_y metódou číslo 1 dochádzalo pri vyšších koncentráciách k problémom s rozpustnosťou látok pri pH 8,8, použili sme teda metódu 2.

Pri testovaní konskej ADH_{eq} túto metódu nebolo potrebné využiť.

Postup metódy číslo 2 bol nasledovný:

1. Testované vzorky sa pripravili do mikroskúmaviek objemu 1,5 ml podľa

Tab. 5

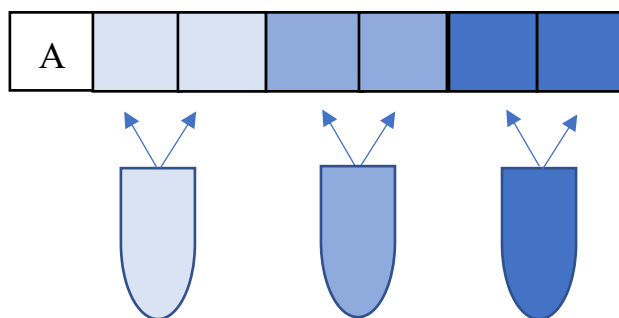
Tab. 5 Rozpis zloženia roztokov pre prípravu vzoriek metódou číslo 2

roztok	vzorka (μl)	kontrolná vzorka (μl)	slepá vzorka (μl)	kontrolná slepá vz. (μl)
50 mM Pufer fosforečnanu sodného, pH 8,8	170	170	170	170
ADH _y pracovný roztok 2 μg/ml	16	16	-	-
Rozpúšťadlo enzýmu	-	-	16	16
Roztok testovanej látky	18	-	18	-
Rozpúšťadlo testovanej látky	-	18	-	18
Etanol 96%	36	36	36	36
50 mM Pufer fosforečnanu sodného, pH 8,8	180	180	180	180

Z každej mikroskúmavky sa odobralo 2 x 180μl roztoku, a preto sa pre každú testovanú vzorku (1-7) pripravili 3 mikroskúmavky;

- skúmavka pre vzorku X^{1,2},
- skúmavka pre vzorku X^{3,4}
- skúmavka pre slepú vzorku X^{1,2}

Takisto sa pripravili 3 mikroskúmavky pre kontrolnú vzorku (kontrolná vz. ^{1,2}, kontrolná vz. ^{3,4}, slepá kontrolná vz. ^{1,2}). pozri **Obr. 28**.



Obr. 28 Schématické vysvetlenie princípu metódy číslo 2; štvorce predstavujú riadok mikrotitračnej doštičky, roztoky jednotlivých mikroskúmaviek sú farebne odlišené.

2. Do jednej jamky sa napipetovalo 180 μl roztoku, pričom každá pripravená mikroskúmavka obsahovala roztok pre 2 jamky na doštičke.
3. Do každej jamky sa pridávalo 35 μl 15 mM $\beta\text{-NAD}^+$ roztoku, čím sa spustila reakcia.

5.7.4 Zmeranie absorbancie

Po pripravení doštičky metódou číslo 1 alebo 2 sa ihneď po napipetovaní $\beta\text{-NAD}^+$ roztoku mikrotitračná doštička vložila do spektrofotometra a merala sa absorbancia pri vlnovej dĺžke 340 nm, pri teplote 25°C. Meranie trvalo vždy 6 minút, 6 hodnôt absorbancie, v intervale 1 minúty.

Princípom zmeny absorbancie v čase je redukcia kofaktoru NAD^+ na NADH, zatiaľ, čo oxidovaná forma má pri vlnovej dĺžke 340 nm takmer nulovú absorbanciu, redukovaná forma vykazuje silnú absorbanciu. Rastúca absorbancia teda rastie so zvyšujúcou sa aktivitou enzýmu (Walker 1992).

5.7.5 Korelácia chelatacie Zn^{2+} a inhibičnej aktivity testovaných látok

Pri vychádzaní z poznatkov, že ADH je metaloenzým, ktorý vo svojej molekule obsahuje zinok, sme predpokladali, že miera inhibičnej aktivity môže súvisieť s mierou chelatačnej aktivity zinočnatých iónov. Na otestovanie pravdivosti tejto hypotézy sme využili korelačnú analýzu týchto dvoch faktorov.

Analýza posudzuje vzájomný vzťah a kvantitatívne vyjadruje silu závislosti určením Pearsonovho korelačného koeficientu. V prípade významnosti sa miera linearity určí pomocou koeficientu determinácie (r^2). Pre výpočet boli použité namerané hodnoty percentuálnej miery inhibičnej aktivity pri najvyššej koncentrácii roztoku testovaných látok, teda pri konskej ADH_{eq} 500 μ M a pri kvasinkovej ADH_y 200 μ M.

Hodnoty *in vitro* chelatačnej aktivity testovaných látok, pozri **Tab. 6**, boli zmerané spektrofotometricky pri fyziologickom pH 7,5 v pomere 100:1 (Nováková, 2020).

Tab. 6 Priemerné hodnoty chelatácie Zn^{2+} testovanými látkami, pH 7,5, chelatačný pomer 100:1.

Testovaná látka	Priemer chelatácie Zn^{2+} (%) ± SD
HQ ^{thi}	0,00 ± 0,00
HQ ^{ph}	36,23 ± 4,60
HQ ^{bn}	4,04 ± 3,71
HQ ^{phpOMe}	19,13 ± 4,16
HQ ^{phptBu}	32,32 ± 3,72
HQ ^{phpNO₂}	8,69 ± 7,80
HQ ^{etCp}	24,88 ± 2,86
HQ ^{naph}	6,21 ± 4,85
H2Q4Q	51,61 ± 2,42
H2Q3Q	39,74 ± 1,89
H2QPy	77,93 ± 1,37

Výsledky prebraté z: Nováková J, 2020

5.8 Matematická a štatistická analýza

5.8.1 Výpočet miery inhibície ADH

Na začiatku výpočtu bolo potrebné odčítať hodnoty priemeru 2 slepých vzoriek (A_{BL1} , A_{BL2}) príslušnej vzorky od hodnôt nameranej absorbancie v čase (A_{VZx}), každá jamka mikrotitračnej doštičky má teda 7 hodnôt absorbancie vždy v čase 0,1,2,3,4,5,6 minút.

$$A_{VZx} - \frac{(A_{BL1} + A_{BL2})}{2} = A_x$$

Z hodnôt absorbancie vypočítanej pre jednotlivé jamky sme vypočítali hodnotu smernice regresnej priamky b , pričom $y = bx + a$,

$b =$ smernica regresnej priamky

$y =$ príslušné hodnoty A_x

$x =$ hodnoty času merania v minútach

$a =$ iniciálna absorbancia vzorky v čase 0, po odčítaní slepých vzoriek,

tento výpočet bolo potrebné vykonať pre každú jamku mikrotitračnej doštičky zvlášť, a teda, pre každú vzorku x 4 príslušné hodnoty $b_1 - b_4$ pomocou funkcie LINEST v programe Excel;

$$b = \frac{\sum(x - \bar{x})(A_x - \bar{A}_x)}{\sum(x - \bar{x})^2}, \text{ kde}$$

$A_x =$ hodnota vypočítanej absorbancie vzorky x v čase

$\bar{A}_x =$ priemer hodnôt absorbancií vzorky x v meraných časoch

$x =$ hodnota času v minútach

$\bar{x} =$ priemer hodnôt času v minútach

Pri každej nameranej vzorke aj kontrolných vzorkách sa následne vypočítal priemer smerníc regresnej priamky b

$$b = \frac{(b_1 + b_2 + b_3 + b_4)}{4}, \text{ kde}$$

b_1, b_2, b_3, b_4 sú hodnoty smerníc regresných priamok štyroch jamiiek mikrotitračnej doštičky jednej vzorky

Percentuálna miera inhibície $-i$ sa vypočítala odčítaním pomeru smernice regresnej priamky a priemeru hodnôt regresných priamok kontrolných vzoriek od 1, násobené 100;

$$i = \left(1 - \left(\frac{b}{b_{kontrola}} \right) \right) \cdot 100$$

$$i = \left(1 - \left(\frac{\frac{(b_1 + b_2 + b_3 + b_4)}{4}}{\frac{(b_{kontrola_1} + b_{kontrola_2})}{2}} \right) \right) \cdot 100, \text{ kde}$$

$b_{kontrola}$ je priemerná kontrolná smernica, vypočítaná ako priemer jednotlivých kontrolných smerníc. Analogicky b je priemerná smernica vzorky vypočítaná ako priemer smerníc jednotlivých jamiiek jednej vzorky.

Výpočty boli vykonané v programe Microsoft Excel 2013.

