MASARYKOVA UNIVERZITA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA

Vývoj a optimalizace analytické metody pro hodnocení aktivity inhibitorů karboanhydrázy

Diplomová práce

DANIELA ŠILHAVÁ

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Ing. Radka Opatřilová, Ph.D., MBA

Ústav chemických léčiv
Program Farmacie

Brno 2025

MUNI
PHARM

Bibliografický záznam

Autor: Daniela Šilhavá
Farmaceutická fakulta
Masarykova univerzita
Ústav chemických léčiv

Název práce: Vývoj a optimalizace analytické metody pro hodnocení aktivity inhibitorů karboanhydrázy

Studijní program: Farmacie

Vedoucí práce: doc. PharmDr. Ing. Radka Opatřilová, Ph.D., MBA

Rok: 2025

Počet stran: 116

Klíčová slova: karboanhydráza, inhibitory karboanhydráz, sulfathiazol, 1,3,5-triazin, UV/Vis spektrofotometrie, fenolová červeň, bromthymolová modř

Bibliographic record

Author: Daniela Šilhavá
Faculty of Pharmacy
Masaryk University
Department of Chemical Drugs

Title of Thesis: Development and Optimization of an Analytical Method for Evaluating the Activity of Carbonic Anhydrase Inhibitors

Degree Programme: Pharmacy

Supervisor: doc. PharmDr. Ing. Radka Opatřilová, Ph.D., MBA

Year: 2025

Number of Pages: 116

Keywords: carbonic anhydrase, carbonic anhydrase inhibitors, sulfathiazole, 1,3,5-triazine, UV/Vis spectrophotometry, phenol red, bromothymol blue

Anotace

Diplomová práce se zabývá vývojem a optimalizací jednoduché spektrofotometrické metody pro hodnocení aktivity inhibitorů karboanhydrázy s využitím rostlinného materiálu. Metoda je založena na nepřímém sledování změn pH způsobené enzymatickou hydratací CO_2, detekované pomocí pH indikátorů. Experimentálně byly testovány tři syntetické sloučeniny s cílem vyhodnotit jejich inhibiční účinnost vůči karboanhydráze a objasnit vztah mezi jejich chemickou strukturou a výslednou biologickou aktivitou. Vyvinutý postup je časově i finančně nenáročný, nevyžaduje izolaci enzymu a je vhodný pro rutinní screening inhibitorů v běžně vybavené laboratoři.

Abstract

The thesis focuses on the development and optimization of a simple spectrophotometric method for the evaluation of carbonic anhydrase inhibitor activity using plant material. The method is based on indirect monitoring of pH changes caused by enzymatic hydration of CO_2, detected by pH indicators. Three synthetic compounds were experimentally tested to evaluate their inhibitory efficacy against carbonic anhydrase and to elucidate the relationship between their chemical structure and the resulting biological activity. The developed procedure is time- and cost-efficient, does not require enzyme isolation and is suitable for routine screening of inhibitors in a routinely equipped laboratory.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma **Vývoj a optimalizace analytické metody pro hodnocení aktivity inhibitorů karboanhydrázy** zpracovala sama. Veškeré prameny a zdroje informací, které jsem použila k sepsání této práce, byly citovány v textu a jsou uvedeny v seznamu použitých pramenů a literatury.

V Brně 22. dubna 2025

.....
Daniela Šilhavá

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala doc. PharmDr. Ing. Radce Opatřilové, Ph.D., MBA, za velmi ochotný, trpělivý a odborný přístup, se kterým k vedení mé práce po celou dobu přistupovala. Děkuji jí za velmi cenné a užitečné rady, které v kombinaci s její velmi pohotovou komunikací vedly k neustálému zdokonalování mého díla. Velice si vážím možnosti vypracování práce na Ústavu chemických léčiv pod jejím vedením. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Evě Havránkové, Ph.D. za poskytnuté látky pro můj experiment. V neposlední řadě děkuji celé mé rodině, mému příteli, a přátelům za enormní podporu a motivaci, jak při psaní diplomové práce, tak v průběhu celého studia.

Obsah

Seznam obrázků 15

Seznam tabulek 17

Seznam pojmů a zkratek 18

1 Úvod a cíl práce 21

2 Teoretická část 22

2.1 Enzym karboanhydráza ... 22

2.2 Inhibitory karboanhydrázy ... 31

2.3 Vztah chemické struktury a biologického účinku CAIs ... 36

2.4 Analytické metody ... 46

2.5 Metodika experimentu ... 51

3 Experimentální část 55

3.1 Studované látky ... 55

3.2 Optimalizace vyvíjené metody ... 57

3.3 Výsledky a hodnocení ... 67

3.4 Vztah chemické struktury a inhibiční účinnosti ... 88

4 Diskuse 92

5 Závěr 100

Použité zdroje 101

Seznam obrázků

Obr. 1: Monomerní struktura α-CA, hCA II, převzato z [1] 27
Obr. 2: Obecná struktura aktivního místa CA, upraveno dle [10, 32] 28
Obr. 3: Mechanismus katalýzy, upraveno dle [26, 30] 30
Obr. 4: Schéma interakce CAI s aktivním místem CA, upraveno dle [10, 32] 31
Obr. 5: První mechanismus inhibice: A) tetraedrální; B) trigonální, převzato z [43] ..33
Obr. 6: První mechanismus inhibice – s různými inhibitory: A) substituce (sulfonamidy), B) adice (thiokyanáty), upraveno dle [49] 33
Obr. 7: Druhý mechanismus inhibice, převzato z [43] 34
Obr. 8: Druhý mechanismus inhibice – fenol, upraveno dle [51] 34
Obr. 9: Třetí mechanismus inhibice, převzato z [43] 35
Obr. 10: Čtvrtý mechanismus inhibice, převzato z [43] 36
Obr. 11: Potenciální CAI 241 interagující s aktivním místem CA, upraveno dle [60] ...37
Obr. 12: A) Obecný vzorec sulfonamidů, B) deprotonovaná forma, vlastní tvorba 38
Obr. 13: Chemické struktury používaných sulfonamidů, vlastní tvorba 39
Obr. 14: A) Sulfamát, B) sulfamid v aktivním místě CA, upraveno dle [45] 41
Obr. 15: Benzensulfonamid v aktivním místě CA, upraveno dle [43] 42
Obr. 16: Chemické struktury izomerů triazinu, vlastní tvorba 43
Obr. 17: Stupňovitá nukleofilní substituce TCT, upraveno dle [69] 43
Obr. 18: Tail přístup, upraveno dle [43] 45
Obr. 19: Schéma stopped–flow aparatury, převzato z [83] 49
Obr. 20: Chemická struktura DNSA, vlastní tvorba 50
Obr. 21: Návrh fluorescenčního testu založeného na vytěsňování indikátoru inhibitorem z vazby s enzymem, převzato z [86] 50
Obr. 22: Chemická struktura pyraninu, vlastní tvorba 51
Obr. 23: Schéma spektrofotometru, převzato z [90] 52
Obr. 24: Chemické struktury pH indikátorů v různém pH, upraveno dle [100, 101] ...54
Obr. 25: Absorpční spektrum pH indikátorů – FČ, BTM 67
Obr. 26: Absorpční spektrum FČ + CO_2 + klíčky 69
Obr. 27: Absorpční spektrum BM + CO_2 + klíčky 69
Obr. 28: Absorpční spektrum – sulfathiazol 1.koncentrace 73
Obr. 29: Graf zobrazující absorbanci v čase pro 1. koncentrace sulfathiazolu 73
Obr. 30: Absorpční spektrum – sulfathiazol 2. koncentrace 74
Obr. 31: Graf zobrazující absorbanci v čase pro 2. koncentrace sulfathiazolu 74
Obr. 32: Absorpční spektrum – sulfathiazol 3. koncentrace 75
Obr. 33: Graf zobrazující absorbanci v čase pro 3. koncentrace sulfathiazolu 75
Obr. 34: Absorpční spektrum – sulfathiazol 4. koncentrace 76
Obr. 35: Graf zobrazující absorbanci v čase pro 4. koncentrace sulfathiazolu 76
Obr. 36: Absorpční spektrum – CAI 176 80
Obr. 37: Graf zobrazující absorbanci v čase pro CAI 176 80
Obr. 38: Absorpční spektrum – CAI 200 81
Obr. 39: Graf zobrazující absorbanci v čase pro CAI 200 81

Obr. 40: Absorpční spektrum – CAI 241 82
Obr. 41: Graf zobrazující absorbanci v čase pro CAI 241 82
Obr. 42: Vývoj rychlostí reakcí CAIs v systému s FČ 85
Obr. 43: Vývoj rychlostí reakcí CAIs v systému s BTM 85
Obr. 44: Graf vyobrazující srovnání účinnosti CAIs podle typu pH indikátoru 87
Obr. 45: CAI 176 v aktivním místě, vlastní tvorba 89
Obr. 46: CAI 200 v aktivním místě, vlastní tvorba 90
Obr. 47: CAI 241 v aktivním místě, vlastní tvorba 91

Seznam tabulek

Tab. 1: Přehled izoenzymů lidské α-CA, jejich relativní katalytická rychlost a subcelulární lokalizace v organismu, převzatá a přeložená z [21] 26
Tab. 2: Studovaná látka – sulfathiazol: chemický název, struktura, vlastnosti 55
Tab. 3: Studovaná látka – CAI 176: chemický název, struktura, vlastnosti 56
Tab. 4: Studovaná látka – CAI 200: chemický název, struktura, vlastnosti 56
Tab. 5: Studovaná látka – CAI 241: chemický název, struktura, vlastnosti 57
Tab. 6: Ředění pH indikátorů 58
Tab. 7: Naměřené absorbance objemových koncentrací vodných roztoků pH indikátorů 59
Tab. 8: Požadované koncentrace a odpovídající navážky sulfathiazolu 65
Tab. 9: Kontrolní měření absorbance pH indikátorů bez přítomnosti CA 67
Tab. 10: Naměřené hodnoty absorbance v měření enzymové aktivity CA v klíčcích 68
Tab. 11: Naměřené hodnoty absorbance v měření enzymové aktivity CA v semenech 69
Tab. 12: FČ – porovnání rychlostí reakce u vzorků klíčků s CA a bez CA 71
Tab. 13: BTM – porovnání rychlosti reakce u vzorků klíčků s CA a bez CA 71
Tab. 14: FČ – porovnání rychlostí reakcí u vzorků semen 72
Tab. 15: BTM – porovnání rychlostí reakcí u vzorků semen 72
Tab. 16: Porovnání přítomnosti CA v klíčcích a semenech pomocí rychlosti reakce v prodlouženém čase 72
Tab. 17: Naměřené absorbance – sulfathiazol 1. koncentrace 73
Tab. 18: Naměřené absorbance – sulfathiazol 2.koncentrace 74
Tab. 19: Naměřené absorbance – sulfathiazol 3. koncentrace 75
Tab. 20: Naměřené absorbance – sulfathiazol 4. koncentrace 76
Tab. 21: Sulfathiazol 1. koncentrace – hodnoty rychlosti reakce 77
Tab. 22: Sulfathiazol 2. koncentrace – hodnoty rychlostí reakce 77
Tab. 23: Sulfathiazol 3. koncentrace – hodnoty rychlostí reakce 78
Tab. 24: Sulfathiazol 4. koncentrace – hodnoty rychlostí reakce 78
Tab. 25: Naměřené absorbance – CAI 176 80
Tab. 26: Naměřené absorbance – CAI 200 81
Tab. 27: Naměřené absorbance – CAI 241 82
Tab. 28: CAI 176 – vypočítané ΔA a rychlosti reakce pro CAIs 83
Tab. 29: CAI 200 – vypočítané ΔA a rychlosti reakce pro CAIs 84
Tab. 30: CAI 241 – vypočítané ΔA a rychlosti reakce pro CAIs 84
Tab. 31: Průměrné rychlosti reakcí za 300 s ve vzorcích s pozitivní kontrolou, negativní kontrolou a CAIs 86
Tab. 32: Relativní procentuální inhibiční účinnost jednotlivých CAIs v závislosti na koncentraci sulfathiazolu a typu pH indikátoru 86
Tab. 33: Přehled inhibiční účinnosti testovaných CAIs na aktivitu CA měřenou pH indikátory 87

Seznam pojmů a zkratek

AG	–	ukotvující skupina, (z angl. *anchoring-group*)
AMK	–	aminokyselina, aminokyselinový
BTM	–	bromthymolová modř
CA	–	karboanhydráza (z angl. *carbonic anhydrase*)
CAs	–	karboanhydrázy (z angl. *carbonic anhydrases*)
CAI	–	inhibitor karboanhydrázy (z angl. *carbonic anhydrase inhibitor*)
CAIs	–	inhibitory karboanhydráz (z angl. *carbonic anhydrase inhibitors*)
CAM	–	γ-CAs pocházející z *Methanosarcina* thermophila (z angl. *carbonic anhydrase from mikroorganism Methanosarcina thermophila*)
CARP	–	*Carbonic anhydrase-related proteins*
Cys	–	cystein
DNSA	–	dansylamid
FČ	–	fenolová červeň
GIT	–	gastrointestinální systém
Glu	–	glutamová kyselina
His	–	histidin
IUBMB	–	Mezinárodní unie biochemie a molekulární biologie
IUPAC	–	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
Leu	–	leucin
SAR	–	vztah chemické struktury a biologického účinku (z angl. *structure-activity relationship*)
TCT	–	2,4,6-trichloro-1,3,5-triazin
Thr	–	threonin
Trp	–	tryptofan
ÚChL	–	ústav chemických léčiv
UV/Vis	–	ultrafialová a viditelná oblast

Val	–	valin
WAU	–	Wilbur-Andersonova jednotka (z angl. *Wilbur-Anderson unit*)
ZBG	–	zinek-vázající skupina (z angl. *zinc-binding group*)

1 Úvod a cíl práce

Karboanhydráza je metaloenzym schopný reverzibilně katalyzovat přeměnu oxidu uhličitého na hydrogenuhličitan a proton. Důležitost této reakce je zásadní především pro udržení homeostázy pH a oxidu uhličitého v buňkách. Inhibice tohoto enzymu má farmakologický význam zejména při vývoji antiglaukomatik, diuretik nebo v současné době protinádorových léčiv. [1] Z toho pramení snaha o vývoj nových inhibitorů karboanhydráz jako nových potenciálních léčiv. A právě hodnocení jejich účinnosti představuje nezbytný krok v rámci preklinického výzkumu.

Tato diplomová práce přináší novou, dosud nepublikovanou metodu, která umožňuje rychlé a efektivní testování inhibiční účinnosti látek vůči karboanhydráze přímo v rostlinném materiálu. Jedná se o originální přístup, který kombinuje jednoduchost, nízkou nákladnost a laboratorní proveditelnost s vysokou vypovídací hodnotou výsledků. Práce tak reaguje na potřebu prakticky využitelných metod pro preklinické testování inhibitorů.

Jako biologický model jsou zvoleny snadno dostupné klíčky červené čočky jedlé (*Lens culinaris*). Na rozdíl od stávajících analytických přístupů, které často vyžadují izolaci enzymu, navržená metoda tuto technicky náročnou fázi zcela eliminuje. Díky tomu se výrazně zjednodušuje celý proces, zvyšuje se jeho dostupnost a usnadňuje se reprodukovatelnost i v běžně vybavené laboratoři.

Metoda je založena na nepřímém spektrofotometrickém sledování změn pH způsobených enzymatickou hydratací oxidu uhličitého. Přičemž tyto změny jsou detekovány pomocí pH indikátorů, konkrétně fenolové červeně a bromthymolové modři. Celý postup je optimalizován tak, aby byl nejen snadno proveditelný a časově nenáročný, ale zároveň poskytoval relevantní a opakovatelné výsledky.

Cílem této diplomové práce je vyvinout a experimentálně ověřit jedinečnou analytickou metodu, která může najít uplatnění při hodnocení nových inhibitorů karboanhydrázy. Její funkčnost bude testována na sérii třech syntetických sloučenin, označených jako CAI 176, 200 a 241. Paralelně bude provedena optimalizace podmínek tak, aby byla metoda snadno aplikovatelná i v běžných laboratorních podmínkách.

2 Teoretická část

2.1 Enzym karboanhydráza

Skupina enzymů karboanhydráz (dále jen CAs, z angl. *carbonic anhydrases*) patří mezi metaloenzymy. Jsou charakterizované kovovým iontem zakomponovaným do své struktury, který se označuje jako kofaktor. [1] Karboanhydráza (dále jen CA, z angl. *carbonic anhydrase*) pracuje jako biologický katalyzátor reakce, která probíhá i bez její přítomnosti jako katalyzátoru, nicméně CA ji výrazně urychluje. Jedná se o reverzibilní vzájemnou přeměnu, hydrataci, mezi oxidem uhličitým a hydrogenuhličitanem,

$$\boldsymbol{CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3{}^- + H^+} \tag{1}$$

viz rovnice (1) [1].

Z funkčního hlediska se CAs řadí do třídy enzymů s názvem lyázy. Dle klasifikace Enzymové komise Mezinárodní unie biochemie a molekulární biologie (IUBMB) je enzym karboanhydráza evidován jako EC 4.2.1.1. [2] Toto označení vyjadřuje hierarchické zařazení enzymu v rámci následujících kategoriích: číslo 4 označuje třídu lyáz, číslo 2 specifikuje podtřídu karbon-oxygen lyáz, číslo 1 vymezuje skupinu hydro-lyáz a poslední číslo 1 identifikuje konkrétní enzym v této skupině, tedy CA. [2]

Lyázy jsou enzymy katalyzující štěpení chemických vazeb C–C, C–O, C–N jiným mechanismem, než hydrolytickým či oxidačně redukčním. Při tomto procesu často dochází k odštěpení skupin ze substrátů, čímž vznikají dvojné vazby. [3] Charakteristickým rysem těchto enzymů je, že v jednom směru reakce se účastní dva substráty, zatímco v opačném směru pouze jeden. Konkrétní podtřída karbon-oxygen lyázy specificky působí na vazby mezi uhlíkem a kyslíkem a katalyzuje její rozpad. V případě skupiny hydro-lyázy, kam spadá CA, se jedná o eliminaci vody. [2, 4] S ohledem na tento fakt, je CA jedním z klíčových enzymů této skupiny, protože katalyzuje přeměnu oxidu uhličitého na hydrogenuhličitan a naopak, přičemž zároveň dochází k uvolňování nebo přijímání protonů. [2]

2.1.1 Klasifikace karboanhydráz

CAs tvoří rozmanitou skupinu metaloenzymů, které lze nalézt ve více izoformách v různých enzymových třídách. Jsou rozšířené napříč všemi doménami života – Archea, Bakterie a také Eukaryota, mezi které patří i člověk. [5] Diverzita těchto enzymů skupiny CAs je významným příkladem konvergentní evoluce, při níž různé organismy nezávisle na sobě vyvinuly enzymy katalyzující reverzibilní hydrataci CO_2. Tato adaptace zajišťuje efektivní regulaci pH v buněčném prostředí. [6] Zmíněná katalytická reakce (1) je univerzálně využívána především proto, že oxid uhličitý je snadno dostupný

metabolický plyn, který vzniká jako vedlejší produkt metabolismu v buňkách. Rovněž ho lze poměrně snadno ze systému eliminovat dýcháním. [7] Dosavadní poznatky naznačují, že CAs se vyvinuly nejméně osmkrát, a to na sobě nezávislými evolučními cestami. [1, 8, 9] Navzdory shodné katalytické funkci se jednotlivé skupiny liší svou primární i terciární strukturou, což dokládá jejich odlišný fylogenetický původ. Tento molekulární fenomén zdůrazňuje klíčovou úlohu CA v metabolických procesech. [5] Na základě dosud shromážděných informací bylo identifikováno osm geneticky odlišných skupin CAs označující se řeckými písmeny: α-, β-, γ-, δ-, ζ-, η-, θ- a ι-CAs. [8] Tyto třídy se liší jak genetickými, tak strukturálními vlastnostmi, přičemž každá z nich plní specifické funkce v různých organismech. [8]

Nejvíce prostudovaná je třída α-CA, která zahrnuje zinečnatý kation v aktivním místě enzymu. Podrobný mechanismus katalýzy je detailně popsán v následujících kapitolách. Tato enzymatická třída je přítomná v široké škále organismů, včetně rostlin, hub, prvoků, řas, prokaryot, obratlovců, přičemž nejvýrazněji se vyskytuje u savců. CAs se podílí na životně důležitých procesech, jako je dýchání a regulace pH v organismu. α-CAs katalyzují vzájemnou reverzibilní přeměnu oxidu uhličitého na hydrogenuhličitan v červených krvinkách, čímž usnadňují transport CO_2 z tkání do plic. Inhibitory CA (dále jen CAIs, z angl. *carbonic anhydrase inhibitors*) se již desítky let využívají v medicíně jako diuretika, antiglaukomatika, antiepileptika a antibiotika, přičemž jejich cílem jsou savčí formy tohoto enzymu. Široké terapeutické využití těchto látek vyplývá z existence nejméně 16 dosud známých různých izoforem α-CA u člověka, které hrají zásadní roli v různých fyziologických i patologických procesech. [6, 10]

Druhou významnou třídou jsou β-CAs, jež rovněž v jejich aktivním místo obsahují zinečnatý ion. Jsou typické pro bakterie, rostliny, houby a chloroplasty jednoděložných i dvouděložných rostlin. Strukturně se β-CAs od α-CAs výrazně liší. Zatímco α-CAs se vyskytují převážně jako monomery, β-CA obvykle tvoří oligomery, což znamená, že tvoří dimery nebo tetramery. Přičemž každá podjednotka těchto oligomerů může mít své vlastní aktivní místo, což ovlivňuje jejich katalytické vlastnosti. Struktura aktivního místa může být různá v závislosti na původu enzymu. U prokaryot je zinečnatý iont koordinován dvěma cysteinovými zbytky (dále jen Cys), jedním histidinovým zbytkem (dále jen His) a čtvrtým ligandem je karboxylová skupina asparagové kyseliny. U chloroplastového aktivního místa je čtvrtým ligandem molekula vody, podobně jako u α-CA. U některých bakteriálních β-CAs bylo zjištěno, že vykazují pH-dependentní aktivitu, tedy že aktivní místo může existovat ve dvou stavech v závislosti na pH. Při nízkém pH je aktivní místo uzavřené a enzym neaktivní. V tomto stavu karboxylová skupina váže zinečnatý iont a blokuje tím přístup molekuly vody. Při vyšším pH se aktivní místo otevře, zbytek asparagové kyseliny vytvoří vazbu s aminokyselinou (dále jen AMK) argininem, která se nachází poblíž aktivního místa. Tato interakce umožní vstup molekule vody nebo hydroxidu, čímž se enzym aktivuje. [7–10]

Třetí třídou jsou γ-CAs, které vykazují katalytickou aktivitu nejen s ionty zinku, ale také s ionty železa nebo kobaltu. Vyskytují se v některých rostlinách, houbách,

bakteriích a archeích. [9] Tato třída byla poprvé objevena u mikroorganismu *Methanosarcina thermophila*, což je methan produkující mikrooragnismus. Proto γ-CAs pocházející z tohoto mikroorganismu se označují jako CAM (z angl. *carbonic anhydrase from mikroorganism Methanosarcina thermophila*). Struktura CAM je oligometrní, konkrétně se jedná o homotrimer. Aktivní místo může mít dvě varianty. První variantou je, že může obsahovat zinečnatý iont, koordinovaný třemi His zbytky a dvěma molekulami vody, čímž tvoří trigonální bipyramidální geometrii. Při druhé variantě může aktivní místo obsahovat kobaltnatý iont koordinovaný se třemi His zbytky a třemi molekulami vody, což vytváří oktaedrickou koordinační geometrii. Bylo dokázáno, že γ-CAs s kobaltem v aktivním místě vykazuje dvojnásobnou enzymatickou aktivitu ve srovnání s variantou obsahující zinek v aktivním místě. [10–12]

Specifickou skupinou jsou δ-CAs, enzymy aktivní s kobaltem, ale schopné funkce i se zinkem v aktivním místě enzymu. Byly objeveny v mořských rozsivkách, konkrétně v *Thalassiosira weissflogii*. Přestože jejich struktura dosud nebyla potvrzena krystalografií, analýzy naznačují, že jejich aktivní místo je podobné α-CAs, tedy tvořené třemi His zbytky a jednou molekulou vody vázanou na zinek. [1, 13, 14]

Třída ζ-CAs jsou metaloenzymy obsahující kadmium či zinek v aktivním místě. [13] Jejich přítomnost byla zaznamenána výhradně u některých druhů rozsivek. Aktivní místo sdílí strukturní rysy s β-CA, kde kovový iont je koordinován s jedním His zbytkem a dvěma Cys zbytky, přičemž čtvrtým ligandem je molekula vody. [13, 15]

Zinkové metaloproteiny, novější třídy η-CA, byly nalezeny u parazitů rodu *Plasmodium*, především *Plasmodium falciparum* a *Plasmodium berghei*, což naznačuje jejich význam v metabolismu těchto organismů. Aktivní místo tvoří zinečnatý kation koordinovaný se dvěma His zbytky a jedním zbytkem glutamové kyseliny (dále jen Glu). [9, 16]

Ještě novější třída, θ-CAs, byla objevena také v mořských rozsivkách a obsahuje v aktivním místě zinek koordinovaný se třemi His zbytky. [9, 16]

Nejnovější identifikovanou třídou je třída ι-CAs. Byla identifikovaná u rozsivek, bakterií a sinic. Je jedinečná, jelikož má schopnost být katalyticky aktivní bez nutnosti kovového iontového kofaktoru. Ačkoli v některých případech mohou obsahovat jako kofaktor mangan. [9, 17]

Existuje pouze malé množství organismů, například gramnegativní bakterie (*Rickettsia, Borrelia burgdorferi, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma pneumoniae, genitalium, Treponema pallidum*), v jejichž genomu nebyla zjištěna přítomnost žádné CAs. Pravděpodobně to souvisí s faktem, že jsou součástí ekologické niky s vysokou dostupností HCO_3^- nebo jsou součástí symbiózy s druhy, které CAs mají a mohou ji využívat. [8]

2.1.2 Lidské α-karboanhydrázy

Dnes známe u člověka exprimovaných 16 izoforem α-CAS. Tyto izoformy však vykazují rozdíly v buněčné lokalizaci, a především v rychlosti enzymatické aktivity. Katalytickou aktivitu vykazuje 13 izoforem. [18, 19]

Katalyticky neaktivní izoformy jsou označované jako CARP, tedy z angl. *carbonic anhydrase-related proteins*. Neschopnost katalyzovat CA vychází z jejich struktury, mají nedostatek esenciálních His zbytků, které by koordinovaly zinečnatý iont zapojený do katalytického mechanismu. [20]

Na základě údajů zveřejněných v odborné literatuře bylo potvrzeno, že katalytická aktivita jednotlivých izoforem karboanhydrázy při hydrataci CO_2 se řadí následovně: CA II > CA VB > CA VII > CA IX > CA IV > CA I > CA VI > CA XIV > CA XII > CA VA > CA XIII > CA III. Z toho plyne, že izoforma CA II vykazuje nejvyšší katalytickou aktivitu a CA III nejslabší. [20]

Dlouhodobé studie zaměřené na CA II prokázaly, že zbytek His64 hraje zásadní roli v katalytické účinnosti nejaktivnějších izoforem CA. Jeho význam spočívá v podpoře rychlosti limitujícího kroku enzymové reakce, protože slouží jako efektivní protonový přenašeč. Pokud His64 v dané izoformě chybí, dochází k výraznému poklesu katalytické aktivity enzymu. Rozdíly v katalytické účinnosti jednotlivých izoforem mohou souviset s odlišným uspořádáním AMK v jejich aktivním místě. [20]

Tab. 1: Přehled izoenzymů lidské α-CA, jejich relativní katalytická rychlost a subcelulární lokalizace v organismu, převzatá a přeložená z [21]

Izoforma	Katalytická aktivita	Subcelulární lokalizace	Tkáňová/orgánová lokalizace
CA I	Střední	Cytosol	Erytrocyty, GIT
CA II	Vysoká	Cytosol	Erytrocyty, oko, GIT, kostní osteoklasty, ledviny, plíce, varlata, mozek
CA III	Velmi nízká	Cytosol	Kosterní svalstvo, adipocyty
CA IV	Vysoká	Membránově vázaná	Ledviny, plíce, pankreas, mozkové kapiláry, tlusté střevo, srdeční sval
CA VA	Nízká-střední	Mitochondrie	Játra
CA VB	Vysoká	Mitochondrie	Srdeční a kosterní svalstvo, pankreas, ledviny, mícha, GIT
CA VI	Střední	Sekretovaná ve slinách/mléce	Slinné a mléčné žlázy
CA VII	Vysoká	Cytosol	
CARP VIII	Akatalytická	Cytosol	
CA IX	Střední-vysoká	Transmembránová	Nádory, sliznice GIT
CARP X	Akatalytická	Sekretovaná	
CARP XI	Akatalytická	Sekretovaná	
CA XII	Nízká	Transmembránová	Ledvinné, střevní a reprodukční epitel, oko, nádory
CA XIII	Střední	Cytosol	Ledviny, mozek, plíce, střevo, rozmnožovací ústrojí
CA XIV	Střední	Transmembránová	Ledviny, mozek, játra
CA XV	Nízká	Membránově vázaná	Ledviny

2.1.3 Fyziologická role karboanhydrázy

Úloha CAs je zásadní v mnoha fyziologických procesech, a to napříč různými organismy. Reakce (1), kterou katalyzují, zajišťuje udržení acidobazické rovnováhy. Tento enzymatický proces je stěžejní zejména pro dýchání, kde umožňuje efektivní přenos CO_2 mezi tkáněmi a plícemi. [22, 23] CAs se rovněž angažují v procesu vylučování iontů a také usnadňují jejich transport přes buněčné membrány v různých orgánových strukturách. [23] Důležitou roli CA hrají také v biosyntetických procesech tvořící energeticky důležité látky. Jedná se o glukoneogenezi či biosyntézu lipidů nebo močoviny. [8] V neposlední řadě se účastní metabolismu kostí. Jsou zahrnuty v procesu kalcifikace a resorpci kostní tkáně, a tak CAs udržují zdraví kostí. [22, 23] V rostlinné říši CAs usnadňují fotosyntézu fixací CO_2. [23] CAs mohou být zbraní patogenních organismů, jelikož podporují virulenci.

Určité izoformy CAs jsou významnými ukazateli nádorového bujení. Mají tumorogenní potenciál. Pomáhají nádorovým buňkám přežít a šířit se. Z toho důvodu jsou tyto izoformy považované za slibné terapeutické cíle v moderní léčbě rakoviny. [22] Některé izoformy jsou zkoumány pro souvislost s neurodegenerativními poruchami, jelikož specifické izoformy hrají důležitou roli v kognitivních procesech v mozku. [22]

2.1.4 Struktura hCA II

Enzym CA je řazen mezi metaloenzymy. Kromě bílkovinného apoenzymu obsahuje ve své struktuře jako nebílkovinový kofaktor kovový iont. Jak bylo popsáno výše, v kapitole 1.1, každá třída CA preferuje jiný kov. V následujících kapitolách se zaměřuji na α-CA, která obsahuje zinečnatý kation. [1, 24] Konkrétně na lidskou hCA-II, jež byla objevena, potvrzena a nejlépe prozkoumána, např. pomocí neutronové a rentgenové krystalografie. [25–27]

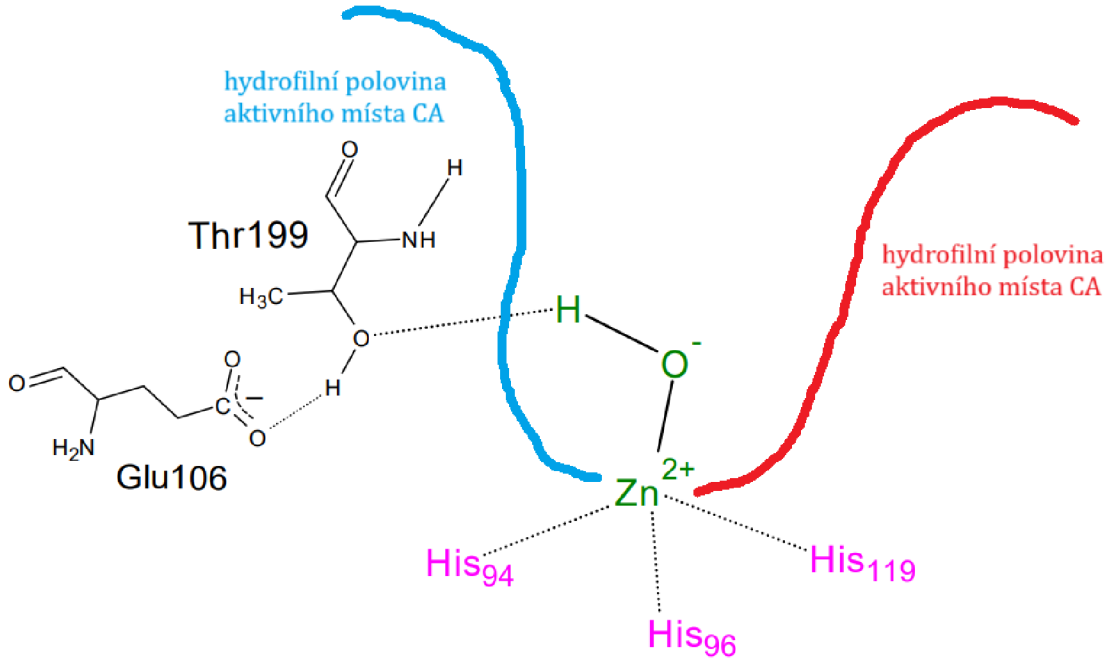
CAs mohou existovat v různých formách. α-CA je nejčastěji monomerní protein, plní tedy katalytickou funkci jako jediný polypeptidický řetězec. Pouze některé izoenzymy jsou homodimery. Na rozdíl od ostatních tříd CA, kdy například β-CA funguje jako dimer nebo tetramer. [1]