5.8.2 Štatistická analýza

Výsledky hodnôt inhibície enzymatickej aktivity sú prezentované ako priemer \pm smerodajná odchýlka SD , vypočítaná podľa vzorca

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}, \text{ kde}$$

x = hodnota inhibície

\bar{x} = priemer hodnôt inhibície

n = počet hodnôt inhibície

Inhibičné schopnosti testovaných látok sú graficky znázornené pomocou grafov. Pre porovnanie sú pridané aj krivky 95 % konfidenčných intervalov.

Korelačná analýza bola spracovaná pomocou programu Excel.

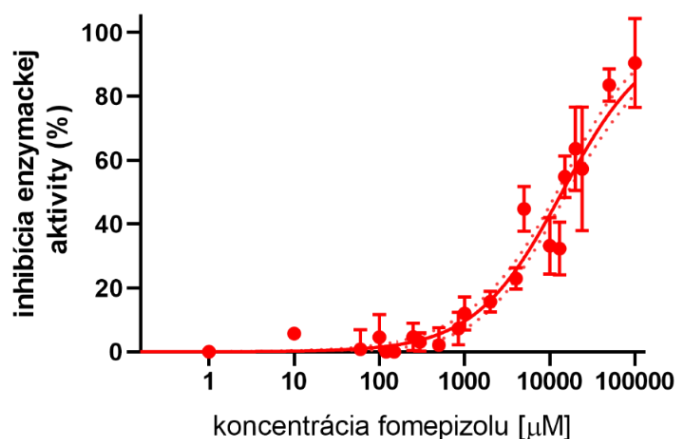
Pearsonov korelačný koeficient r , ktorý je mierou lineárneho vzťahu dvoch premenných, sme vypočítali odmocnením koeficientu determinácie r^2 , ktorý bol vypočítaný z grafu vytvoreného v programe Excel.

$$r = \sqrt{r^2}$$

6 VÝSLEDKY

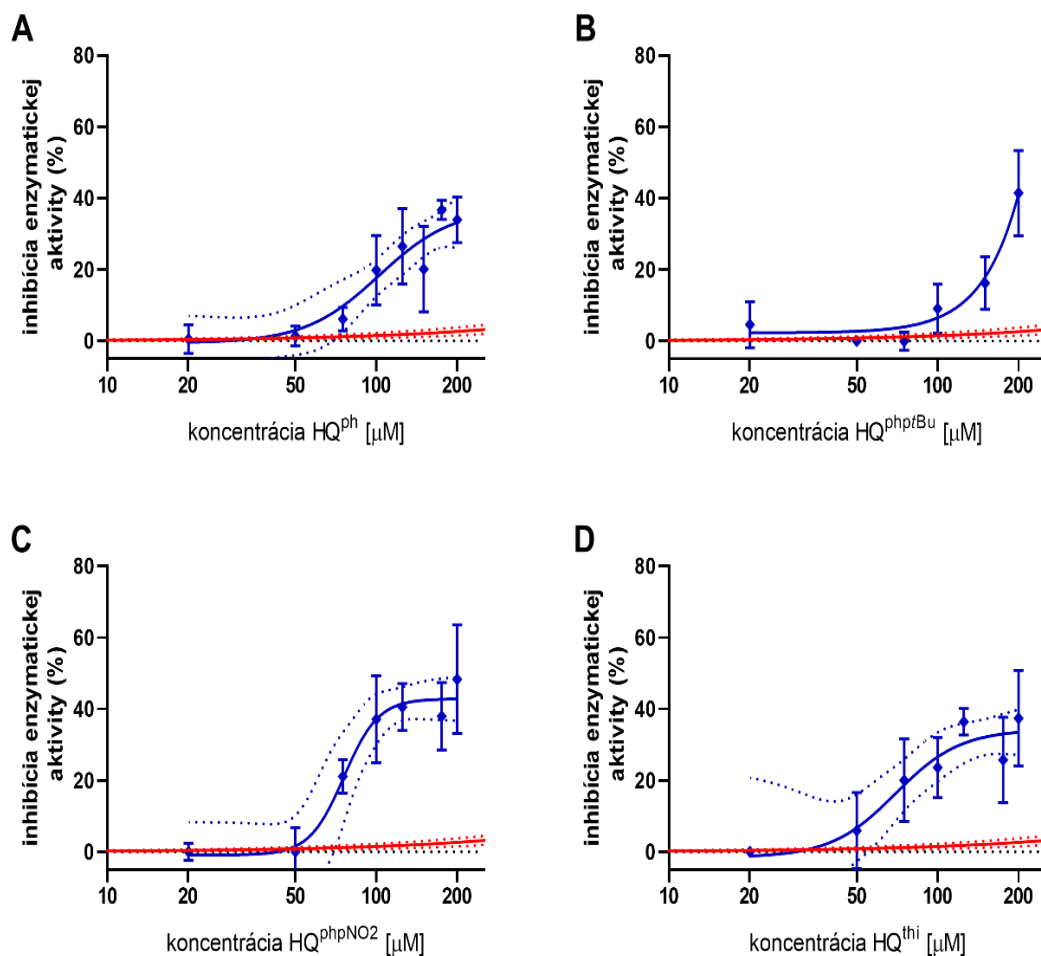
6.1 Výsledky testovania inhibície enzymatickej aktivity kvasinkového enzýmu

Pri testovaní inhibície enzymatickej aktivity kvasinkovej ADH_y sme otestovali 11 látok zo skupiny 4-acyl-5-pyrazolónov a fomepizol. U fomepizolu sme vytvorili podrobnejšiu krivku, pre lepšie zobrazenie jeho aktivity, pozri **Obr. 29**. Táto krivka poskytuje lepšiu predstavu o inhibičnej aktivite testovaných látok, a preto je pre porovnanie zobrazená aj v grafoch výsledkov jednotlivých testovaných látok.



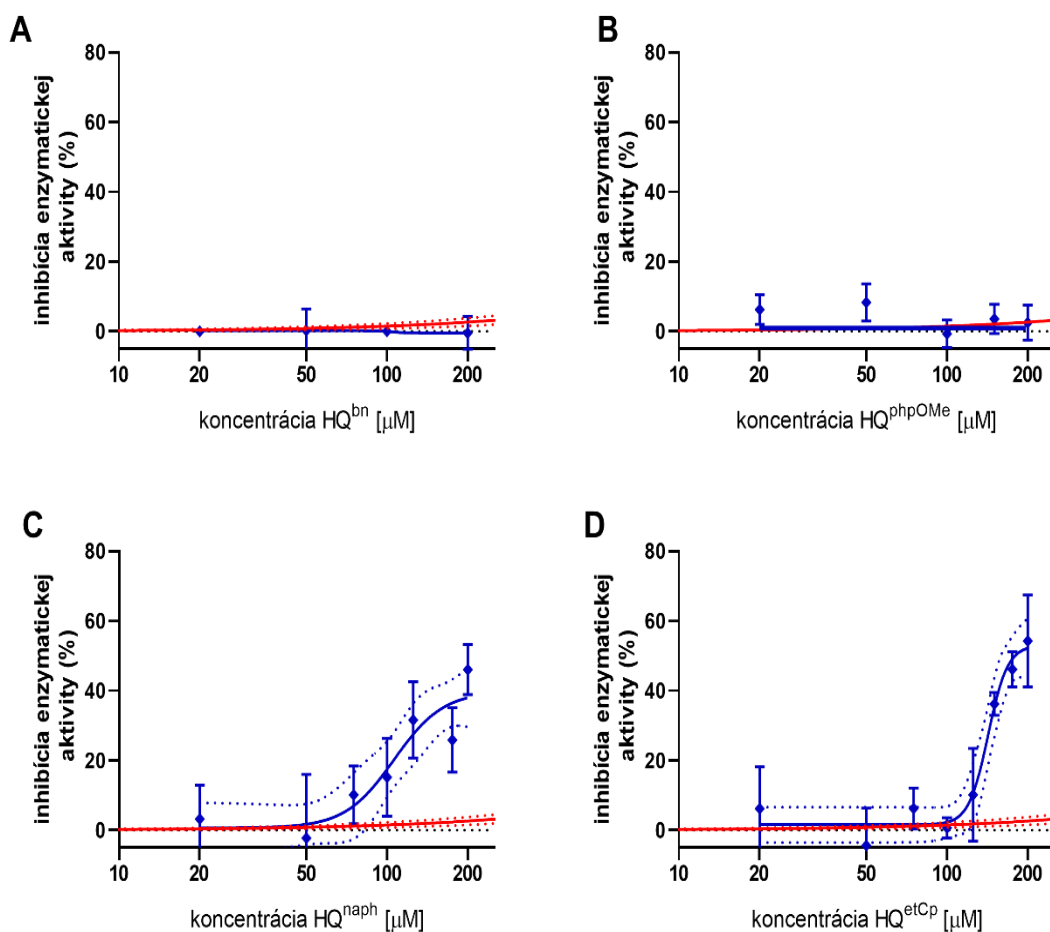
Obr. 29 Graf závislosti percentuálnej miery inhibície enzymatickej aktivity kvasinkovej ADH_y na koncentrácii fomepizolu, klinicky využívaného inhibítora ADH. Okrem inhibičnej krivky je tiež znázornený 95% konfidenčný interval tejto krivky.