Obr. 1: Monomerní struktura α-CA, hCA II, převzato z [1]

Aktivní místo bylo zjištěno v dutině sahající až ke středu molekuly a zinečnatý kation se nachází na jejím dně. Zinečnatý kation je koordinován třemi AMK ligandy, konkrétně His zbytky (His119, His94, His96), a jedním nukleofilním ligandem, kterým je molekula vody. Toto geometrické uskupení vytváří tetraedrické uspořádání kolem zinečnatého kationtu. [1, 28] Tento komplex se vyznačuje vysokou stabilitou, která je zajištěna složitou sítí intramolekulárních vodíkových vazeb s AMK zbytky či zbytky molekul vody, jako například hluboké vody (z angl. *deep-water*), které se nachází v blízkosti enzymatické dutiny. [21, 29]

Zinečnatý ion zde funguje jako Lewisova kyselina, protože snižuje pKa vody na něj navázané, a to z 10 na 7, čímž umožní vznik hydroxidového iontu při fyziologickém pH. [30]

Molekula vody koordinovaná se zinkem vytváří také vodíkové vazby s OH– skupinou AMK Thr199, která je spojena s Glu106. Tyto interakce zvyšují reaktivitu (E–Zn–H_2O) Zn^{2+}-vázané vody a zároveň umožňují správnou orientaci molekuly CO_2 pro nukleofilní útok. [1, 28] Proto jsou zbytky Thr199 a Glu106 klíčové pro katalytickou aktivitu všech α-CA a fungují jako tzv. strážci vstupu (z angl. *gate-keepers*). [1, 31]



Obr. 2: Obecná struktura aktivního místa CA, upraveno dle [10, 32]

Aktivní místo CA je unikátní, jelikož je tvořeno bipolární architekturou. Tato komplementární struktura umožňuje enzymu efektivně pracovat s molekulami s rozlišnými chemickými vlastnostmi. [29] Jedna polovina je hydrofobní, druhá hydrofilní. Hydrofobní část aktivního místa váže CO_2 z hydrofobní kapsy nacházející se poblíž,

ve které je CO_2 stabilizováno AMK (Val121, Val143, Leu198). Hydrofilní polovina se zapojuje do uvolňování iontů, které vznikly při hydrataci CO_2. [1]

Hydrofilní AMK His64 aktivního místa má dvě důležité konformace, tzv. rotamery [33] Tyto rotamery jsou běžně označované jako „in" a „out" a jsou důležité z hlediska protonového transportního přenosu a regenerace cyklu. Je důležité zmínit, že His64 může tyto konformace v průběhu katalýzy měnit. Konformace „in" směřuje k zinečnatému iontu a může přijmout H^+. „Out" konformace je orientovaná k výstupu z dutiny a pomáhá rychlému odvodu H^+ z aktivního místa do rozpouštědla. [1, 34]

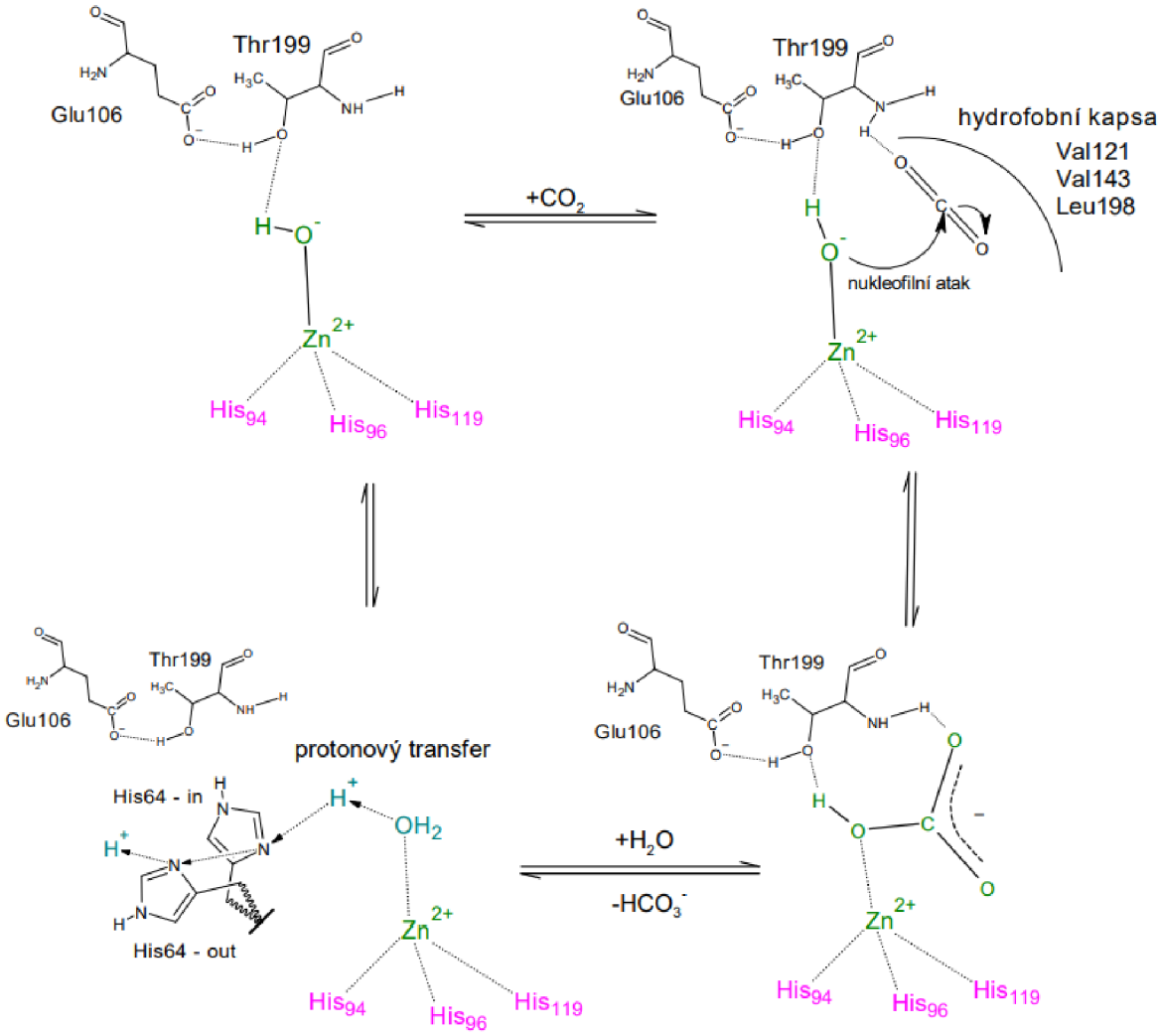
Dlouhodobé vědecké studie prokázaly, že pKa His64 má vliv na katalytickou rychlost reakce, protože se mění v závislosti na okolních AMK zbytcích. [33]

2.1.5 Mechanismus katalýzy hCAII

Tato podkapitola je opět zaměřena na hCAII z již zmíněného důvodu. Tento lidský izoenzym byl podrobně zkoumán a předpokládá se, že katalýza probíhá obdobně i u ostatních izoforem. Mechanismus katalýzy probíhá vícekrokově sekvenčním mechanismem [35] a nukleofilní adicí [36, 37]. Ještě před navázáním na zinečnatý kation, se voda vyskytuje v blízkosti aktivního místa. Atom kyslíku vody má záporný parciální náboj, zatímco zinek má kladný. Vzhledem k silné elektrostatické interakci jsou k sobě přitahovány a molekula vody se koordinuje na zinečnatý kation v aktivním místě jako ligand za vzniku komplexu $Zn–H_2O$. To má za následek vazbu vody na zinečnatý kation. [38] His zbytky, jakožto ligandy, stabilizují tuto interakci a orientují vodu do správné polohy. [1]

Díky protonovému transportnímu systému je proton vody z $E–Zn–H_2O$ uvolněn do okolí za vzniku katalyticky aktivní složky CA, tzv. hydroxidové formy kovu ($E–Zn–OH^-$), chovající se jako silný nukleofil. Vysoká reaktivita komplexu $E–Zn–H_2O$ je dána sníženou hodnotou pKa vody koordinované na zinečnatý kation, která se pohybuje v rozmezí 6,5 až 7. Na rozdíl od volné vody s pKa přibližně 14 tak dochází k výrazně snadnější disociaci. Následuje nukleofilní atak hydroxidové OH^- skupiny na nepolární CO_2 nacházející se v hydrofobní kapse aktivního místa CA. Tam je stabilizován hydrofobními AMK, jak bylo zmíněno v kapitole 2.1.4. [1] Generace HCO_3^- zahrnuje vznik přechodného stavu, kdy je HCO_3^- koordinačně vázán na komplex $E–Zn–OH^-$. [26, 37] Vazba HCO_3^- na zinečnatý kation není dostatečně stabilní a dochází k rychlé reakci s novou molekulou vody. HCO_3^- je uvolněn do roztoku a dochází k regeneraci aktivní formy enzymu připravené na nový cyklus. [39] Rychlost určujícím krokem mechanismu katalýzy CA je přenos protonu z molekuly vody vázané na zinečnatý iont do okolního prostředí. Jedná se o limitující a zároveň nepostradatelný krok katalýzy, protože regenerace hydroxidového iontu umožní další opakování této kaskády. Pro vyšší katalytickou aktivitu je tento proces přenosu H^+ realizovaný His zbytkem His64. [1, 34] Jako důkaz klíčové úlohy His64 slouží studie, ve kterých byl His64 nahrazen za alanin, který postrádá schopnost přenášet protony. Tato substituce způsobila dvacetinásobně

pomalejší fázi katalýzy zahrnující protonový transport. [40] Mechanismus katalýzy je vyobrazen na obr. 3.



Obr. 3: Mechanismus katalýzy, upraveno dle [26, 30]

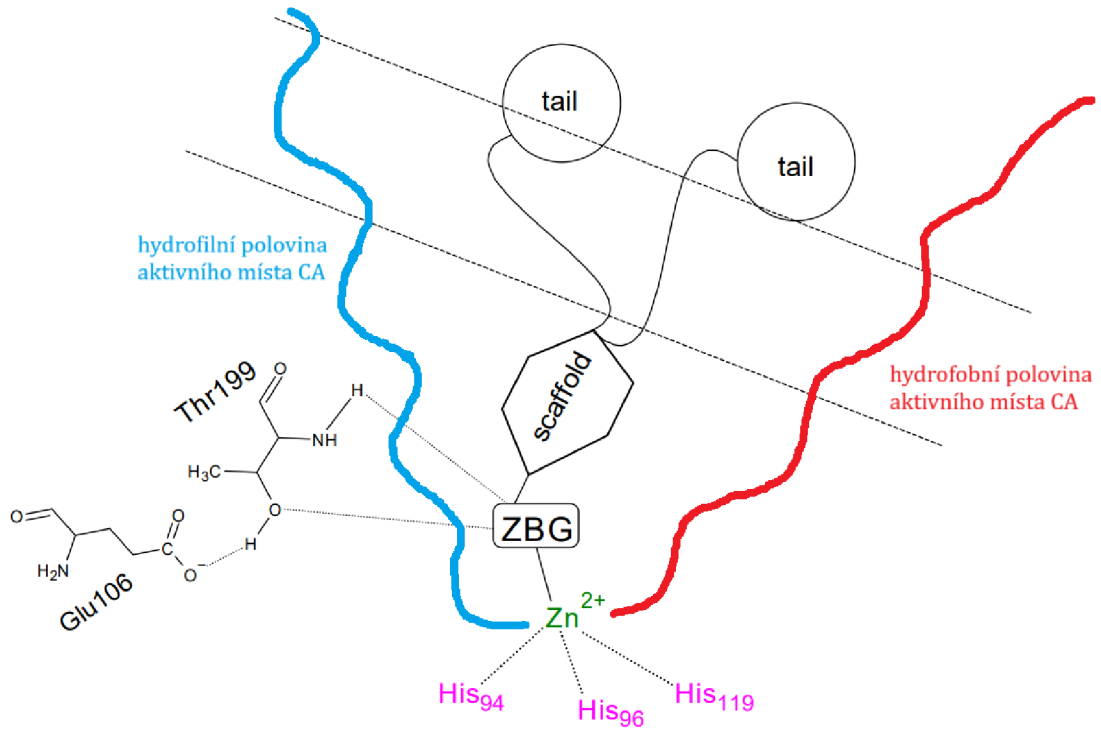
Poprvé byl tento mechanismus detailně vysvětlen v roce 1988 dvojicí vědců, Silvermanem a Lindskogem, kteří popsali vzájemnou souhru jednotlivých fází procesu. Nazvali ho jako dvou krokový ping-pong mechanismus, jelikož se domnívali, že nejprve první substrát změní enzym do mezistavu, uvolní se první produkt, a enzym poté interaguje s druhým substrátem, čímž vzniká druhý produkt. [25] Při podrobnějším zkoumání mechanismu katalýzy bylo zjištěno, že dvou kroková pingpongová interpretace je pouze hrubé zjednodušení. Hlubší analýzy odhalily více krokovou reakční dráhu, kterou Seymour H. Koenig a Rodney D. Brown III pojmenovali jako ping-ping-pong mechanismus. Podle nich enzym projde dvěma mezistavy, než dokončí reakci. Prvně se na enzym naváže první substrát, proběhne částečná reakce a uvolní se první

produkt. Poté enzym změní stav, přijme druhý substrát a teprve po dalším kroku se uvolní druhý produkt. [41] V průběhu let bylo zjištěno a potvrzeno, že se jedná o sekvenční mechanismus a žádný jiný. [35]

2.2 Inhibitory karboanhydrázy

2.2.1 Mechanismus inhibice

Existuje pět mechanismů, kterými mohou CAIs zpomalit nebo úplně zastavit katalytickou aktivitu CA. [34] Těchto pět dosud objasněných mechanismů se liší podle struktury inhibitorů a způsobu jejich vazby k aktivnímu místu CA. Následující obrázek znázorňuje obecnou strukturu inhibitoru CA (dále jen CAI, z angl. *carbonic anhydrase inhibitor*) interagujícího s aktivním místem CA.



Obr. 4: Schéma interakce CAI s aktivním místem CA, upraveno dle [10, 32]

Všeobecně se inhibitor skládá především ze zinek-vázající skupiny (dále jen ZBG, z angl. *zinc-binding group*), tedy části, která se váže na zinečnatý kation a interaguje s AMK zbytky v jeho okolí. Dále se skládá z organického scaffoldu, tedy základního skeletu molekuly, obvykle aromatické či heterocyklické povahy. U nejnovějších CAIs se už nemusí vyskytovat. Třetím důležitým strukturním prvkem je tzv. tail, připojený ke scaffoldu. Tail v porovnání se scaffoldem, u prvních generací CAI chyběl a u nových je pravidelně součástí molekuly a může být při vývoji CAIs různě modifikován. Všechny

tři strukturní prvky tvoří vazby jak s hydrofobní, tak s hydrofilní polovinou aktivního místa. [34, 42]

Prvním mechanismem je přímá vazba CAI k zinku v aktivním místě enzymu, tzv. *zinc-binders inhibitors*. Tímto mechanismem dojde ke znemožnění navázání substrátu na zinečnatý kation a znemožnění procesu katalýzy. Druhým mechanismem inhibice je vazba CAI na molekulu vody, popř. hydroxidový iont (dle aktuálního pH), koordinovaný k zinku v aktivním místě. Takto dojde k inhibici CA bez přímé interakce s kovovým iontem, protože dochází k vazbě na nukleofilní část aktivního místa. Třetí mechanismus spočívá v zabránění vstupu do aktivního místa. CAIs se vážou v blízkosti aktivního místa, čímž blokují vstup substrátu do aktivního místa. Čtvrtý objasněný mechanismus spočívá v navázání CAI daleko od aktivního místa. [34] Tyto mechanismy jsou detailně popsány níže.