Významná miera inhibičnej aktivity bola zistená u šiestich testovaných 4-acyl-5-pyrazolónov; HQ^{ph}, HQ^{phptBu}, HQ^{hpNO₂}, HQ^{thi}, HQ^{etCp}, HQ^{naph}. U látok HQ^{bn}, HQ^{phpOMe}, naopak, nebola zistená žiadna aktivita inhibície ADH_y. U troch látok; H₂QPyQ, H₂Q3Q a H₂Q4Q bola zistená len veľmi malá, zanedbateľná inhibičná aktivita, a aj to len pri vyšších koncentráciách. Grafy závislostí percentuálnej miery inhibície enzymatickej aktivity kvasinkovej alkoholdehydrogenázy na koncentrácií testovaných látok sú zobrazené na **Obr. 30 - Obr. 32**.



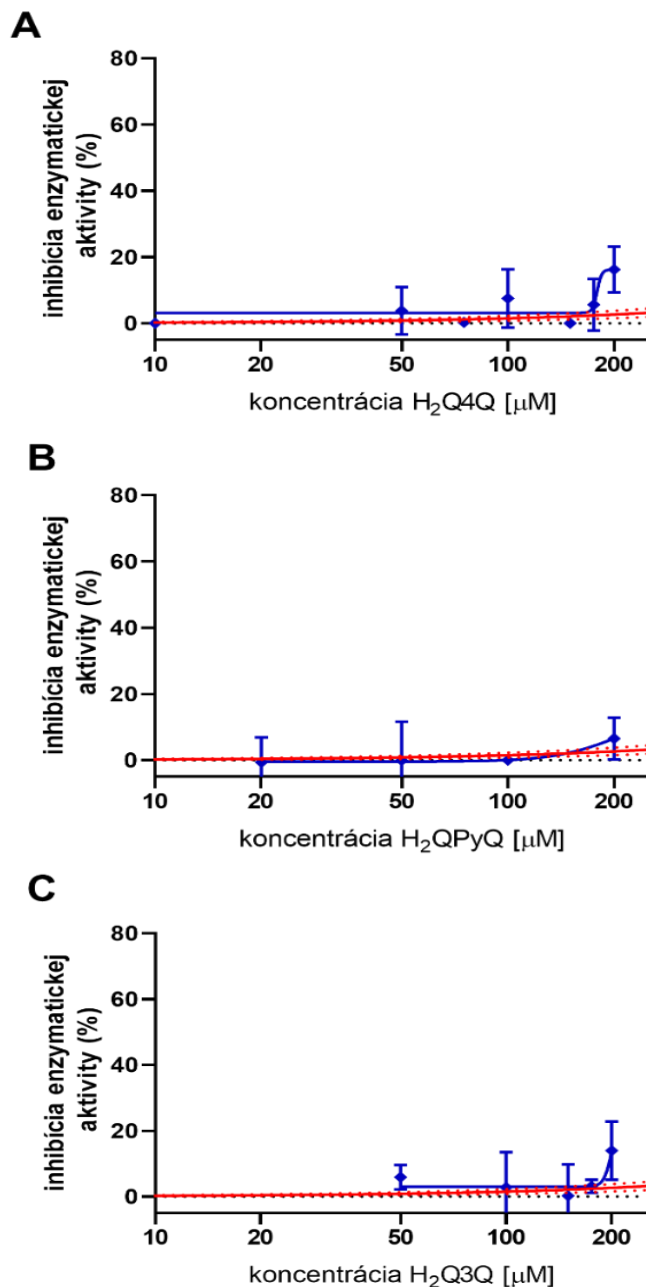
Obr. 30 Graf závislosti percentuálnej miery inhibície enzymatickej aktivity kvasinkovej ADH_y na koncentrácií **A)** HQ^{ph} , **B)** HQ^{phptBu} , **C)** HQ^{phpNO_2} , **D)** HQ^{thi} .

Pre porovnanie sú znázornené aj 95% konfidenčné intervaly. V prípade HQ^{phptBu} program nebol schopný vypočítať konfidenčný interval, zrejme z dôvodu vyššieho rozptylu výsledkov. Krivky testovaných látok sú zobrazené **modrou farbou**, fomepizolu, klinicky využívaného inhibítora ADH **červenou farbou**. Všetky zo 4 zobrazených látok preukázali značnú mieru inhibičnej aktivity ADH_y .



Obr. 31 Graf závislosti percentuálnej miery inhibície enzymatickej aktivity kvasinkovej ADH_y na koncentrácií A) HQ^{bn}, B) HQ^{phpOMe}, C) HQ^{napH}, D) HQ^{etCp}.

Pre porovnanie sú znázornené aj 95% konfidénčné intervaly. Krivky testovaných látok sú zobrazené **modrou farbou**, krivka fomepizolu, klinicky využívaného inhibítora ADH **červenou farbou**. Látky HQ^{bn} a HQ^{phpOMe} nepreukázali žiadnu schopnosť inhibície enzymatickej aktivity, naopak HQ^{napH} a HQ^{etCp} účinne inhibovali enzymatickú aktivitu kvasinkovej ADH_y.



Obr. 32 Graf závislosti percentuálnej miery inhibície enzymatickej aktivity kvasinkovej ADH_y na koncentrácií A) H₂Q4Q, B) H₂QPyQ, C) H₂Q3Q.

Krivky testovaných látok sú zobrazené **modrou farbou**, krivka fomepizolu, využívaného inhibítora ADH je znázornená **červenou farbou**, pre porovnanie sú znázornené aj 95% konfidénčné intervaly. Ani jedna z testovaných látok nepreukázala významnú schopnosť inhibície aktivity kvasinkovej ADH_y až do koncentrácie 100-150 μ l, pri 200 μ l vykazujú inhibičnú aktivitu nižšiu než 20%.

Z vyššie uvedených grafov vyplýva, že pri koncentrácií 200 μM , ktorá bola najvyššou testovanou, vykazuje 5 testovaných látok zo skupiny 4-acyl-5-pyrazolónov; HQ^{ph} , $\text{HQ}^{\text{phptBu}}$, $\text{HQ}^{\text{hpNO}_2}$, HQ^{thi} , HQ^{Naph} , ktoré sú aj štruktúrne veľmi príbuzné, podobne veľkú mieru inhibície enzymatickej aktivity, približne 40%. HQ^{thi} , obsahujúci ako jediný namiesto benzoylového zvyšku thiofén-2-karbonyl, vykazoval začínajúcu mieru inhibície už pri koncentrácií 50 μM . Benzoylový derivát HQ^{ph} reagoval veľmi podobne, až na nižšiu úroveň inhibície pri malých koncentráciách a jej stúpanie bolo teda strmšie, ale oba sa pohybovali pri 35%. Takmer identickú krivku stúpania inhibičnej aktivity má aj HQ^{naph} , ktorý má v štruktúre namiesto benzoylu naftoyl, a pri najvyššej zmeranej koncentrácií inhiboval ADH_y až na 46%.

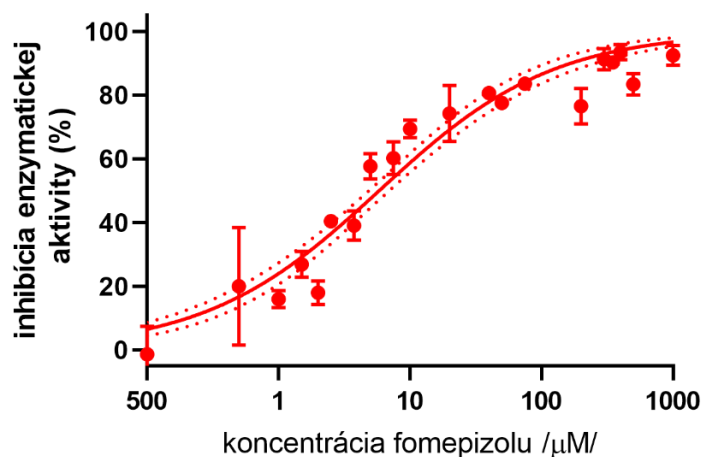
Ďalšie tri látky; $\text{HQ}^{\text{phpNO}_2}$, $\text{HQ}^{\text{phptBu}}$ a $\text{HQ}^{\text{phpOMe}}$, sa štruktúrne líšia iba v substituentu na para polohe benzoylového zvyšku. $\text{HQ}^{\text{HphpNO}_2}$ s polárnou nitro skupinou inhiboval asi 20% enzymatickej aktivity už pri koncentrácií 75 μM a pri 200 μM až 48%, 4-acyl-5-pyrazolón s terciálnym butylom $\text{HQ}^{\text{phptBu}}$ nedosiahol 20% mieru inhibície ani pri koncentrácií 150 μM , ale napriek tomu, pri 200 μM koncentrácií dosiahol inhibičnú úroveň 41%. $\text{HQ}^{\text{phpOMe}}$, ktorý má na para polohe benzoylového zvyšku metoxy skupinu, aj napriek štruktúrnej podobnosti, nevykázal žiadnu mieru inhibície ADH_y . Takisto neúčinný je aj HQ^{bn} , ktorý sa od vyššie uvedených látok líši iba jednou metylénovou skupinou, a teda namiesto benzoylového zvyšku, má na polohe 4 pyrazolónu 2-fenylacetyl.