Zinek-vázající CAIs

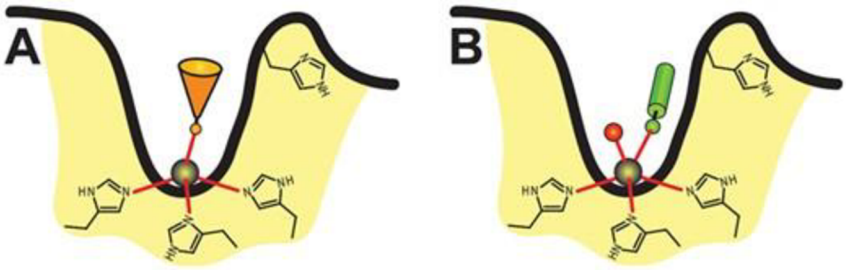
Nejprobádanějším mechanismem inhibice CA je vazba inhibitoru na katalytický ion zinku v aktivním místě enzymu. [43] Dlouhou dobu byl detailně objasněn pouze tento mechanismus inhibice. Existují dva hlavní způsoby vazby na zinek v aktivním místě vedoucí k inhibici. [1] CAIs se na zinečnatý kation vážou jako anionty po předchozí deprotonaci. [39]

Klasickým mechanismem je vazba CAI přímo na zinek. Jedná se o substituční reakci [26] zahrnující vytěsnění molekuly vody, což zachová charakteristickou tetraedrickou geometrii. Touto interakcí účinně inhibují nejznámější CAIs, a to sulfonamidy a jejich isostery (sulfamáty, sulfamidy). Tyto inhibitory ve své chemické struktuře obsahují sulfonamidovou skupinu ($-SO_2NH_2$), fungující jako ZBG. Tato skupina se váže přímo na zinečnatý kation přítomný v aktivním místě enzymu, čímž přispívá k inhibici jeho funkce. Je však nutné zdůraznit, že samotná interakce se zinkem není jediným faktorem ovlivňujícím účinnost inhibitoru. Významnou roli hrají také další vazby v rámci aktivního centra, které stabilizují CAI v prostoru enzymu. [1] ZBG zároveň vstupuje do interakce se strážci brány, tedy s AMK zbytky Thr199 a Glu106, jenž jsou zásadní pro katalytickou aktivitu enzymu. [44, 45]

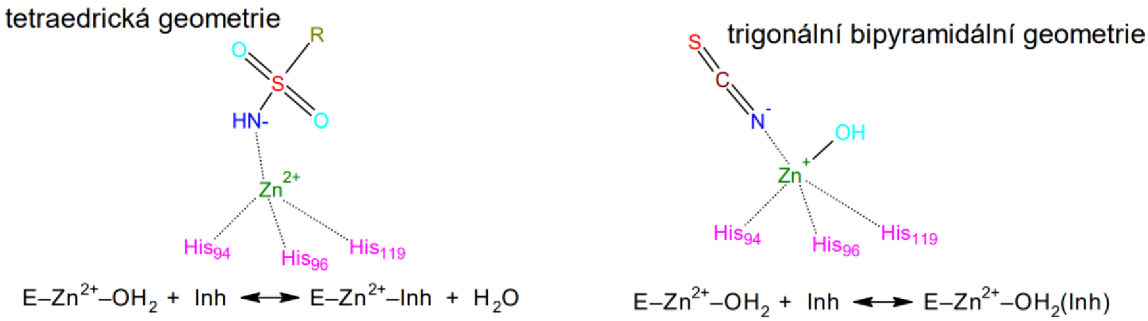
Scaffold u sulfonamidových CAIs je často substituovaný aromatický kruh. Ten pak interaguje s hydrofobní či hydrofilní částí aktivního místa, případně oběma současně. [1] U tohoto typu CAI a vývoje podobných syntetických CAIs je nevýhodou, že inhibují neselektivně nejeden izoenzym CA, čímž způsobí vedlejší účinky. Proto se vývoj věnuje získání izoformně selektivních CAIs. [34] Pozitivní na tomto faktu však je, že tyto CAIs mohou blokovat i CAs patřící do jiných rodin, což se terapeuticky může využívat jako antiinfektiva. [44] Tímto mechanismem blokují CA také nově objevené skupiny, a to mono- a dithiokarbamáty, xanthany, některé karboxyláty, hydroxamáty, fosfonáty, boroly či selenoly. [1, 43, 46]

Druhou možností je navázání CAI na zinek jako pátého ligandu do koordinační sféry zinku. Tím se vytvoří trigonální bipyramidální geometrie, jelikož k zinečnatému

kationtu zůstává koordinována molekula vody. [1, 39, 47] Tento mechanismus představuje jinou cestu inhibice ve srovnání s klasickou vazbou na zinek. Mezi CAIs schopné vázat se jako pátý ligand a tím inhibovat CA se řadí thiokyanáty, azidy, hydroxysulfidy a azidy. [33, 43, 48]



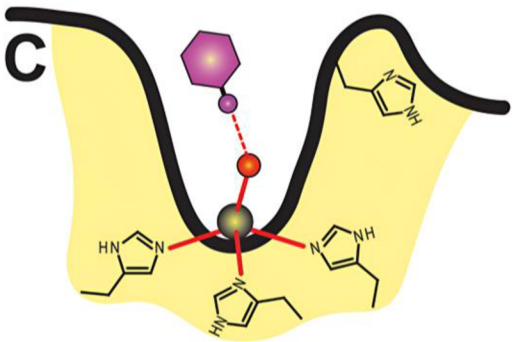
Obr. 5: První mechanismus inhibice: A) tetraedrální; B) trigonální, převzato z [43]



Obr. 6: První mechanismus inhibice – s různými inhibitory: A) substituce (sulfonamidy), B) adice (thiokyanáty), upraveno dle [49]

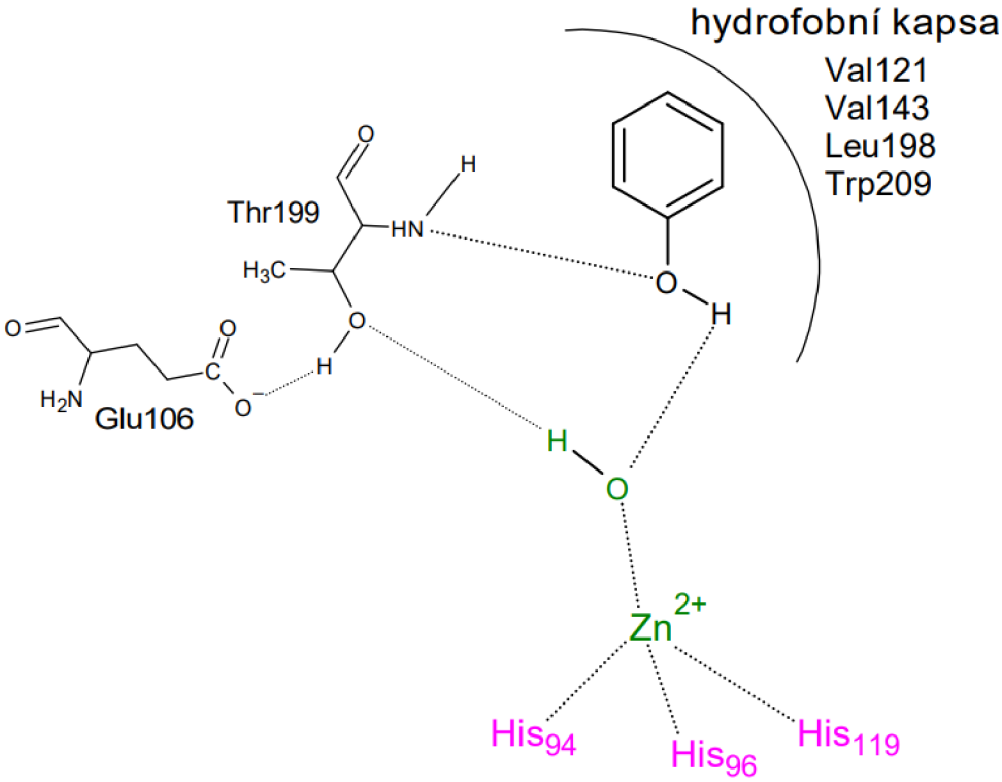
CAIs kotvící se k molekule vody koordinované na zinečnatý kation

Druhým mechanismem, kterým CAIs inhibují spočívá v ukotvení CAI k molekule vody, která je vázaná na zinek v aktivním místě CA. Dochází k tomu díky tzv. ukotvující skupině (dále jen AG, z angl. *anchoring group*) nacházející se ve struktuře CAI. AG se k nukleofilu koordinovanému se zinkem váže pomocí vodíkové vazby. [1] Z toho vyplývá klíčový rozdíl oproti předchozímu mechanismu. CAI neinteraguje přímo se zinečnatým kationtem. [34] Vazbou na molekulu vody, vázanou na zinek, dochází k přerušení interakce mezi substrátem a aktivním místem. Aktivní místo je tímto mechanismem drženo v neaktivní formě. [43] AG následně tvoří vodíkovou vazbu se strážci brány, čímž se zesiluje ukotvení CAI v aktivním místě a brání normální katalytické aktivitě CA. Scaffold u těchto inhibitorů může interagovat s hydrofobní či hydrofilní částí aktivního místa, jak tomu bylo u zinek-vázajících CAIs. [1] Skelet CAI může obsahovat i tail, který je specifický vazbou na různé zbytky v jeho lokalitě, kterou je výstup z dutiny aktivního místa. Takto se zvyšuje selektivita izoforem CA. [34]



Obr. 7: Druhý mechanismus inhibice, převzato z [43]

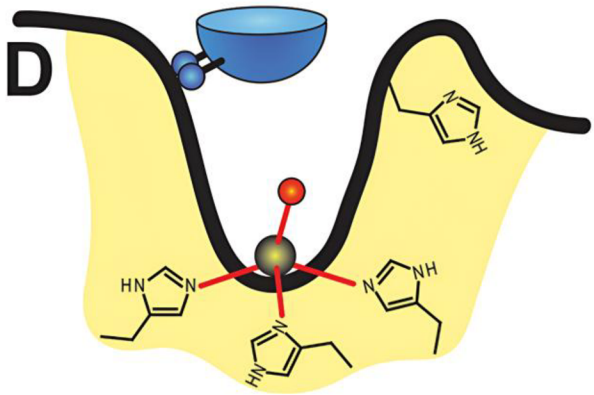
První sloučeninou zkoumanou pro tento mechanismus inhibice byl fenol. [50] Tento CAI se váže pomocí své hydroxylové skupiny vodíkovou vazbou na molekulu vody. [43] Pomocí rentgenové krystalografie bylo zjištěno, že ke stabilizaci komplexu enzym-inhibitor přispívá poloha aromatického kruhu fenolu. Nachází se v hydrofobní kapse aktivního místa, která je ohraničená AMK zbytky Val121, Val143, Leu198 a 197 a Trp209. [51, 52] Mezi další CAIs se řadí například některé karboxyláty, polyaminy, sulfokumariny a thioxokumariny nebo resorcinol. [43, 52]



Obr. 8: Druhý mechanismus inhibice – fenol, upraveno dle [51]

CAIs bránící vstup do aktivního místa

Tento způsob inhibice tkví v uzavření vstupu do aktivního místa pomocí CAIs, které se specificky vážou v jeho blízkosti. Tyto CAIs jsou vybaveny tzv. lepivou skupinu (dále jen SG, z angl. *sticky group*), jež se naváže na vstup a fyzicky znemožní přístup k aktivnímu místu. Z chemického pohledu SG může mít různou chemickou strukturu. Může se jednat například o heterocyklus, aromatické jádro nebo obyčejný alifatický cyklus. Mechanismus této inhibice byl poprvé popsán u přírodního kumarinu, jenž představuje modelový příklad takto působící sloučeniny. Charakteristickým znakem tohoto mechanismu je, že CAIs se vážou ve větší vzdálenosti od aktivního místa ve srovnání s prvním či druhým typem inhibičního mechanismu. Odůvodňuje se to tím, že různé izoformy α-CA jsou právě na tomto místě nejvíce variabilní. S tím souvisí také selektivita těchto CAIs. Dokáží totiž inhibovat pouze určitou izoformu enzymu, což je klíčové při vývoji léčiv. Díky tomu je možné cíleně ovlivnit požadovanou formu enzymu bez vedlejších účinků na jiné izoformy. [29, 34, 53]



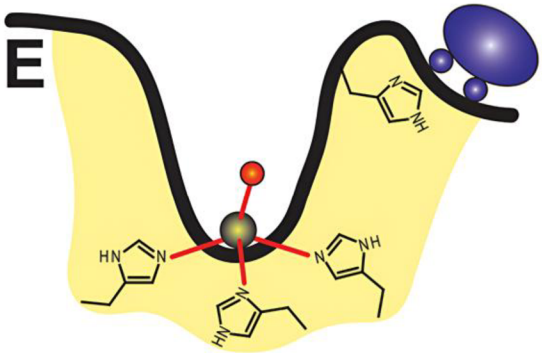
Obr. 9: Třetí mechanismus inhibice, převzato z [43]

CAIs vázající se mimo aktivní místo enzymu

Jediná dosud objevená sloučenina fungující mechanismem vazby mimo aktivní místo je 2-(benzylsulfonyl)-benzoová kyselina. Krystalografické studie z roku 2015 odhalily, že se tento CAI nevyskytoval v blízkosti aktivního místa, ale ve vazebné kapse hraničící s aktivním místem. Žádný jiný inhibitor nebyl v tomto prostoru identifikován. [29] Ve vazebné kapse je tento CAI stabilizován polárními interakcemi. Zejména tedy vodíkovými vazbami mezi karboxylovou skupinou CAI a AMK zbytky proteinu a molekulami vody. Dále je stabilizován van der Waalsovými interakcemi fenylového kruhu s okolními zbytky proteinu. [54]

Klíčovým prvkem tohoto mechanismu je AMK zbytek His64, který může existovat ve dvou konformačních stavech. His64 se nachází v hydrofilní části aktivního centra, jak bylo uvedeno výše. Jeho konformační flexibilita umožňuje efektivní přenos protonů z molekuly vody koordinované se zinkovým iontem do okolního prostředí. Pokud do

tohoto rychlost určujícího kroku zasáhne CAI, dochází k přerušení katalytického procesu. [29, 34, 55]



Obr. 10: Čtvrtý mechanismus inhibice, převzato z [43]

CAIs fungující neznámým mechanismem

Dosud nebyly provedeny úspěšné rentgenové krystalografické studie sloučenin, u kterých by se nahromadily důkazy, že mají jiný mechanismus inhibice než čtyři již popsané. Tento neúspěch je způsoben špatnou rozpustností těchto sloučenin, a proto nemohly být analyzovány krystalograficky v komplexu s enzymem. [34]

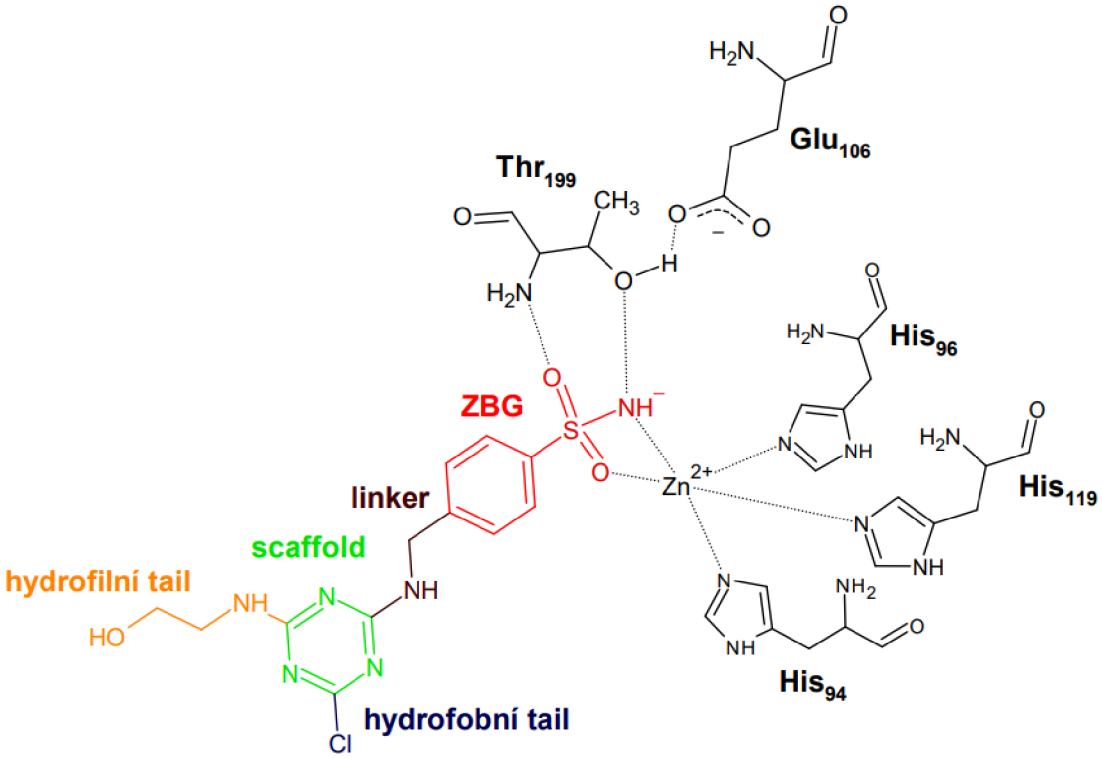
2.3 Vztah chemické struktury a biologického účinku CAIs

Vztah struktury a účinku (dále jen SAR, z angl. *structure-activity relationship*) je klíčem ke správnému pochopení výběru chemických látek používaných v této práci.

Pro zajištění korektní interpretace výsledků experimentů je nezbytné zahrnout také negativní kontrolu, tedy sloučeninu, která se strukturálně podobá testovaným látkám, avšak není aktivní. V této studii tuto roli plní sulfathiazol. Důvodem k jeho výběru je jeho struktura vyobrazená v tab. 2. Součástí jeho struktury je sulfonamidová funkční skupina, která je detekovaná jak u známým CAIs, tak potenciálních CAIs testovaných v této práci. Tato podobnost zajišťuje, že lze posoudit, zda biologické účinky testovaných sloučenin nejsou způsobeny pouze přítomností této skupiny, ale skutečně vyplývají z cílené interakce s aktivním místem enzymu. Na rozdíl od účinných CAIs však sulfathiazol nesplňuje další strukturní kritéria potřebná pro inhibici CA, a tudíž žádnou inhibiční aktivitu nevykazuje. Jeho začlenění do experimentálního návrhu tak umožňuje odlišit specifickou inhibici CA od nespecifických nebo falešně pozitivních interakcí. [56]

SAR slouží jako předpověď aktivity nových molekul dle jejich strukturních vlastností. [57] Vzhledem k velkému množství údajů, bylo možné objasnit hlavní strukturní faktory odpovědné za všechny vazby. [45]

Účinný CAI obsahuje ve své molekule tzv. farmakofor. Ten lze definovat jako soubor strukturních prvků molekuly specificky rozmístěných, umožňující vazbu na cílové místo s následným biologickým účinkem. [58] Pro návrh účinného CAI je farmakofor tvořen třemi klíčovými elementy. Konkrétně se jedná o ZBG, hydrofobní část scaffold, a tail. Jak bylo uvedeno výše, ZBG interaguje jak se zinečnatým iontem v aktivním místě enzymu, tak se strážci brány. Hydrofobní část inhibitoru je označovaná jako scaffold a tvoří základní kostru molekuly. Obvykle má aromatický nebo heterocyklický charakter a je k němu přímo připojen tail, jako postranní řetězec. Charakter tailu je buď polární nebo lipidový, což mu umožňuje interagovat s hydrofobní či hydrofilní částí aktivního místa CA. [59] Nově syntetizované inhibitory, testované v této práci, umožňující účinnou inhibici CA, jsou charakterem benzensulfonamidy. Jde o deriváty primárních sulfonamidů, které jsou charakterizovány obecným vzorcem $R–SO_2NH_2$. V případě benzensulfonamidů tvoří uhlovodíkový zbytek fenylový kruh, což definuje jejich základní strukturu a ovlivňuje jejich fyzikálně-chemické i biologické vlastnosti. [43, 65] SAR uplatněn na CAI 241 je vyobrazen na obr. 11.



Obr. 11: Potenciální CAI 241 interagující s aktivním místem CA, upraveno dle [60]

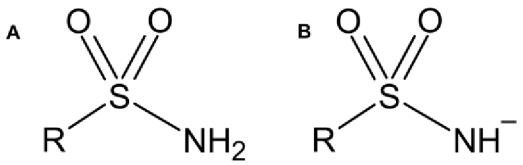
2.3.1 CAIs – klasické a neklasické

Sulfonamidy fungující jako CAIs

Hlavní třídu CAIs tvoří sulfonamidy, jenž jsou považované za klasické inhibitory. [29] Jedná se o nejvýznamnější třídu CAIs, neboť více než 25 sloučenin tohoto typu se již desítky let klinicky využívá v různých indikacích. [10, 46]

Sulfonamidy byly poprvé zkoumány na počátku 20. století, kdy si získaly pozornost díky svým antibiotickým vlastnostem. [45, 49] Ve třicátých letech 20. století byla zaznamenána účinnost proti streptokokovým infekcím u barviva Prontosil. Další výzkum ukázal, že Prontosil se metabolizuje na sulfanilamid, který je považován za aktivní složku odpovědnou za antibiotické účinky. [61] Zlom ve výzkumu CAs přišel v roce 1940, kdy vědci Mann a Keilen objevili u sulfanilamidu inhibiční vlastnosti vůči CA. Od té doby patří primární sulfonamidy mezi nejrozšířenější skupinu CAIs, která se dlouhodobě klinicky využívá. [45, 49]

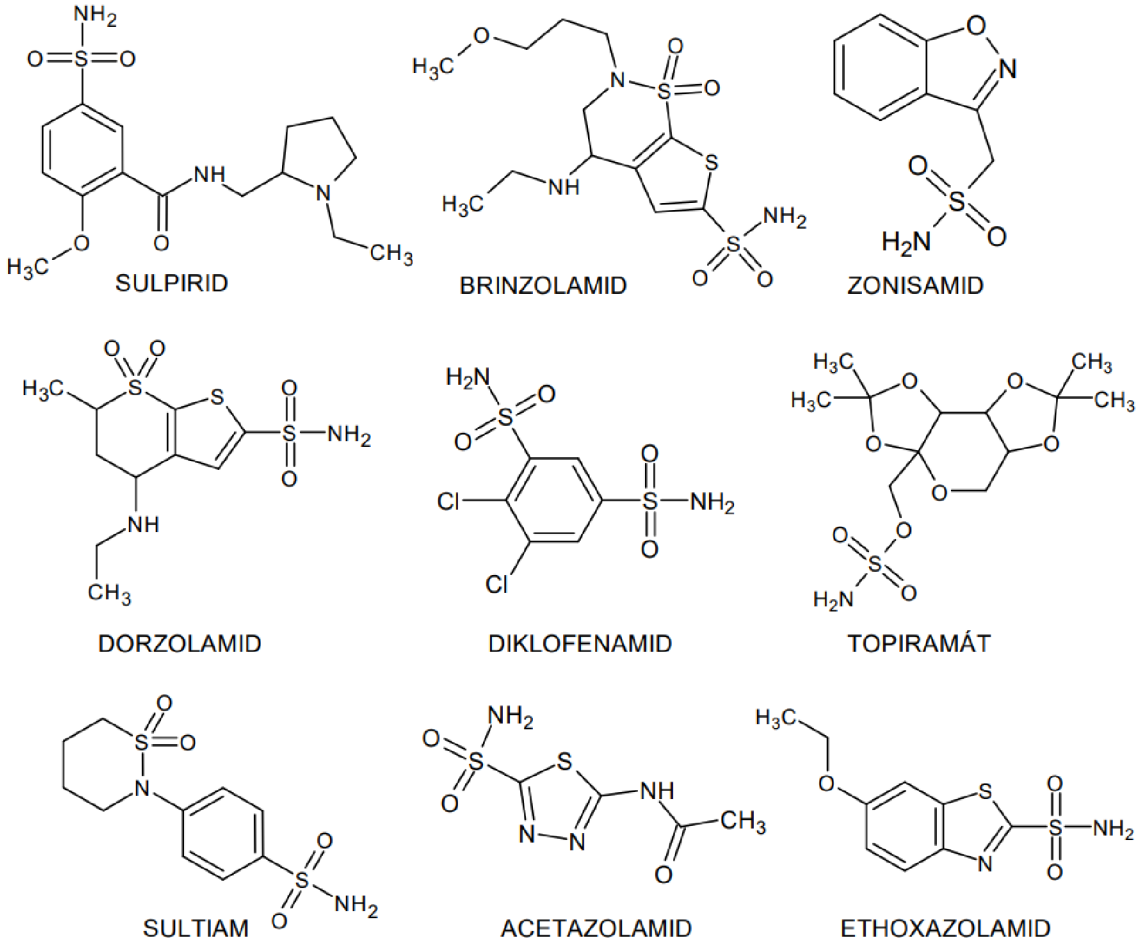
Primární sulfonamidy inhibují CA podle prvního inhibičního mechanismu. Součástí jejich molekuly je $-SO_2NH_2$ funkční skupina, která je v aktivním místě deprotonovaná. [45] Tento charakter je vyobrazen na obr. 12.



Obr. 12: A) Obecný vzorec sulfonamidů, B) deprotonovaná forma, vlastní tvorba

Následným vytěsněním molekuly vody se však naváže na zinečnatý iont podle tetraedrické geometrie. Stabilizaci komplexu doplňují vodíkové vazby s gate-keeping AMK zbytkem v okolí. Jedná se o Thr199, který je koordinován s Glu106 jeho karboxylovou částí. Díky tomu se hydroxylová skupina Thr199 stává lepším akceptorem vodíkových vazeb. K další stabilizaci přispívají interakce s hydrofilními či hydrofobními částmi aktivního místa, a to v závislosti na povaze scaffoldu. [45]

Nejstarším klinicky používaným sulfonamidem se stal acetazolamid. Koncem padesátých let 20. století zaznamenal acetazolamid. Stal se prvním nertuťovým diuretikem [21]. Další zástupci klinicky zaužívaných sulfonamidů jsou brinzolamid, dorzolamid, zonisamid, ethoxazolamid, diklofenamid, či sulpirid. Jejich indikace jsou různé, od glaukomu přes epilepsii, výškovou nemoc až po rakovinu [29, 62, 63]. Sulfonamidovou funkční skupinu mají i diuretika, jako například hydrochlorothiazid či furosemid [46].



Obr. 13: Chemické struktury používaných sulfonamidů, vlastní tvorba

Používání sulfonamidů jako diuretik vychází z poznatků o vysoké koncentraci CA v ledvinách. Jejich inhibice snižuje zpětnou reabsorpci sodíku a vody, což vede ke zvýšenému vylučování moči a odstranění přebytečných tekutin z těla. Systémové užívání sulfonamidových CAIs je spojeno i s vedlejšími účinky, které pramení z nízké selektivity vůči různým izoenzymům. Typicky se může jednat o únavu, celkovou malátnost, depresi, úbytek hmotnosti, podráždění GIT a u sulfonamidových diuretik se může objevovat metabolická acidóza či tvorba ledvinových kamenů. CAIs se i tak vyznačují dobrým bezpečnostním profilem, protože jejich nežádoucí účinky nebývají trvalé a lze je zvládnout vhodnou léčbou. Sulfonamidová skupina sama o sobě nemá žádnou specifickou strukturní vlastnost, která by umožnila cíleně blokovat pouze jeden konkrétní izoenzym CA a tím být selektivní. [21]

Glaukom je charakterizován jako oftalmologické neurodegenerativní onemocnění s rychlou progresí. Nedojde-li k zahájení léčby, nastane trvalé poškození očních nervů až trvalá slepota. Za tímto problémem stojí zvýšený nitrooční tlak způsobený narušenou rovnováhu mezi produkcí a odtokem nitrooční tekutiny. Regulace odtoku nitrooční tekutiny je zajištěna řasnatým tělískem, které se vyznačuje přítomností

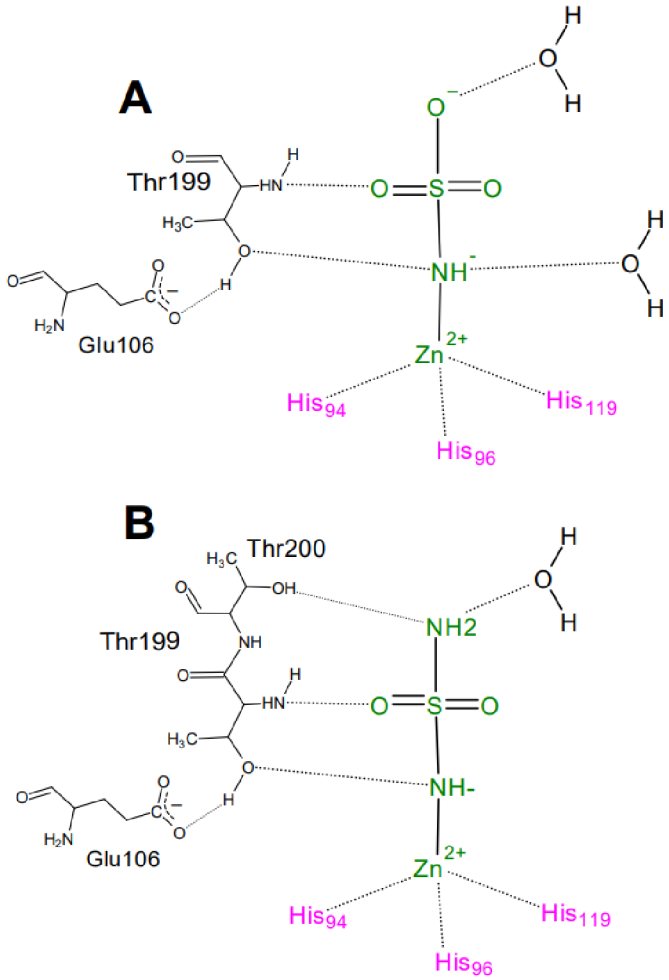
izoenzymů hCA II, IV a XII. Produkce nitrooční tekutiny je závislá na tvorbě HCO_3^-, jehož tvorbu řídí CA. Proto byly systémově podávané CAIs na bázi sulfonamidů používány jako léčba první volby při terapii glaukomu touto cestou. Překážkou byly vedlejší účinky související se systémovým podáváním a účinkem na všechny izoformy CAs.

Do druhé linie nastoupily lokálně podávané CAIs – dorzolamid a brinzolamid. Bohužel se u nich také objevily závažnější nežádoucí účinky, a tak bylo stále zapotřebí vyvinout nové typy lokálních CAIs. Při vývoji byl využit tail přístup, který je popsán v 2.3.3. Došlo k navázání hydrofilní části jako tailu na scaffold. Nové deriváty se vyznačovaly déle trvajícím účinkem, dobrou rozpustností ve vodě, dobrou penetrací rohovkou a účinnou inhibicí CA. [21, 64]

Sulfonamidy se vyznačují také antikonvulzivním účinkem. Díky inhibici CA II, VII a XIV dojde ke zvýšení hladiny CO_2 v mozku, čímž se sníží excitabilita neuronů, stabilizuje se jejich aktivita a zvýší se práh pro vznik záchvatů. Sultiam, který je předepisován dodnes, se běžně používá při léčbě dětské epilepsie, podobně jako zonisamid. [21]

Co se týče použití inhibitorů CA v protinádorové terapii, průlomem bylo zjištění, že jsou CAs obsaženy v solidních nádorech. Jde konkrétně o hCA IX a XII, které pomáhají nádorům přežít hypoxii. Proto je inhibice hCA IX a XII významně zkoumána. [21] V léčbě infekcí mají sulfonamidy taktéž místo, a to především benzensulfonamidy, protože hrají roli v léčbě malárie. [21] Tato skupina je popsána níže.