Látka HQ^{etCp} , jediná obsahujúca cyklopentylpropanoyl, namiesto aromatického substituentu v polohe 4, inhibovala enzymatickú aktivitu až v koncentráciách vyšších ako 100 μM , ale ako jediná z testovaných presiahla hodnotu 50%, konkrétne 54%.

Posledné tri testované látky, obsahujúce v molekule zdvojenú 4-acylpyrazol-5-ónovú štruktúru vykázali pri finálnej koncentrácií 200 μM len veľmi nevýznamnú aktivitu, H_2QPyQ - 6% $\text{H}_2\text{Q3Q}$ - 14% a $\text{H}_2\text{Q4Q}$ - 16%, vyššie koncentrácie látok neboli zmerané, kvôli obmedzenej rozpustnosti testovaných látok.

6.2 Výsledky testovania inhibície enzymatickej aktivity konského enzýmu

Pri testovaní inhibície enzymatickej aktivity konského enzýmu ADH sme tiež otestovali všetkých 11 látok zo skupiny 4-acyl-5-pyrazolónov a fomepizol. Tak ako u kvasinkového enzýmu, aj tu sme pre fomepizol zmerali viac koncentrácií roztoku, pre presnejšie zobrazenie jeho aktivity, pozri **Obr. 33**. Pre porovnanie je táto krivka zobrazená opäť aj v grafoch výsledkov jednotlivých testovaných látok.



Obr. 33 Graf závislosti percentuálnej miery inhibície enzymatickej aktivity konského enzýmu ADH na koncentracii fomepizolu. Okrem inhibičnej krivky je zobrazený aj 95% konfidenčný interval.

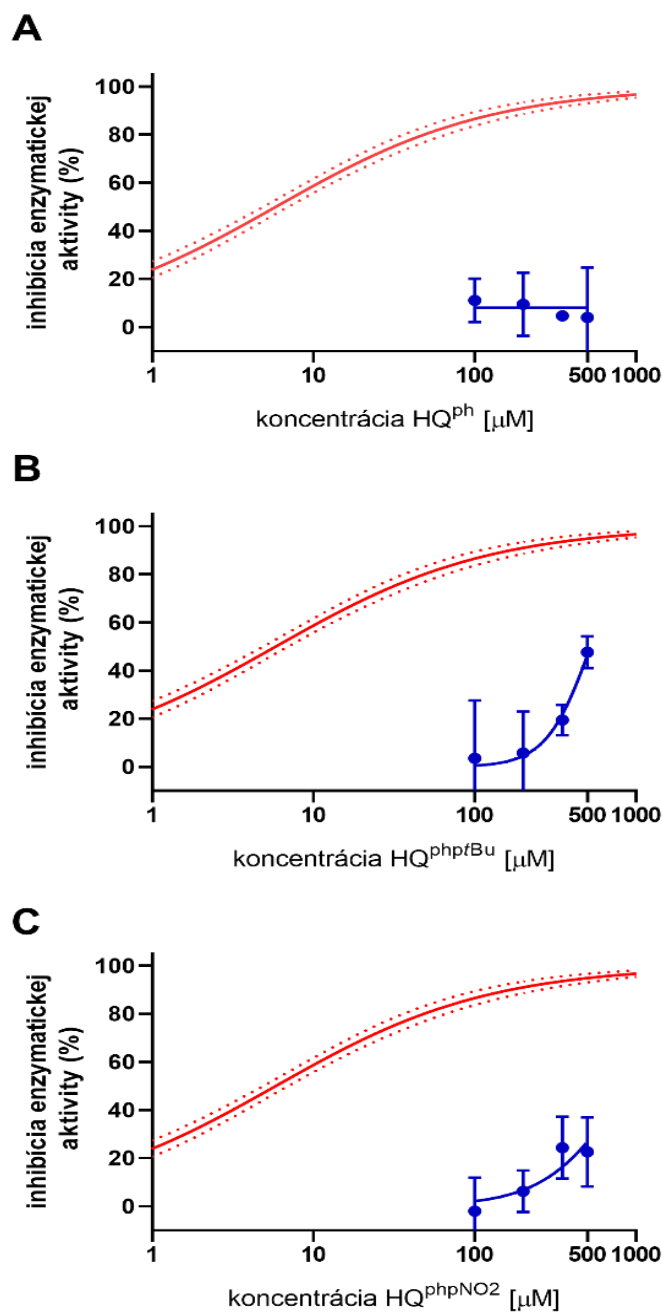
U každej testovanej látky zo skupiny 4-acylpyrazol-5-ónov sme najprv premerali dve koncentrácie; 100 μM a 200 μM . Tieto koncentrácie poslúžili ako screening, pri ktorom sa potvrdil predpoklad, že látky, ktoré nejavili inhibičnú aktivitu kvasinkovej ADH, neinhibovali ani konský enzým.

Látky HQ^{Bn} , $\text{HQ}^{\text{PhpOMe}}$, H_2QPyQ , $\text{H}_2\text{Q3Q}$ a $\text{H}_2\text{Q4Q}$ boli otestované a prvé meranie preukázalo, že nemajú žiadnu schopnosť inhibovať aktivitu konskej ADH (tieto výsledky nie sú zobrazené). Merania ďalších koncentrácií, ani vytváranie grafov závislostí, preto nebolo potrebné a nemalo by zmysel.

Naopak, látky, $\text{HQ}^{\text{phptBu}}$, $\text{HQ}^{\text{phpNO}_2}$, HQ^{thi} , a HQ^{naph} , ktoré inhibovali kvasinkový enzým, preukázali určitú mieru inhibície konskej ADH, pozri **Obr. 34** a **Obr. 35**. HQ^{thi} , 4-acylpyrazol-5-ón s tiofénovým jadrom v štruktúre, sa ukázal ako najúčinnější inhibítor konského enzýmu. Pri koncentracii 500 μM inhiboval enzým na 53%. $\text{HQ}^{\text{phptBu}}$,

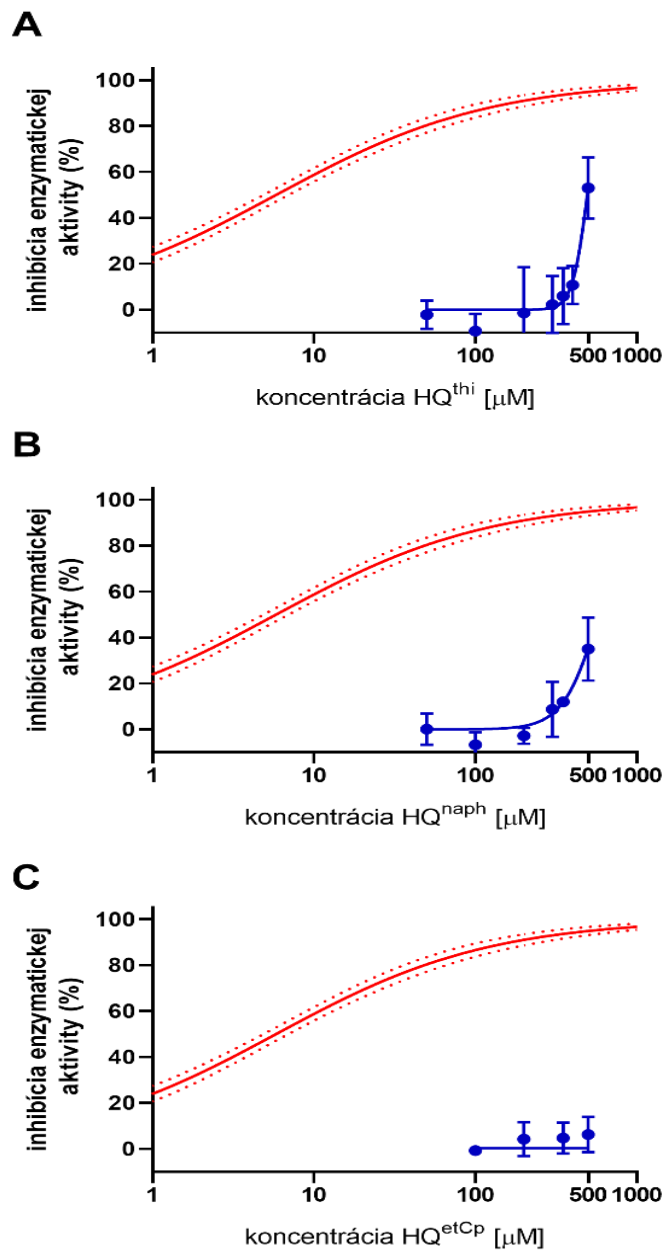
s terciárnym butylom mal podobný, o 6% slabší účinok, ale taktiež sa miera jeho inhibície približovala k 50%. O niečo horšie výsledky mal HQ^{naph} , 4-acylpyrazol-5-ón s naftalénovým jadrom, konkrétne 35% inhibovanej aktivity ADH_{eq} . Najhoršiu mieru inhibície, 23%, preukázal HQ^{phpNO_2} , ktorý sa od účinného HQ^{phptBu} líši iba prítomnosťou nitro skupiny namiesto terciárneho butylu. Naopak, štruktúrne veľmi podobné látky, líšiac sa iba na 4-polohe fenylu HQ^{phpOMe} , či HQ^{ph} neboli účinné vôbec. V tomto prípade ani jedna testovaná látka nebola v miere inhibície účinnejšia ako fomepizol.

Dve látky, HQ^{etCp} a HQ^{ph} , preukazujúce značnú inhibičnú aktivitu u kvasinkového enzýmu neboli u konskej ADH účinné vôbec, respektíve menej ako 10%.



Obr. 34 Graf závislosti percentuálnej miery inhibície enzymatickej aktivity konskej ADH na koncentrácií A) HQ^{ph} , B) HQ^{phpBu} , C) HQ^{phpNO_2} .

Krivky testovaných látok sú zobrazené **modrou farbou**, krivka fomepizolu **červenou farbou**. Pre porovnanie sú znázornené aj 95% konfidénčné intervaly. Všetky látky boli menej účinné ako fomepizol, HQ^{ph} nebol účinný vôbec.



Obr. 35 Graf závislosti percentuálnej miery inhibície enzymatickej aktivity konskej ADH na koncentrácií A) HQ^{thi} , B) HQ^{napH} , C) HQ^{etCp} .

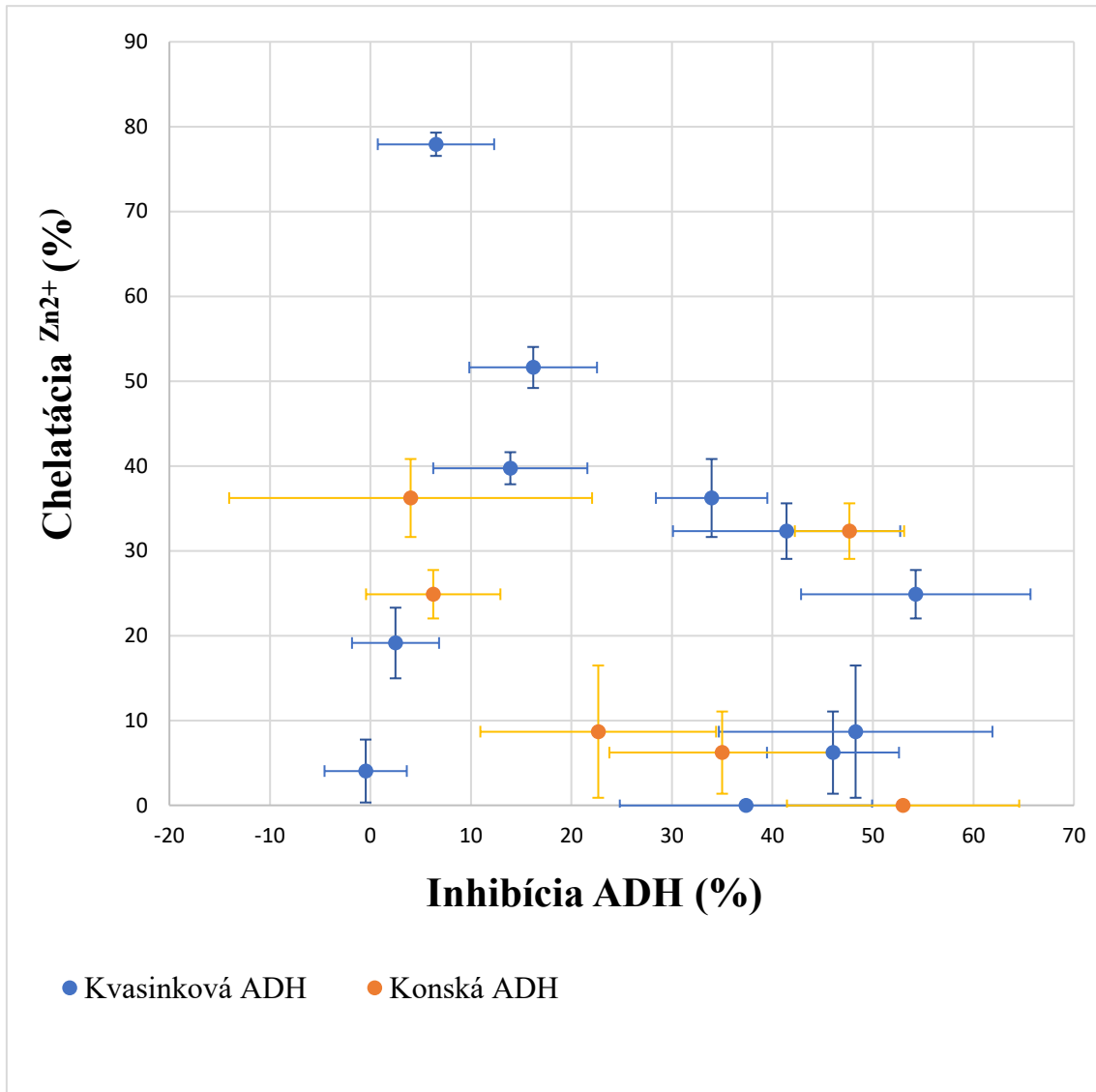
Krivky testovaných látok sú zobrazené **modrou**, krivka fomepizolu **červenou farbou**. Pre porovnanie sú znázornené aj 95% konfidenčné intervaly.. Všetky látky boli menej účinné ako fomepizol, HQ^{etCp} nebol účinný vôbec.

6.3 Výsledky korelácie miery inhibície ADH a chelatácie Zn^{2+} u testovaných látok

Pre posúdenie vzájomného vzťahu medzi mierou chelatácie zinku (%) a mierou inhibičnej aktivity na enzým ADH (%) u jednotlivých testovaných látok sme štatisticky spracovali výsledky oboch sledovaných faktorov.

Pri analyzovaní výsledkov testovania kvasinkovej ADH a korelácie s hodnotami chelatačnej účinnosti testovaných 4-acylpyrazol-5-ónov Pearsonov koeficient dosiahol hodnotu $r = -0,35$ a koeficient determinácie $r^2 = 0,12$. Pri analýze výsledkov testovania konského enzýmu a chelatačnej schopnosti boli výsledky nasledovné, $r = -0,51$ a $r^2 = 0,26$. Keďže Pearsonov koeficient vyšiel v oboch prípadoch v negatívnych hodnotách, predpoklad, že miera chelatácie by mohla súvisieť s mierou inhibovať ADH, či už konskú alebo kvasinkovú, je nesprávny. Navyše, zo štatistického hľadiska nebol tento vzťah lineárny. Pre konský enzým je p-hodnota rovná 0,30, pre kvasinkový enzým $p = 0,29$. Vysoké hodnoty p-hodnoty dokazujú, že hypotéza, ktorá predpokladá, že miera chelatácie koreluje s mierou inhibície enzýmu, nie je pravdivá.

Korelačná analýza hodnôt premenných percentuálnej miery inhibície ADH a percentuálnej miery chelatácie zinku u testovaných látok teda dokázala, že medzi skúmanými veličinami neexistuje štatistická závislosť, čo môžeme vidieť aj na **Obr. 36**. Nepotvrdilo sa teda, že schopnosť látok chelatovať zinok korešponduje s ich inhibičnou aktivitou.



Obr. 36 Graf závislosti percentuálnej miery chelatácie zinočnatých iónov na percentuálnej miere inhibície aktivity alkoholdehydrogenázy, smerodajné odchýlky sú zobrazené pomocou chybových úsečiek.