Mezi další inhibitory CA se řadí bioizostery sulfonamidů, a to sulfamáty a sulfamidy. Jejich obecný vzorec je vyobrazen na obr. 14 je $R–OSO_2NH_2$, resp. $R–NHSO_2NH_2$. [45]

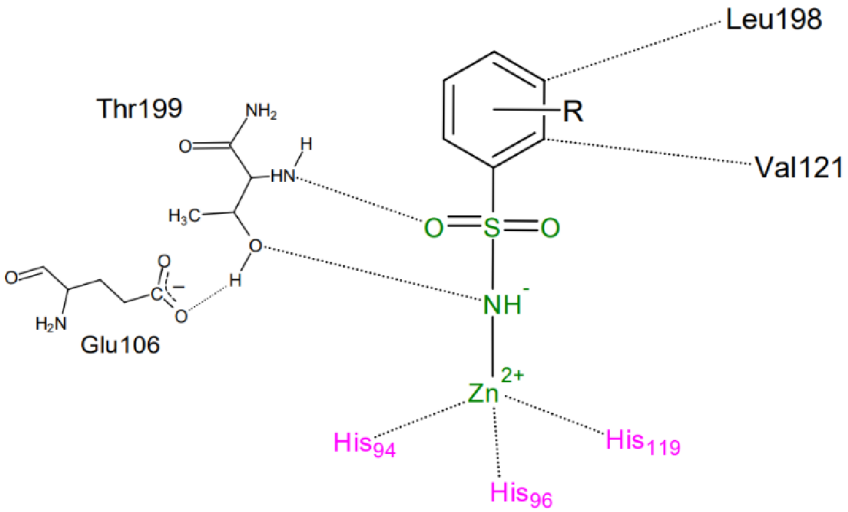


Obr. 14: A) Sulfamát, B) sulfamid v aktivním místě CA, upraveno dle [45]

Jedná se o třídu sulfonamidových derivátů, jenž umožňují slibnou cestu ve vývoji nových CAIs s vysokou schopností se vázat na enzym. [21] Poprvé se o nich svět dozvěděl od vědců Marena a Maryanoffa. V literatuře existuje mnoho sloučenin se scaffoldem těchto funkčních skupin, u nichž byla potvrzena inhibiční aktivita směrem k CA. Do klinické praxe se dostala látka používaná k léčbě epilepsie a obezity, a to β-D-fruktopyranosulfamát topiramát. [45] Antiobezický účinek topiramátu je podmíněn inhibicí mitochondriálních izoforem CA, konkrétně CA VA a VB, což vede k ovlivnění metabolismu klíčových metabolitů, jako je pyruvát či acetát. [21]

Benzensulfonamidy jsou deriváty primárních sulfonamidů, jenž jsou charakterizované obecným vzorcem R–SO_2NH_2. Benzensulfonamidy jsou definovány přítomností fenylového kruhu jako uhlovodíkového zbytku. Právě fenylový kruh, jeho možná substituce do ortho, meta či para poloh a silné interakce s enzymem, je činí klíčovými sloučeninami při vývoji CAIs. Sulfonamidová část ve své deprotonované podobě tvoří koordinační vazbu přes dusík se zinkem v aktivním místě a k tomu dvě vodíkové vazby s hydrofilním AMK zbytkem Thr199, který je koordinován s Glu106. Fenylový kruh je

hydrofobní a interaguje se střední částí aktivního místa, konkrétně s AMK zbytky Leu198 a Val121. [43, 65, 66] Struktura benzensulfonamidů při interakci s aktivním místem enzymu je vyobrazená na obr. 15.



Obr. 15: Benzensulfonamid v aktivním místě CA, upraveno dle [43]

Neklasické CAIs

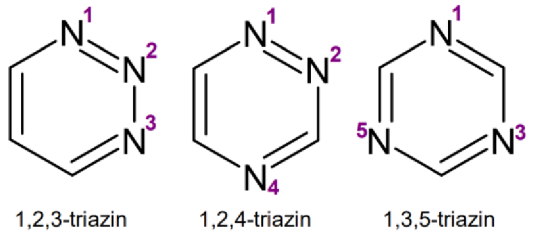
Identifikace neklasických CAIs představuje významný pokrok v cílené modulaci enzymatické aktivity. Tyto sloučeniny přesahují rámec klasických sulfonamidů a jejich derivátů. Vývoj těchto sloučenin je motivován několika faktory. Jedním z nich je alergie na sulfonamidy, která postihuje přibližně 3–6 % populace. Dalším problémem jsou nespecifické vazby klasických inhibitorů na různé izoformy CA, což často vede k vedlejším účinkům. Důležitým impulzem je také potřeba selektivně inhibovat konkrétní izoformy enzymu, které se podílejí na různých patologických procesech. [18, 29]

Mezi hlavní třídy neklasických inhibitorů patří fenoly, nitroimidazol, kumariny, 2-thioxokumariny, sulfokumariny, polyaminy, karboxylové kyseliny a jejich deriváty či fullereny. Paradoxem je, že nitroimidazoly vykazují inhibiční účinek vůči CA pouze tehdy, pokud obsahují sulfonamidové, sulfamátové nebo sulfamidové skupiny. Fenoly inhibují CA vazbou na atom zinku v aktivním místě prostřednictvím vodíkové vazby, čímž blokují vazbu oxidu uhličitého. Mají různé afinity k jednotlivým izoformám a některé fenolové přírodní produkty vykazují selektivitu k CA VII a antioxidační aktivitu, což naznačuje jejich potenciál pro léčbu neurodegenerativních onemocnění. Polyaminy, které cílí na extracelulární CA izoformy (CA IX a CA XII) spojené s nádory, se vážou přes terminální amoniovou skupinu. Karboxylové kyseliny inhibují CA přímou vazbou na zinek nebo blokádou protonového transportu a umožňují selektivní inhibici izoforem. Jejich chemická variabilita umožňuje selektivní interakce s unikátními zbytky aktivního místa jednotlivých izoforem, což umožňuje design inhibitorů s vysokou specificitou. Kumariny fungují jako proléčiva, která v hydrolyzované formě blokují

aktivní místo, přičemž některé deriváty selektivně inhibují nádorové izoformy CA IX a CA XII. Sulfokumariny a 2-thioxokumariny vážou CA prostřednictvím sulfonové kyseliny či síry a vykazují selektivitu pro určité izoformy. Fullereny pak pravděpodobně inhibují CA blokací vstupu substrátu do aktivního místa. [18, 29]

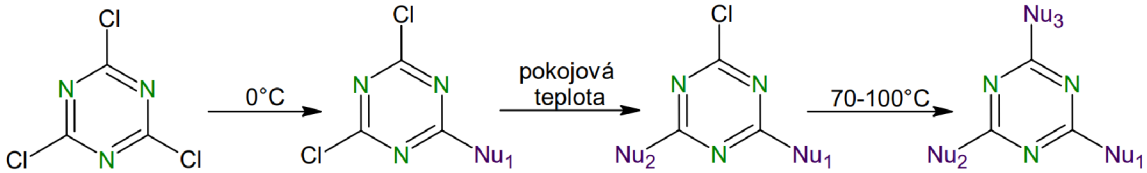
2.3.2 Triazinová struktura u potenciální CAIs

V této práci jsou studovány jako potenciální CAIs sloučeniny obsahující heteroaromatický triazinový scaffold. Triazinový kruh je šestičlenná heterocyklická konjugovaná sloučenina obsahující tři heteroatomy dusíku, jimiž jsou nahrazeny tři atomy uhlíku. Existují tři izomery triazinu lišící se dle polohy dusíků, a to vicinální 1,2,3-triazin, asymetrický 1,2,4-triazin a nejprozkoumanější v oblasti CAI symetrický 1,3,5-triazin, taktéž znám jako *s*-triazin (z angl. *symmetrical triazine*). [67, 68]



Obr. 16: Chemické struktury izomerů triazinu, vlastní tvorba

Triaziny jsou charakteristické slabě bazickými vlastnostmi. Oproti benzenu, který má stabilní delokalizaci elektronů, mají triaziny nižší rezonanční energii kvůli přítomnosti dusíkatých heteroatomů. Tato vlastnost způsobuje, že budou triaziny upřednostňovat nukleofilní reakce a ne elektrofilní, které jsou typické pro benzen. [67] Klíčovou sloučeninou při syntéze derivátů triazinu je kyanurchlorid neboli 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazin (dále jen TCT). Jedná se o ekonomicky dostupnou sloučeninu s vlastností vysoké reaktivity. Umožňuje selektivní nukleofilní substituci chlorů za různé nukleofily na všech třech pozicích. Z toho plyne velké množství různých sloučenin takto syntetizovaných s různými biologickými účinky v různých indikacích. [69–71] Stupňovitá nukleofilní substituce probíhá ve třech krocích, přičemž každý krok je závislý na specifických podmínkách reakce. První substituce probíhá při nízké teplotě (0–5 °C), druhá substituce proběhne při pokojové teplotě a třetí substituce vyžaduje vyšší teplotu, a to 70–100 °C. [69, 70, 72]



Obr. 17: Stupňovitá nukleofilní substituce TCT, upraveno dle [69]

Vicinální triazinová struktura je nejméně probádaná. Klinicky jsou však její deriváty studovány díky silné účinnosti a minimálním vedlejším účinkům. Známé příklady léčiv s touto strukturou jsou tubercidin, toyokamycin, sangivamycin. Tubercidin je nukleosidový analog, který inhibuje růst různých bakteriálních kmenů. Toyocamycin patří mezi antineoplastická antibiotikum s cílenou protinádorovou aktivitou. Sangivamycin je účinný proti leukemickým buňkám L1210 a P338 a také proti Lewisovu karcinomu plic. [73]

Z trojice izomerů triazinu vykazují nejvyšší protinádorovou aktivitu právě deriváty asymetrického 1,2,4-triazinu. Při správné úpravě jeho struktury mohou cílit na specifické biologické procesy. Zajímavé jsou benzotriaziny a heterocyklické 1,2,4-triaziny. Blokaci enzymů, podporující proliferaci nádorových buněk jako je cyklin-dependentní kináza 2 či Brutonova tyrosinkinása, umožňují i nekondenzované 1,2,4-triaziny. [74]

Symetrie *s*-triazinu umožňuje různé modifikace struktury vedoucí k řadě derivátům. Ty mají pak různé biologické účinky – antibakteriální, antimikrobiální, antiprotozoální, protinádorové, analgetické či antidepresivní. To vedlo k tomu, že *s*-triazin je součástí mnoha schválených léčiv, jedním z příkladů je Azacitidin, registrovaný v České republice. *S*-triazin má zastoupení i v zemědělství, jelikož je součástí struktur herbicidů, jako je atrazin, simazin, terbutylazin a mnoho dalších. [75, 76] Atraktivita 1,3,5-triazinu spočívá v odlišné reaktivitě atomů chloru v pozicích 2-, 4-, a 6-, která je ovlivněna teplotou. Tím se otevírá možnost řízeného zavádění různých substituentů a efektivní přípravy mono-, di- nebo tri- substituovaných 1,3,5-triazinů. [68]

2.3.3 Vývoj potenciálních CAI

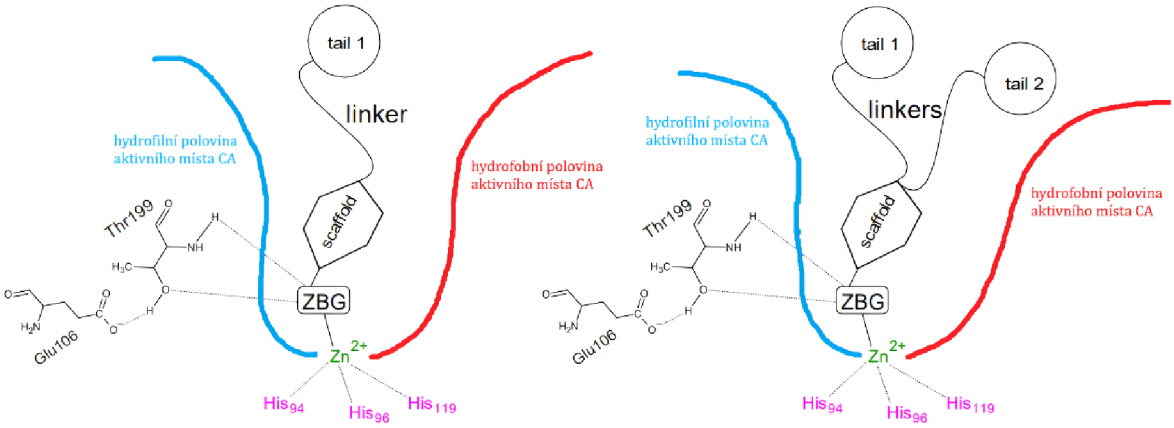
K návrhu nových inhibitorů karboanhydrázy se tradičně využívají tři hlavní přístupy: tail přístup, kruhový přístup a přístup cukrem.

Tail přístup

V rámci navrhování nových potenciálních CAIs je důležité překonat nedostatek v podobné architektuře aktivního místa CA. Tento fakt ztěžuje a zpomaluje vývoj izoformně selektivních CAIs. [32] Snaha o překonání této slabiny vedla k navržení nové strategie řešení tohoto problému, tzv. tail přístup (z angl. *tail approach*). Spočívá v připojování chemických tailů (jednoho i více) neboli mnoha chemických funkčních skupin na scaffold, se kterým jsou spojené přímo nebo propojené pomocí tzv. linkerů (z angl. *linkers*). Navázané funkční skupiny poté interagují se střední nebo vnější částí aktivního místa. Tam se nacházejí AMK zbytky. A právě vnější část aktivního místa vykazuje největší rozdíly mezi různými izoformami CA. Tím se zvyšuje selektivita CAI a snižují se možné vedlejší účinky vedoucí z neselektivity. [43] Proto změna chemické povahy či rozměrů tailů otevírá cestu k návrhu nových a selektivních CAIs. Jedny z prvních izoformně selektivních sulfonamidových CAIs a zároveň membránám nepropustné, byly inhibitory, jejichž tails byly substituované pyridinovým zbytkem. [32]

Původně byl tento tail přístup zaměřen na vývoj již zmiňovaných sulfonamidových CAIs, ale postupem času se začal využívat u ostatních CAIs, jenž měly již prozkoumaný mechanismus inhibice. [32] Supuranova vědecká skupina (*Florentská univerzita, Katedra Neurofarba, Sesto Fiorentino, Itálie*) zavedla tail přístup do praxe při vývoji nových CAIs na počátku desetiletí. [32] Na jeho práci navázal Tanpure a jeho skupina (*Institut Eskitis pro výzkum léčiv, Griffithova univerzita, Nathan, Queensland, Austrálie*), když zavedl nový design, a to se dvěma taily [77]. Třetí tail přidal v roce 2020 Bonardi s jeho kolegy (*Florentská univerzita, Katedra Neurofarba, Sesto Fiorentino, Itálie*) [78]. Výhodou tří tailů s různou chemickou povahou je zacílení na různá místa aktivního místa CA. Jeden z nich může být hydrofilní a interagovat s hydrofilní částí. [78] Druhý tail může být hydrofobního charakteru a vázat se na hydrofobní část, zatímco třetí tail může interakce posilovat nebo zacílit na specifickou část enzymu. [32]

Přestože byl tento přístup popsán teprve nedávno a dosud nevedl k vývoji klinicky schváleného léčiva, jeho zavedení výrazně posunulo výzkum v oblasti CAIs a překonalo omezení kruhového přístupu. [29] Úspěšnost této metody byla ohlášena při tvorbě inhibitorů specifických pro izoformy a nedávno byla potvrzena návrhem SLC-0111, inhibitoru CA IX, jenž je nyní předmětem klinických studií zaměřených na léčbu rakoviny prsu. [18]



Obr. 18: Tail přístup, upraveno dle [43]

Kruhový přístup

Principem kruhového přístupu (z angl. *ring approach*) bylo zkoumání velkého množství kruhových struktur, které byly navázány na ZBG sulfonamidovou skupinu. Ačkoli byla analyzována řada kruhových struktur, přinesla přínosné výsledky pouze v oblasti topických antiglaukomatik. Výzkum vedl k objevu acetazolamidu, brinzolamidu a dorzolamidu, které jsou indikované k léčbě glaukomu, epilepsie či výškové nemoci. Nevýhodou těchto inhibitorů je nízká rozpustnost ve vodě. [49, 59]

Oba přístupy představují důležité strategie, které se nejen vzájemně doplňují, ale jejich kombinace může vést k zásadnímu zlepšení terapeutických vlastností. Například u dorzolamidu bylo prokázáno, že jeho modifikace prostřednictvím tail přístupu vede k vývoji účinnějších sloučenin snižující nitrooční tlak. [29]

Přístup cukru

Jedním z nejnovějších přístupů ve vývoji je přístup cukru (z angl. *sugar approach*). Tento koncept se zaměřuje na selektivní inhibici protinádorových izoforem CA. Principem je začlenění sacharidové části jako hydrofilního tailu do struktury CAI. Klasické CAIs snadno pronikají do buněk, a proto méně inhibují extracelulární izoformy. Cukerný tail zvyšuje hydrofilitu molekuly, která pak hůře prostupuje buněčnými membránami a zůstává v extracelulárním prostoru. Právě zde se nacházejí tumorogenní izoformy. Takto selektivní CAIs pak méně působí na zdravé buňky. [59]

2.4 Analytické metody

Bylo vyvinuto již velké množství analytických metod pro měření aktivity CA a jejich inhibitorů. V následujících podkapitolách jsou představeny ty nejčastěji používané metody nebo nejznámější přístupy [79].