Hodnoty miery chelatácie Zn²⁺ prebraté z: Nováková (2020)

7 DISKUSIA

Alkoholdehydrogenáza je metaloenzým, ktorý obsahuje vo svojom aktívnom mieste atóm zinku. Po naviazaní koenzýmu NAD^+ , sa enzým stáva aktívnym a schopným plniť funkciu reduktázy - katalyzovať oxidáciu alkoholov. Zinok zohráva veľmi dôležitú funkciu v samotnom účinku. Priamo naň sa naviaže najskôr molekula vody, čím vzniká záporný čiastkový náboj, čo napomáha naviazaniu pozitívne nabitého nikotínamidového kruhu. Potom molekulu vody vystrieda vo väzbe k zinku molekula alkoholu a až následne je redukovaná na príslušný aldehyd. Zinok stabilizuje kyslíkový atóm v molekule alkoholu, a tým zvyšuje aciditu hydroxy skupiny. Za týchto podmienok je uľahčený samotný transfer protónu a hydridového aniónu (Torres a Ayala 2013).

Skupina 11 látok, zo skupiny 4-acylpyrazol-5-ónov, ktoré sme testovali, preukázali určitú schopnosť chelatácie zinočnatých iónov (Nováková 2020). Na základe týchto faktov sme predpokladali, že dané látky by mohli mať schopnosť inhibovať ADH, vo funkcii ktorej zohráva zinok dôležitú úlohu a miera inhibície by mohla s chelatačnou schopnosťou korelovať.

Pri štruktúrnej analýze molekuly, po naviazaní testovaných látok na zinočnaté ióny, bolo preukázané, že testované 4-acylpyrazol-5-óny majú svoje chelatačné účinky vďaka dvom keto skupinám, ktoré sú donormi elektrónov a zúčastňujú sa na komplexnej väzbe so zinočnatým kationómom. Molekula má tvar pyramídy so štvorcovou podstavou. Komplexné číslo zinku je 5 a tvorí väzbu s 2 molekulami 4-acyl-5-pyrazolónov a 1 molekulou vody v apikálnej pozícii (Mickler et al.1998).

Toto usporiadanie komplexnej väzby k zinku odpovedá výsledkom *Novákovej* (2020), ktoré ukázali, že žiadna z látok s jednoduchou štruktúrou nedokázala chelatovať Zn^{2+} na viac ako 50%, naproti tomu látky so zdvojenými molekulami (H_2QPyQ , $\text{H}_2\text{Q3Q}$ a $\text{H}_2\text{Q4Q}$) áno. Takisto korešponduje s výsledkom našej analýzy, že schopnosť chelatovať Zn^{+2} a inhibovať ADH vzájomne nekorelujú, nakoľko tieto testované látky s diketo štruktúrou preukázali len veľmi malú alebo žiadnu mieru inhibície.

Faktom je, že bez pokročilej analýzy spôsobu naviazania 4-acylpyrazol-5-ónov na ADH môžeme len predpokladať, akým spôsobom tieto látky s enzýmom interagovali. Ak berieme do úvahy výsledky korelácie, látky zrejme inhibujú enzým iným mechanizmom, ktorý by mohol byť vhodným smerom pre budúci výskum iných odvodených látok. Je

možné, že dostať sa až k zinku v katalytickom mieste enzýmu, neumožnila týmto látkam ich štruktúra. V každom prípade, naše testované látky dosiahli významné hodnoty inhibície až pri vysokých koncentráciách, a tak sa ich terapeutické použitie nejaví ako reálne.

Štruktúrne jednoduchšie, ale príbuzné, substituované pyrazoly, boli v minulosti testované ako potencionálne kompetitívne inhibítory ADH. Pri kryštalografickej analýze sa zistilo, že tvoria veľmi silný komplex s enzýmom a sú teda účinné inhibítory. Jeden z dusíkov pyrazolu sa viaže na aktívne miesto, priamo na zinok, a druhý dusík sa viaže na NAD^+ a väzbou vytvára „most“ medzi aktívnym miestom a kruhom nikotínamidu. Takisto boli preskúvané aj štruktúrne obmeny pyrazolov, a to nasledovne: substituenty 3 pyrazolu vykazujú interakciu so zinkom a substituenty na polohe 5 interagujú s koenzýmom. A predovšetkým, 4 substitúcia hydrofóbnym substituentom prispieva k naviazaniu a zapadá do hydrofóbného tunelu v mieste naviazania substrátu (Eklund 1983).

V tomto prípade, pri porovnaní štruktúry látok môžeme predpokladať, že testované 4-acylpyrazol-5-óny sa neviazali na molekulu enzýmu týmto spôsobom. Štruktúrne podobným rysom je samotný pyrazol a objemný, hydrofóbný substituent na 4-polohe pyrazolu. Pri porovnaní celkovej štruktúry molekúl však musíme predpokladať, že keto skupina na 3 polohe by takejto väzbe zabránila, takisto aj fenylový zvyšok na 2N, ktorý obmedzuje jeho väzbovosť.

Ďalším inhibítorom s preskúmanou väzbou je N-cyklohexylformamid. Bol testovaný iba na enzýme z myši, ale pri malej medzidruhovej variabilite je možné pracovať aj s týmito dátami. Na prvý pohľad je veľmi odlišný, ale jeho komplexná väzba karbonylového kyslíka komplexnou väzbou priamo k zinku aktívneho miesta enzýmu, ďalej stabilizujúca kation- π interakcia dusíka s okolitými benzénovými jadrami, by mohli so štruktúrou nami testovaných látok korešpondovať (Svensson et al. 2000).

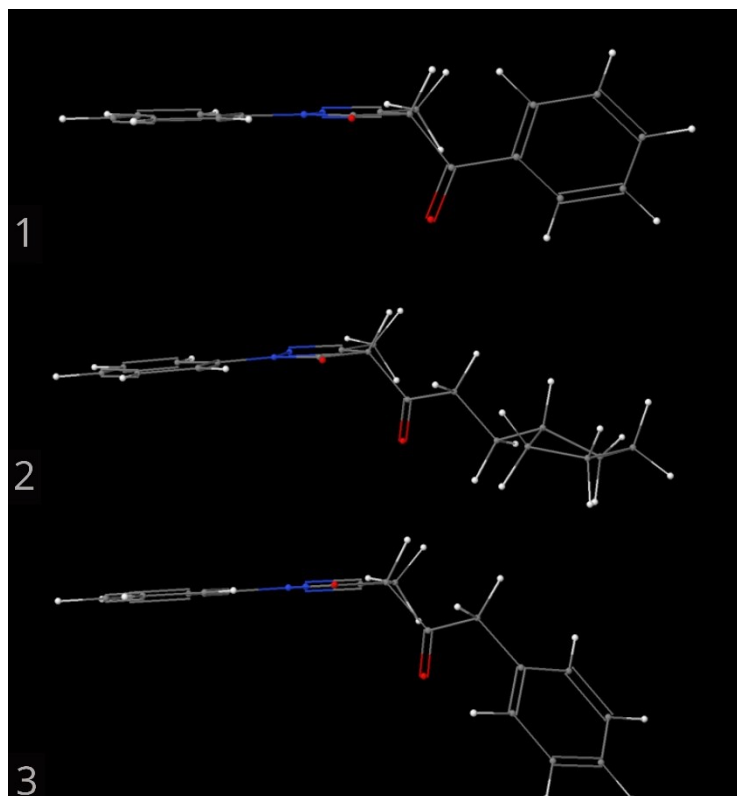
Podobne ako cyklohexylformamid, kedy jeden z kyslíkov predstavuje ligand pre zinok aktívneho miesta, sa k aktívnemu miestu ľudskej ADH viaže aj salicylát. Vďaka molekulovému modelovaniu sa podarilo predpokladať spôsob jeho naviazania k enzýmu. Karboxylový kyslík sa viaže komplexnou väzbou priamo k zinku, zatiaľ čo vodík hydroxylovej skupiny salicylátu tvorí vodíkovú väzbu s karbonylovým kyslíkom nikotínamidového kruhu molekuly NAD^+ (Lee et al. 2015).

Na druhú stranu, alternatívou pre väzbu je aj dvojitá koordinačná väzba k aktívnemu miestu a vytvorenie zinku s koordinačným číslom 5, tak ako bolo preukázané u 2,2'-bipyrdínu a 1,10-fenantrolínu, ktoré sú oba účinnými chelátormi, avšak schopnosť ich inhibičnej aktivity nie je známa. Rozdielom vo väzbe týchto molekúl k aktívnemu miestu oproti iným vyššie spomenutým štruktúram je, že tieto chelátory sa viazali na samotný apoenzým bez kofaktoru (Plapp et al. 2017).

Ak by sme uvažovali o interakcií s enzýmom týmto spôsobom, znamenalo by to, že inhibícia enzymatickej aktivity a chelatácia Zn^{2+} prebehli zhodným spôsobom koordinačnej väzby diketo skupiny. Nekorelujúci vzťah medzi mierou chelatácie a inhibície oboch enzýmov by v takom prípade bol zapríčinený hlavne priestorovým bránením štruktúr enzýmu v naviazaní molekuly inhibítora. Pre lepšie pochopenie súvislostí a spôsobu interakcie, by bolo potrebné v budúcnosti upriamiť smer výskumu na molekulové modelovanie, či priamo kryštalografickú analýzu komplexu testovaných látok s enzýmom.

Odhliadnuc od spôsobu naviazania inhibítora na aktívne miesto enzýmu sa dá z našich výsledkov odvodiť, že zlúčeniny so zdvojenou 4-acylpyrazol-5-ónovou štruktúrou, nie sú vhodné ako inhibítory ADH. Dá sa predpokladať, že zdvojená štruktúra je priestorovo príliš veľká a bráni v naviazaní molekuly na enzým.

Pri jednoduchých štruktúrach sa dá predpokladať, že polarita substituentu na 4-polohe benzoylového zvyšku nehrá veľkú úlohu. HQ^{phpNo_2} derivát s polárnou nitro skupinou inhiboval ADH porovnateľne ako HQ^{naph} , obsahujúci iba nepolárne naftalénové jadro či HQ^{phptBu} s terciárnym butylom. Väčšiu pozornosť je zrejme potrebné venovať konformácií molekúl, kedy sa pri pridaní jednej metylénovej skupiny k HQ^{ph} príliš zmení uhol a v molekule látky HQ^{bn} sa inhibičná schopnosť úplne vytratí. Na druhej strane, látka, ktorá neobsahuje v 4-acylovom substituentu konjugované jadro, HQ^{etCP} , sa u kvasinkového enzýmu ukázala ako účinný inhibítor. Pri porovnaní konformácie molekúl je vidieť, že pod najväčším uhlom je práve molekula HQ^{bn} , a benzénové jadro substituentu na 4 polohe pyrazolónu zaberá v priestore najväčší objem, pozri **Obr. 37**.



Obr. 37 Porovnanie štruktúry látok v priestore 1) HQ^{ph} 2) HQ^{etCP} 3) HQ^{bn} z vyššie uvedených vzorcov je zrejme, že všetky tri štruktúry majú pyrazolónové a benzénové jadro v jednej planárnej rovine, ale substituent na 4- polohe pyrazolónu vystupuje do priestoru najviac práve u 3, HQ^{bn} , u ktorej sa vytratila inhibičná aktivita.

Vytvorené vo webovej aplikácii: MolView, v2.4

Zaujímavým výsledkom je však fakt, že HQ^{etCP} , ktorý sa ukázal ako najúčinnjší inhibítor kvasinkového enzýmu, s 54% mierou inhibície, konštruktívne ADH_{eq} inhiboval iba na zanedbateľných 6%. Môžeme len odhadovať, že o tomto rozdielnom výsledku zrejme rozhodla medzidruhová variabilita enzýmov.

Z hľadiska konformácie molekuly je odlišným aj neúčinný HQ^{phOMe} , ktorý sa takisto líši iba para substituentom na benzoylovom zvyšku, kde methoxy skupina spôsobuje, že ani fenylyl a pyrazolón nie sú v jednej planárnej rovine.

8 ZÁVER

Táto diplomová práca dokázala, že vybrané látky zo skupiny 4-acylpyrazol-5-ónov dokážu inhibovať alkoholdehydrogenázu. V porovnaní s fomepizolom, klinicky využívaným inhibítorom ADH, preukázalo pri inhibícii kvasinkového enzýmu 6 látok (HQ^{ph} , HQ^{phptBu} , HQ^{hpNO_2} , HQ^{thi} , HQ^{etCP} a HQ^{naph}) dokonca vyššiu aktivitu, ako samotný inhibítor. Pri testovaní vyššej koncentrácie konského enzýmu boli účinnými inhibítormi iba 4 látky (HQ^{phptBu} , HQ^{phNO_2} , HQ^{thi} , a HQ^{naph}), ktoré inhibovali aj kvasinkový enzým, avšak žiadna z nich nedokázala inhibovať enzým tak účinne, ako fomepizol.

Okrem toho sme na základe korelačnej analýzy zistili, že miera inhibície ADH a miera chelatacie Zn^{2+} iónov vzájomne nekorelujú, a teda inhibícia a chelatacia prebieha pravdepodobne odlišným mechanizmom.

Na záver sa dá všeobecne skonštatovať, že testované látky zo skupiny 4-acylpyrazol-5-ónov sa z dôvodu nízkej účinnosti inhibície ADH nejavia ako vhodné inhibítory. Na druhej strane, je možné, že optimalizáciou ich štruktúry by bolo možné pripraviť aktívnejšie inhibítory.

9 ZDROJE

Baker JP, Britton KL, Fisher M, Esclapez J, Pire C, Bonete MJ, Ferrer J, Rice DW. Active site dynamics in the zinc-dependent medium chain alcohol dehydrogenase superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(3):779-784.

Baud FJ, Bismuth C, Garnier R, Galliot M, Astier A, Maistre G, Soffer M. 4-Methylpyrazole may be an alternative to ethanol therapy for ethylene glycol intoxication in man. *J Toxicol Clin Toxicol* 1986;24(6):463-483.

Benek O, Musílek K, Kuca K. Mitochondriální enzym ABAD a jeho role v rozvoji a léčbě Alzheimerovy nemoci. *Ceska Slov Farm* 2012;61(4):144-9.

Bestic M, Blackford M, Reed M. Fomepizole: A Critical Assessment of Current Dosing Recommendations. *J Clin Pharmacol* 2009;49(2):130-137.

Boyer EW, Mejia M, Woolf A, Shannon M. Severe ethylene glycol ingestion treated without hemodialysis. *Pediatrics* 2001;107(1):172–173.

Brändén CI, Jürnvall H, Eklund H, Furugren B. 3 Alcohol Dehydrogenases. *The Enzymes*, Vol 11th. London: Elsevier. 1975: p.103–190.

Brent J, McMartin K, Phillips S, Aaron C, Kulig K. Fomepizole for the treatment of methanol poisoning. *N Engl J Med* 2001; 344(6):424–429.

Cederbaum AI. Alcohol Metabolism. *Clin Liver Dis* 2012; 16(4): 667–685.

Crabb DW, Matsumoto M, Chang D, You M. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proc Nutr Soc* 2004; 63(1):49–63.

Edenberg HJ. The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. *Alcohol Res Health* 2007;30(1):5-13.

Edenberg HJ, Bosron WF. Alcohol Dehydrogenases. In *Comprehensive Toxicology*. 3th ed. Vol. 10. Oxford: Elsevier, 2018: p.126-145.

Eklund H. Structural studies of horse liver alcohol dehydrogenase: Coenzyme, substrate and inhibitor binding. *Pharmacol Biochem Behav* 1983;18 Suppl 1:73–81.

El-Bakary AA, El-Dakrory SA, Attalla SM, Hasanein NA, Malek HA. Ranitidine as an alcohol dehydrogenase inhibitor in acute methanol toxicity in rats. *Hum Exp Toxicol* 2010;29(2):93-101.

Filipský T, Mladěnka P, Macáková K, Hrdina R, Saso L, Marchetti F, Pettinari C. In vitro characteristics of 1-phenyl-3-methyl-4-acylpyrazol-5-ones iron chelators. *Biochimie* 2012;94(1): 125-131.

Gugler R. H₂-antagonists and alcohol. Do they interact? *Drug Saf* 1994;10(4):271-80.

Haseba T, Ohno Y. A new view of alcohol metabolism and alcoholism--role of the high-K_m Class III alcohol dehydrogenase (ADH3). *Int J Environ Res Public Health* 2010;7(3):1076-92.

Höög JO, Hedberg JJ, Strömberg P et al. Mammalian alcohol dehydrogenase — Functional and structural implications. *J Biomed Sci* 2001;8(1):71–76.

Höög JO, Ostberg LJ. Mammalian alcohol dehydrogenases--a comparative investigation at gene and protein levels. *Chem Biol Interact* 2011;191(1-3):2-7.

Jacobsen D, Sebastian CS, Barron SK, Carriere EW, McMartin KE. Effects of 4-methylpyrazole, methanol/ethylene glycol antidote, in healthy humans. *J Emerg Med* 1990;8(4):455–461.

Jelski W, Szmitkowski M. Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the cancer diseases. *Clin Chim Acta* 2008;395(1-2):1-5.