2.4.1 Wilbur-Andersonův test

Wilbur-Andersonův test je historicky první metoda používaná k měření aktivity CA. Jde o elektrometrickou metodu sledující změnu pH, kterou způsobí aktivita enzymu. Konkrétně měří, jak dlouho trvá pokles pH z 8,3 na 6,3 při teplotě 0 °C v reakční směsi. Čím kratší je tento čas, tím aktivnější je enzym. Je založena na kombinaci elektrometrické a kolorimetrické metody. [79]

Elektrometrická metoda spočívá ve vhánění veronalového pufru a nasyceného roztoku CO_2 automatickými dávkovacími stříkačkami do reakční nádoby při teplotě 0–3 °C. Následná změna pH je měřená skleněnými pH elektrodami. Sledují se změny pH nebo čas potřebný k dosažení hodnoty 6,3. Tato hodnota pH je ideální koncový bod z několika důvodů. Poskytuje totiž ideální podmínky pro přesné stanovení enzymové aktivity, protože pufrovací kapacita je nízká a nebrzdí změnu pH. Dále tato hodnota pH odpovídá koncovému bodu kolorimetrické metody, jenž umožní srovnání elektrometrické a kolorimetrické metody. Také to umožňuje reprodukovatelnost Wilbur-Andersonovy metody. [79, 80]

Nevýhodou této reakce je, že probíhá za specifických teplotních podmínek, a to 0–3 °C, což neodpovídá přirozeným podmínkám, ve kterých enzymy vykazují optimální aktivitu. Proto výsledky získané v podmínkách blízkých bodu mrazu nemusí být relevantní pro pochopení chování enzymů v živých systémech. CA je navíc termolabilní enzym, což znamená, že její aktivita je ovlivněna teplotou. Autoři Wilbur-Andersonova

testu zvolili toto teplotní rozmezí z důvodu zvýšení rozpustnosti CO_2 a zajištění tak dostatečné koncentrace substrátu pro enzymovou reakci. [79, 80]

Kolorimetrickou metodu Wilbur a Anderson provedli na základě poznatků vědců Roughtona a Bootha. Po smíchání pufru, enzymu a CO_2 dochází ke změně barvy roztoku, ta se porovnává s referenčním roztokem. Aktivita CA je hodnocena na základě času potřebného k dosažení barevné shody s referenčním vzorkem. Platí stejný klíč vyhodnocení jako u elektrometrické metody, čím kratší čas, tím vyšší enzymová aktivita. Jelikož Wilbur s Andersonem zkoumali inhibiční účinek indikátorů na aktivitu CA, tak jejich výsledky ukázaly, že míra inhibice CA indikátory závisí na koncentraci enzymu a zdroji enzymu. Z tohoto důvodu je potřeba brát v potaz i možný inhibiční účinek indikátorů při používání kolorimetrických metod. [79, 80]

Původní metoda měla řadu omezení, která vedla vědce k její úpravě. Cílem modifikace základní Wilbur-Andersonovy metody je eliminovat některé její nedostatky a celkově zjednodušit a zrychlit metodu. Základním rozdílem je kontinuální měření změn pH pomocí pH metru s kontinuální záznamem dat, jako jediného použitého analytického přístroje. Měření probíhalo v prostředí pokojové teploty (25 °C) a bylo provázeno za kontinuálního sycení roztokem oxidem uhličitým. Úprava teploty znamenala realističtější měření aktivity enzymu. Zvýšením teploty se zvýšila tedy i aktivita enzymu a bylo potřeba prodloužit čas potřebný pro pokles pH, čehož se dosáhlo zvýšením koncentrace pufrovacího systému z 20 na 100 mM. CO_2 byl kontinuálně přidáván z důvodu omezené rozpustnosti ve vodě a pokud by byl podán jednorázově, brzy by byl spotřebován. Kontinuálním sycením se zajistila stálá dostupnost CO_2 pro enzymovou reakci. [79]

Modifikace metody umožnila matematické modelování kinetiky reakce a srovnání s původním testem. Naměřená data byla převedena na koncentraci hydrogenuhličitanu pomocí matematického přepočtu, jenž využívá vztah mezi pH a množstvím vzniklých protonů. To poté umožňuje stanovit aktivitu enzymu určením skutečného množství přeměněného CO_2. Aby bylo možné zjistit, jak efektivně enzym pracuje, je nutné ho porovnat se standardním referenčním enzymem. Pro objektivní zhodnocení je využívána bovinní CA. Její aktivita je známá z původního W-A testu a je vyjádřena ve Wilbur-Andersonových jednotkách (dále jen WAU, z angl. *Wilbur-Anderson units*). WAU se vypočítá podle vzorce (2), kde t_0 je doba poklesu pH v nekatalyzované reakci a t je doba

$$WAU = \frac{t_0 - t}{t} \tag{2}$$

poklesu pH s enzymem. [81]

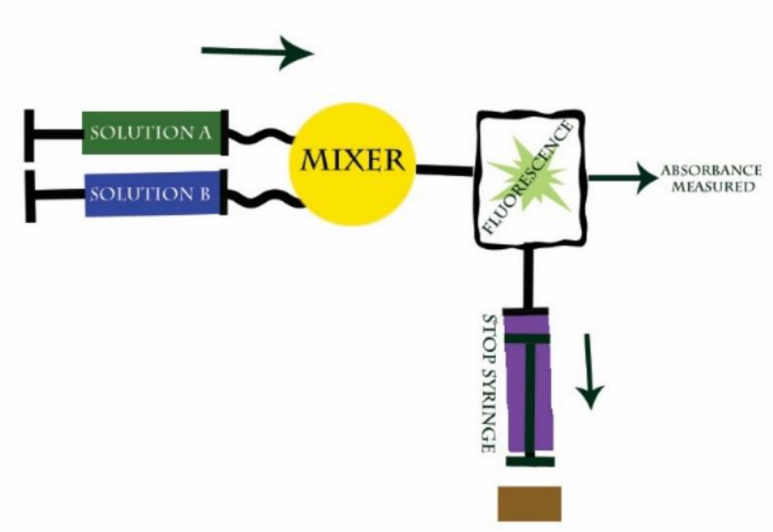
Sdílený nedostatek mezi modifikovanou a normální Wilbur-Andersonovou metodou je, že pH během celého testu není konstantní. Ale i přes to je tato metoda v laboratořích využívána pro rychlou kontrolu nebo porovnání účinnosti konverze CO_2 u různých CA. [79, 81]

2.4.2 Esterázový test

Esterázová metoda patří do kategorie kolorimetrických metod. Umožňuje rychle stanovit aktivitu CA, ale pouze třídy α-CAs, jelikož ta jako jediná vykazuje esterázovou aktivitu. Tato vlastnost je však pouze vedlejší funkcí této třídy, ne všechny ji mají. Metoda tedy využívá schopnosti α-CAs hydrolyzovat estery. Substrátem použitým v této metodě je 4-nitrofenylacetát. Pokud je α-CA aktivní, dokáže p-NPA hydrolyzovat na p-nitrofenol, který absorbuje světlo a je možné ho detekovat spektrofotometrem. Důležité je zmínit, že tato metoda se zaměřuje na vedlejší funkci CA, a neměla by proto ekvivalentně nahrazovat klasické metody zaměřené na hlavní funkci CA, tedy hydrataci CO_2. [79, 81]

2.4.3 Stopped-flow metoda

Stopped-flow metoda spadá do kategorie kinetických metod. Umožňuje studium rychlých enzymatických reakcí. Metoda umožňuje určit rychlost enzymatické reakce. Je využívaná pro jednoduché stanovení kinetických parametrů, jako například K_{cat} a K_M, prostřednictvím měření počáteční rychlosti reakce při různých koncentracích substrátu. V případě CA lze pomocí této metody analyzovat počáteční hydrataci CO_2. Mezi nevýhody této metody patří velká finanční náročnost, protože vyžaduje speciální přístroj, a to spektrofotometr umožňující zastavení toku. [81] V principu jde o rychlé smíchání dvou reakčních roztoků. Každý roztok je umístěn zvlášť ve své hnací stříkačce, ze které jsou rychle vháněny do míchací komůrky, kde dojde k jejich promíchání. Ihned poté dojde k zastavení toku, pomocí zastavovací stříkačky, aby směs zůstala v detekční komoře. K tomu dochází, aby mohla proběhnout důkladná analýza. Může dojít k měření fyzikálních vlastností, především pomocí spektrofotometrie nebo fluorimetrie. Metoda stopped-flow umožňuje simultánní zaznamenání časového průběhu reakce. Bez zastavení toku by bylo měření ovlivněno přítokem dalších reagentů. Mezi hlavní výhody této metody se řadí možnost automatizace, potřeba pouze malého objemu vzorků, přesný čas zahájení reakce či vysoká reprodukovatelnost. [81, 82]



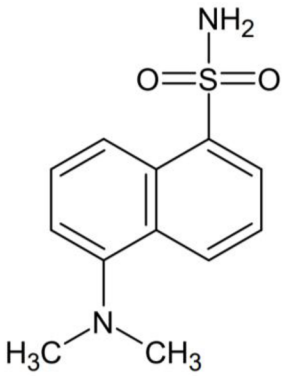
Obr. 19: Schéma stopped–flow aparatury, převzato z [83]

2.4.4 Fluorescenční metody

Detekce CAI může probíhat pomocí různých testů, přičemž testy popsané níže jsou založené na změně fluorescence jako hlavním detekčním přístupem indikujícím vazebnou interakci.

Fluorescenční metoda FRET

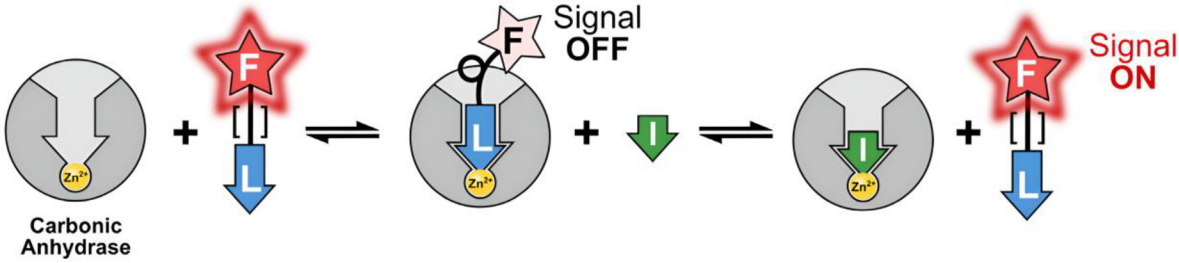
FRET neboli fluorescenční rezonance energetického přenosu se může využívat ke sledování vazby sulfonamidů jako inhibitorů na CA. Funguje na principu přenosu světelné energie mezi donorem a akceptorem. Donorem v tomto experimentu je AMK tryptofan enzymu CA. Akceptorem je dansylamid (dále jen DNSA), který obsahuje sulfonamidovou skupinu. Tryptofan je přírodní fluoreskující látka. Když na enzym není navázáno nic, po ozáření vidíme fluorescenci pouze enzymu CA. Pokud je však v blízkosti (do 10 nm) AMK akceptor, tedy DNSA, absorbuje jeho energii a změní se fluorescence. Díky této vlastnosti lze zjistit sílu navázání DNSA na enzym. Další fází je možnost následného navázání inhibitoru, například acetazolamidu, který sám o sobě nemá fluorescenční vlastnosti, avšak je silným inhibitorem. Dojde ke kompetici s DNSA o vazebné místo enzymu a acetazolamid DNSA postupně vytěsní z vazby. Tím dochází k poklesu fluorescence. Rychlost poklesu fluorescence umožní nepřímo určit, jak silně se acetazolamid na enzym váže, a to pomocí vypočítání disociační konstanty. [84] Autoři této metody navazují na dřívější studii, která využívala také DNSA k detekci CA, ale na základě tvorby fluorescenčního komplexu a sloužila k rychlé citlivé rutinní detekci aktivity CA. [85]



Obr. 20: Chemická struktura DNSA, vlastní tvorba

Modifikovaná fluorescenční metoda na principu vytěsňování indikátoru

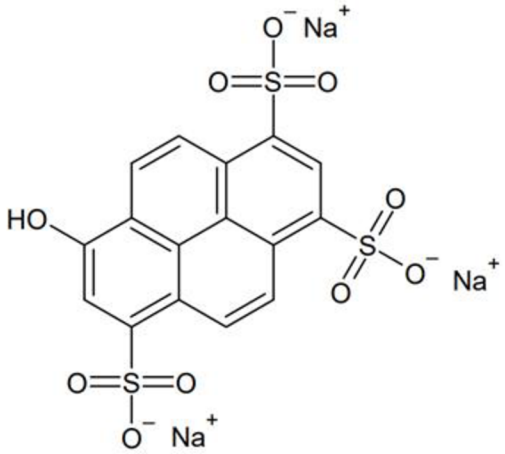
Tato metoda se primárně zaměřuje na kvantifikaci CAIs. Její princip je založen na kompetitivním vytěsnění fluorescenčního indikátoru inhibitorem CA. V rámci tohoto testu je využíván fluorescenční indikátor sloužící k optické detekci vazebné interakce s enzymem. Fluorescenční indikátor byl vytvořen spojením sulfonamidového ligandu a fluorescenčního barviva, tzv. fluoroforu. Sulfonamidová skupina má vysokou afinitu k aktivnímu místu CA. Fluorofor vykazuje proměnlivost ve fluorescenci v závislosti na tom, zda je indikátor navázán na enzym nebo je volný v roztoku. Pokud je fluorescenční indikátor volný v roztoku, který je převážně hydrofilní, je charakterizován vysokou fluorescencí a je v tzv. „on" stavu. Při navázání indikátoru na aktivní místo CA dochází ke změně prostředí vedoucí k výraznému potlačení fluorescenční aktivity a přechodu do „off" stavu. Následně může být na CA navázán inhibitor s potenciálem vytěsnit indikátor. Podle jeho afinity k aktivnímu místu má schopnost vytěsnit indikátor zpět do volného roztoku. Vytěsnění indikátoru znamená obnovení fluorescenční aktivity. Měření změn fluorescence poskytuje způsob stanovení vazebné síly inhibitorů CA. Z tohoto důvodu může být tento test použit k predikci inhibiční účinnosti nových CAIs. Na základě výsledků tohoto testu vykrystalizovaly jako nejsilnější inhibitory ethoxazolamid a brinzolamid. [86]



Obr. 21: Návrh fluorescenčního testu založeného na vytěsňování indikátoru inhibitorem z vazby s enzymem, převzato z [86]

Fluorescenční test spojený se stopped-flow metodou

Jedná se o rychlé měření, které využívá stopped-flow metodu a velice citlivý fluorescenční indikátor. Jedním z nich je například 8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfát, tzv. pyranin.