Jiang Y, Zhang T, Kusumanchi P, Han S, Yang Z, Liangpunsakui S. Alcohol Metabolizing Enzymes, Microsomal Ethanol Oxidizing System, Cytochrome P450 2E1, Catalase, and Aldehyde Dehydrogenase in Alcohol-Associated Liver Disease. *Biomedicines* 2020;8(3):50

Jobard E, Harry P, Turcant A, Roy PM, Allain P. 4-Methylpyrazole and hemodialysis in ethylene glycol poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol* 1996;34(4):373–377.

Jörnvall H, Eklund H, Brändén CI. Subunit conformation of yeast alcohol dehydrogenase. *J Biol Chem* 1978;253(23):8414-8419.

Jörnvall H, Hedlund J, Bergman T, Kallberg Y, Cederlund E, Persson B. Origin and evolution of medium chain alcohol dehydrogenases. *Chem Biol Interact* 2013;202(1-3):91–96.

Karlsson A, El-Ahmad M, Johansson K, Shafiqad J, Jörnvall H, Eklund H, Ramaswamy S. Tetrameric NAD-dependent alcohol dehydrogenase. *Chem Biol Interact* 2003;143-144:239-245.

Kleifeld O, Frenkel A, Martin JML, Sagi I. Active site electronic structure and dynamics during metalloenzyme catalysis. *Nat Struct Biol* 2003;10(2):98–103.

Lai CL, Li YP, Liu CM, Hsieh HS, Yin SJ. Inhibition of human alcohol and aldehyde dehydrogenases by cimetidine and assessment of its effects on ethanol metabolism. *Chem Biol Interact* 2013;202(1-3):275-82.

Lee SL, Lee YP, Wu ML, Chi YC, Liu CM, Lai CL, Yin SJ. Inhibition of human alcohol and aldehyde dehydrogenases by aspirin and salicylate: Assessment of the effects on first-pass metabolism of ethanol. *Biochem Pharmacol* 2015;95(1):71–79.

Lee SL, Shih HT, Chi YC, Li YP, Yin SJ. Oxidation of methanol, ethylene glycol, and isopropanol with human alcohol dehydrogenases and the inhibition by ethanol and 4-methylpyrazole. *Chem Biol Interact* 2011;191(1-3):26-31.

Lee YP, Liao JT, Cheng YW, Wu TL, Lee SL, Liu JK, Yin SJ. Inhibition of human alcohol and aldehyde dehydrogenases by acetaminophen: Assessment of the effects on first-pass metabolism of ethanol. *Alcohol* 2013;47(7):559-65.

MacKintosh RW, Fewson CA. Microbial aromatic alcohol and aldehyde dehydrogenases, in: *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*. Weiner H, Flynn TG (Editors). Alan R. Liss: New York, 1987: p.259-273.

Marchetti F, Pettinari C, Pettinari R. Acylpyrazolone ligands: synthesis, structures, metal coordination chemistry and applications, *Coordination Chem Rev* 2005; 249:2909-2945.

McMartin KE, Sebastian CS, Dies D, Jacobsen D. Kinetics and metabolism of fomepizole in healthy humans. *Clin Toxicol (Phila)* 2012;50(5):375-83.

Meijers R, Morris RJ, Adolph HW, Merli A, Lamzin VS, Cedergren-Zeppezauer ES. On the enzymatic activation of NADH. *J Biol Chem* 2001;276(12):9316-21.

Mickler W, Reich A, Sawusch S, Schilde U, Uhlemann E. Aquabis(3-methyl-4-octanoyl-1-phenyl-5-pyrazolonato-O,O')zinc(II) and Bis(ethanol-O)bis(3-methyl-1-phenyl-4-stearoyl-5-pyrazolonato-O,O')cadmium(II). *Acta Crystallogr C Cryst Str* 1998;54(6):776–779.

Morsy A, Trippier PC. Amyloid-Binding Alcohol Dehydrogenase (ABAD) Inhibitors for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J Med Chem* 2019;62(9):4252-4264.

Mycyk MB, Leikin JB. Antidote review: fomepizole for methanol poisoning. *Am J Ther* 2003;10(1):68-70.

Nishihama S, Hirai T, Komasa I. Review of Advanced Liquid–Liquid Extraction Systems for the Separation of Metal Ions by a Combination of Conversion of the Metal Species with Chemical Reaction. *Ind Eng Chem Res* 2001;40(14):3085–3091.

Nováková J. Zinek-chelatační aktivita vybraných nových chelátorů ze skupiny 4-acylpyrazol-5-onů. *Farmakologie, rigorózná práca*. Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, 2020.

Östberg LJ, Persson B, Höög JO. Computational studies of human class V alcohol dehydrogenase - the odd sibling. *BMC Biochem* 2016;17(1):16.

Palmer RH, Frank WO, Nambi P, Wetherington JD, Fox MJ. Effects of various concomitant medications on gastric alcohol dehydrogenase and the first-pass metabolism of ethanol. *Am J Gastroenterol* 1991;86(12):1749-1755.

Pettinari C, Marchetti F, Drozdov A. β -Diketones and Related Ligands. In: McCleverty JA, Meyer TY. *Comprehensive Coordination Chemistry II: From Biology to Nanotechnology*. 2nd ed. Vol 1. Amsterdam: Elsevier, 2003: p. 97-115.

Plapp BV. Conformational changes and catalysis by alcohol dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 2010;493(1):3-12.

Plapp BV, Charlier HA, Ramaswamy S. Mechanistic implications from structures of yeast alcohol dehydrogenase complexed with coenzyme and an alcohol. *Arch Biochem Biophys* 2016;591: 35–42.

Plapp BV, Savarimuthu BR, Ferraro DJ, Rubach JK, Brown EN, Ramaswamy S. Horse Liver Alcohol Dehydrogenase: Zinc Coordination and Catalysis. *Biochemistry* 2017;56(28):3632-3646.

Raj SB, Ramaswamy S, Plapp BV. Yeast Alcohol Dehydrogenase Structure and Catalysis. *Biochemistry* 2014;53(36):5791–5803.

Reid MF, Fewson CA. Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit Rev Microbiol* 1994;20(1): 13–56.

Riordan SM, Williams R. Alcohol exposure and paracetamol-induced hepatotoxicity. *Addict Biol* 2002;7(2): 191–206.

Roine R, Gentry RT, Hernández-Munõz R, Baraona E, Lieber CS. Aspirin increases blood alcohol concentrations in humans after ingestion of ethanol. *JAMA* 1990;264(18):2406–2408.

Sellés Vidal L, Kelly CL, Mordaka PM, Heap JT. Review of NAD(P)H-dependent oxidoreductases: Properties, engineering and application. *Biochim Biophys Acta Proteom* 2018;1866(2):327-347.

Svensson S, Höög JO, Schneider G, Sandalova T. Crystal structures of mouse class II alcohol dehydrogenase reveal determinants of substrate specificity and catalytic efficiency. *J Mol Biol* 2000;302(2):441-453.

Theorell H, Yonetani T, Sjöberg B. On the effects of some heterocyclic compounds on the enzymic activity of liver alcohol dehydrogenase. *Acta Chem Scand* 1969;23(1):255-60.

Tolstrup J, Nordestgaard B, Rasmussen S, Tybjaerg-Hansen A, Grønbaek M. Alcoholism and alcohol drinking habits predicted from alcohol dehydrogenase genes. *Pharmacogenomics J* 2008;8(3): 220–227.

Torres E, Ayala M. Biocatalysis by Metalloenzymes. In: Comprehensive Inorganic Chemistry II. 2nd edition. Vol. 2. London: Elsevier; 2013: p. 685–735.

Walker JRL. Spectrophotometric determination of enzyme activity: Alcohol dehydrogenase (ADH). Biochem Educ 1992;20(1):42-43.

Weinberg DS, Burnham D, Berlin JA. Effect of histamine-2 receptor antagonists on blood alcohol levels: a meta-analysis. J Gen Intern Med 1998;13(9):594-599.

Zheng YG, Yin HH, Yu DF, Chen X, Tang XL, Zhang XJ, Xue JP, Wang YJ, Liu ZQ. Recent advances in biotechnological applications of alcohol dehydrogenases. Appl Microbiol Biotechnol 2017;101(3):987–1001.

Elektronické zdroje

David Goodsell. Molecule of the month; Alcoholdehydrogenase. In: web page Protein Data Bank (PDB-101). Dostupné na <http://pdb101.rcsb.org/motm/13>, prístup: 23.11.2020

National Poison Data System, American Association of Poison Control Centers. Hand Sanitizers. In: web page American Association of Poison Control Centers. Dostupné na <https://aapcc.org/track/hand-sanitizer>, prístup: 20.1.2021