Obr. 22: Chemická struktura pyraninu, vlastní tvorba

Pyranin mění svou fluorescenci v závislosti na pH. Největší změny fluorescence vykazuje v rozmezí pH 6,5–8,0. Díky přítomnosti hydrofilních skupin ve své struktuře silně fluoreskuje při vyšším pH než 8, naopak při nižším pH než 6,5 jeho fluorescenční schopnost klesá. Díky spektrofluorometru se zastaveným tokem lze účinně smíchat dva roztoky. Jeden roztok s pH 8,0 obsahující hydrogenuhličitan a druhý roztok s pH 6,5 obsahující enzym CA a pyranin. Po smíchání začne CA pracovat, tedy katalyzovat přeměnu hydrogenuhličitanu na oxid uhličitý a vodu, což vede ke změně pH. Pyranin tuto změnu detekuje tím, že změní svou fluorescenci. To umožní analyzovat kinetiku enzymu a určit jeho aktivitu. Klíčovým principem je pak to, že čím rychleji se pH mění, tím vyšší aktivitu enzym vykazuje. [87]

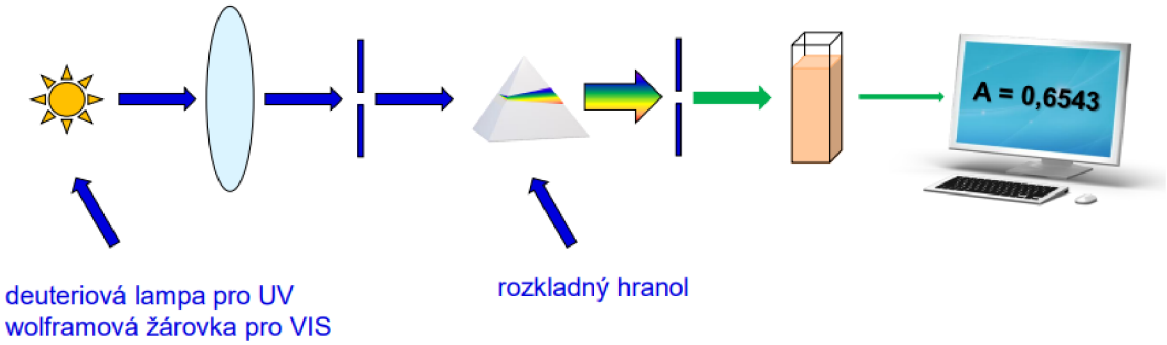
2.5 Metodika experimentu

2.5.1 Princip metody experimentu

Metoda experimentu v této práci využívá ke sledování reakce barevné změny pH indikátoru, jenž jsou závislé na změně pH, a jsou měřeny pomocí spektrofotometru. Dalo by se i říci, že jde o modifikovanou Wilbur-Andersonovu metodu. Rozdílnost je především v tom, že není pH měřeno přímo pH metrem v reakčním roztoku. A samozřejmě není reakce prováděna při teplotě 0 °C. [81]

2.5.2 UV/Vis spektrofotometrie

Absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti patří mezi základní analytické metody. Opírá se o schopnost atomů, iontů a molekul absorbovat světlo v určitém spektrálním rozsahu, konkrétně mezi 180–400 nm v ultrafialové oblasti a 400–800 nm ve viditelné oblasti. Světlo je totiž forma elektromagnetického záření, které se šíří ve vlnách. Absorpce světla způsobuje excitaci elektronů, tedy jejich přechod z nižších energetických hladin na vyšší, do tzv. excitovaného stavu. Princip měření spočívá v ozáření vzorku a následně je sledováno, kolik světla je látkou pohlceno, odraženo a kolik jí projde. Na základě množství absorbovaného světla látkou lze získat informace o vlastnostech této analyzované látky. Například její koncentraci nebo chemické složení. [88, 89]



Obr. 23: Schéma spektrofotometru, převzato z [90]

Pro měření v UV/Vis oblasti se používají spektrofotometry. Obecné schéma takového zařízení je znázorněno na obr. 23. Spektrofotometr se obvykle skládá ze světelného zdroje, monochromátoru, čočky nebo zrcadla, kyvety, detektoru a řídicího počítačového systému. V případě dvou světelných zdrojů se pro UV oblast běžně používá deuteriová lampa, zatímco pro viditelnou oblast slouží wolfram-halogenová lampa. Optimálním řešením je xenonová lampa, která pokrývá jak ultrafialové, tak viditelné spektrum. [88] Monochromátor je optické zařízení, které slouží k tomu, aby z polychromatického záření vybral pouze úzké spektrum. Jinými slovy, z vícebarevného záření vybere pouze jednu konkrétní, např. nastavenou, vlnovou délku, čímž vzniká monochromatické záření. Skládá se ze vstupní štěrbiny, difrakční mřížky či hranolu a výstupní štěrbiny. [91] Čočka nebo zrcadlo se využívají k vedení světla spektrofotometrem, nebo mohou rozdělovat jeden světelný paprsek na dva. [88] Analyzovaný vzorek je umístěn nejčastěji v křemenné kyvetě. Materiálem je schválně křemen, jelikož normální sklo by UV světlo nepropustilo. Aby neovlivnily měření, musí být opticky čisté [88]. Jako detektor slouží nejčastěji fotovoltaické články. Detektor má za úkol zaznamenat intenzitu světla, které prošlo vzorkem, a převést ho na měřitelný elektrický signál [92, 93].

Výsledkem spektrofotometrického měření je transmitance, neboli propustnost. Transmitance udává poměr intenzity světla, které prošlo vzorkem, k intenzitě světla dopadajícího na vzorek. [94] Z této veličiny lze následně odvodit hodnotu absorbance. Absorbance je bezrozměrná veličina definována jako dekadický logaritmus převrácené hodnoty transmitance. [88, 94] Absorbanci samotné analyzované látky popisuje Lambert-Beerův zákon, vyjádřený rovnicí 3.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \tag{3}$$

Podle Lambert-Beerova zákona je absorbance přímo úměrná koncentraci analyzované látky c [mol/l], tloušťce absorpční vrstvy l [cm] a molárním absorpčním koeficientu látky ε [l/mol/cm], který vyjadřuje, jak intenzivně daná látka pohlcuje světlo při určité vlnové délce. [88, 94]

2.5.3 Kolorimetrie

Kolorimetrie patří mezi chemické analytické metody. Využívá vztah mezi barevnými vlastnostmi analyzované látky a její koncentrací. Princip metody spočívá v měření intenzity barvy roztoku. Výhodou kolorimetrie je její jednoduchost a nízká finanční náročnost, jelikož se může provádět i bez drahých přístrojů, a to vizuálním posouzením a porovnáním s barevnou škálou. To je avšak velmi subjektivní hodnocení. [95] Proto se v dnešní době častěji uplatňuje digitální kolorimetrie, která umožňuje objektivní hodnocení barevného signálu pomocí skenerů, digitálních kamer nebo chytrých telefonů. Pokud studovaná látka, kterou chceme stanovit touto metodou, není barevná, využijí se chemická barviva. [95]

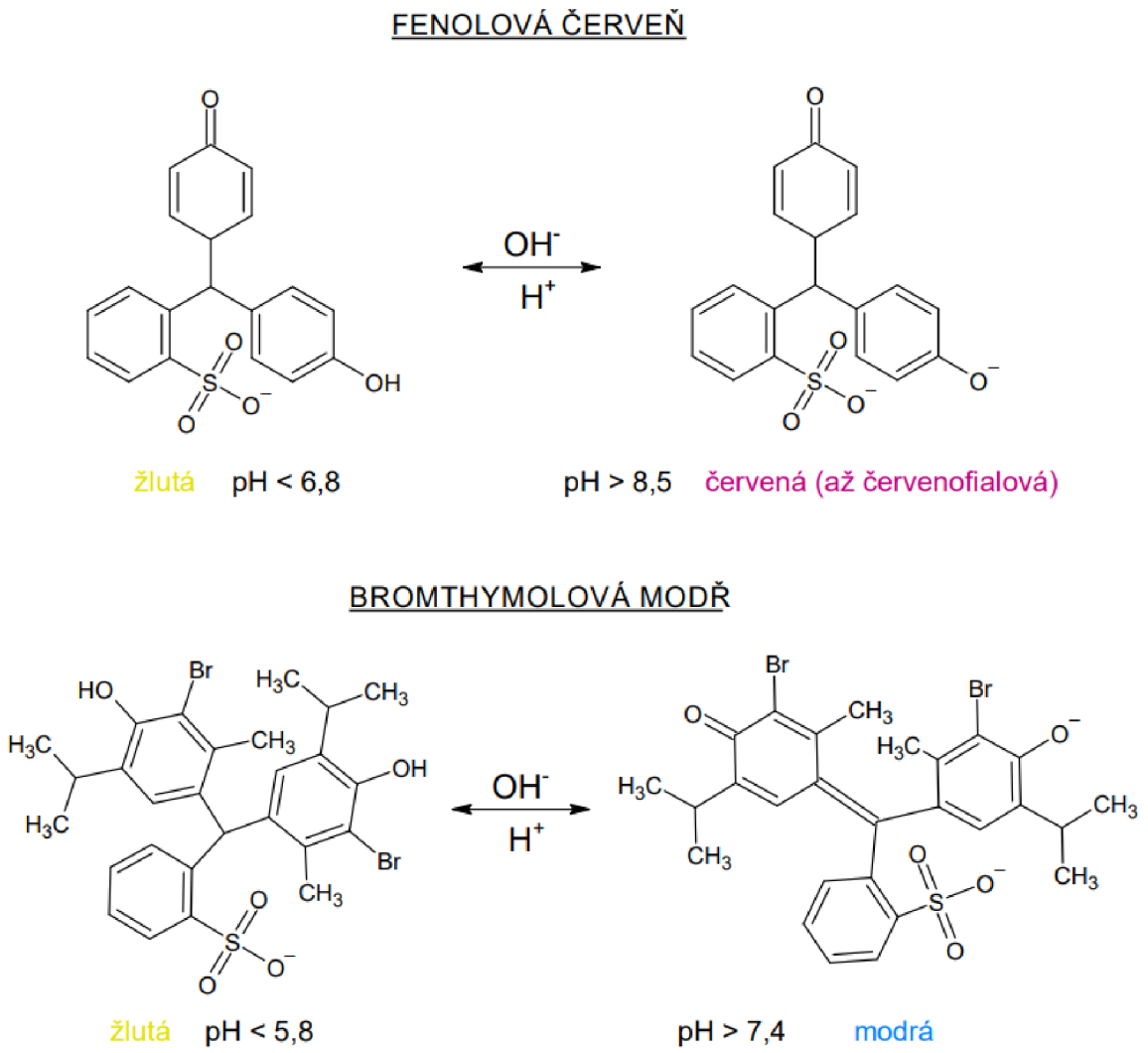
2.5.4 pH indikátory

Použité pH indikátory v experimentální části byly vybrány na základě jejich spektrálních a acidobazických vlastností. Reakce hydratace CO_2 pomocí enzymu CA typicky probíhá v pH rozmezí 5,0–8,8 [96–99]. Podle údajů uvedených v ČL 2023 v kapitole Zkoumadla vykazuje fenolová červeň RS (dále jen FČ) barevný přechod mezi pH 6,8 (žlutá) a pH 8,5 (červená až červenofialová). [88] V nízkém pH se v roztoku nachází vysoká koncentrace protonů, což způsobuje, že FČ existuje v protonované podobě. Při bazickém pH dochází k deprotonaci fenolových protonů, čímž FČ přechází do plně deprotonované podoby. [100]

Bromthymolová modř RS1 (dále jen BTM) mění barvu mezi pH 5,8 (žlutá) a pH 7,4 (modrá). [88] Při kyselém pH se v roztoku nachází více protonů, což znamená, že molekula BTM zůstává v protonované podobě. Tato forma je považovaná za neionizovanou, kromě trvale ionizované sulfonové skupiny. V bazickém pH se v roztoku

nachází více hydroxidových iontů, které reagují s protony fenolových skupin struktury BTM a způsobují deprotonaci. Výsledkem je vznik ionizované formy. [101]

Oba pH indikátory tak zahrnují klíčové pH rozmezí, kde dochází ke změnám při enzymatické přeměně CO_2 katalyzované CA a jsou proto vhodná k její detekci spektrofotometricky. [101]



Obr. 24: Chemické struktury pH indikátorů v různém pH, upraveno dle [100, 101]

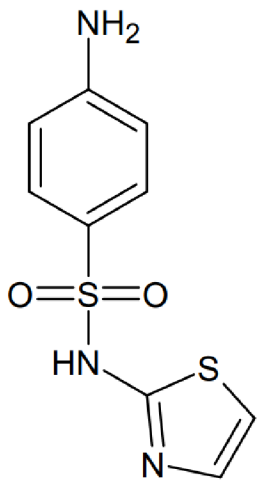
3 Experimentální část

Experimentální část této diplomové práce je zaměřena na ověření, zda vybrané syntetizované látky vykazují inhibiční účinek vůči enzymu CA. K tomuto účelu se využívá nepřímé spektrofotometrické metody založené na sledování změn pH v testovaném roztoku, ve kterém dochází k enzymem řízené hydrataci CO_2. Tyto změny jsou detekovány pomocí pH-senzitivních indikátorů, jejichž změna absorpčního spektra byla měřena pomocí UV/Vis spektrofotometrie. Jako biologický model slouží extrakt z naklíčených semen čočky jedlé. Součástí experimentu je rovněž negativní kontrola, kdy je měřen sulfathiazol. Třetí částí experimentu je analýza tří syntetizovaných derivátů 1,3,5-triazinu.

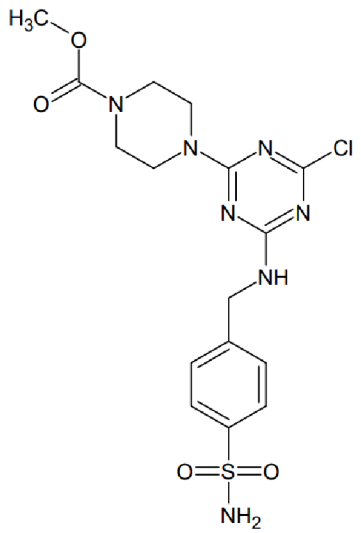
3.1 Studované látky

Pro experimentální část diplomové práce byly využity čtyři hlavní chemické látky, jejichž chemická struktura a vlastnosti představují klíčový faktor ovlivňující schopnost interagovat s aktivním místem enzymu. Sulfathiazol jako negativní kontrola a tři syntetizované deriváty 1,3,5-triazinů s potenciálním inhibičním účinkem vůči CA. Tyto látky byly poskytnuty RNDr. Evou Havránkovou, Ph.D.

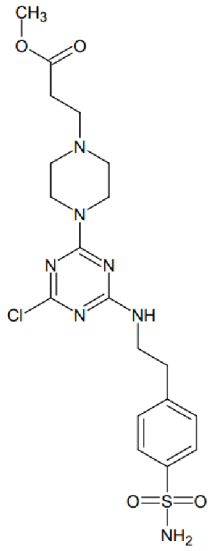
Tab. 2: Studovaná látka – sulfathiazol: chemický název, struktura, vlastnosti

Chemická struktura	Chemický název (IUPAC)
	4-amino-N-(thiazol-2-yl)benzen-1-sulfonamid
	Molární hmotnost
	255,31 g/mol
	CAS číslo
	72-14-0
	Vzhled
	„Bílý nebo slabě nažloutlý krystalický prášek.“ [88]
	Rozpustnost
	„Prakticky nerozpustný ve vodě, těžce rozpustný v ethanolu 96%, prakticky nerozpustný v dichlormethanu. Rozpouští se v roztocích alkalických hydroxidů a ve zředěných minerálních kyselinách.“ [88]

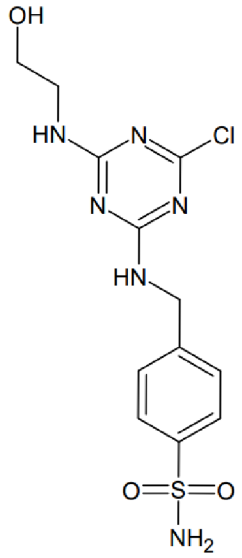
Tab. 3: Studovaná látka – CAI 176: chemický název, struktura, vlastnosti

Chemická struktura	Chemický název (RNDr. Eva Havránková, Ph.D.)
	Methyl-4-(4-{[4-(aminosulfonyl)benzyl]amino}-6-chlor-1,3,5-triazin-2-yl)piperazin-1-karboxylát
	Molární hmotnost
	441,89 g/mol
	Vlastnosti
	Bílý prášek, bez zápachu. Prakticky nerozpustná ve vodě, velmi těžko rozpustná v methanolu a ethanolu [102].

Tab. 4: Studovaná látka – CAI 200: chemický název, struktura, vlastnosti

Chemická struktura	Chemický název (RNDr. Eva Havránková, Ph.D.)
	Methyl-3-(4-{4-chlor-6-[(4-sulfamoylfenethyl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl}piperazin-1-yl)propanoát
	Molární hmotnost
	483,97 g/mol
	Vlastnosti
	Bílý prášek, bez zápachu. Prakticky nerozpustná ve vodě, velmi těžko rozpustná v methanolu a ethanolu [102].

Tab. 5: Studovaná látka – CAI 241: chemický název, struktura, vlastnosti

Chemická struktura	Chemický název (RNDr. Eva Havránková, Ph.D.)
	4-[({4-chlor-6-[(2-hydroxyethyl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl}amino)methyl]benzensulfonamid
	Molární hmotnost
	358,80 g/mol
	Vlastnosti
	Bílý prášek, bez zápachu. Prakticky nerozpustná ve vodě, velmi těžko rozpustná v methanolu a ethanolu [102].

3.2 Optimalizace vyvíjené metody

Optimalizace experimentální metody představuje nezbytný krok pro validní hodnocení účinku testovaných látek. Tato část práce se soustředí na nastavení klíčových podmínek a metodických parametrů. Zahrnuje výběr vhodných koncentrací pH indikátorů, počínaje přípravou substrátu a biologického materiálu až po zavedení kontrolních měření a ověření funkčnosti celého postupu.

3.2.1 Optimalizace podmínek

Pro účely sledování enzymatické aktivity bylo nejprve nutné stanovit optimální absorpční maximum a vhodnou objemovou koncentraci použitých pH indikátorů. Absorpční spektra byla měřena v rozsahu 180–800 nm. Oba pH indikátory vykazovaly absorpční maximum při 430 nm, a proto byla tato vlnová délka zvolena i pro všechna další měření. S ohledem na technické parametry spektrofotometru je jako optimální pracovní rozmezí považován rozsah absorbance v intervalu 0,1–1,5. Nižší hodnoty absorbance neposkytují dostatečný signál, zatímco vyšší mohou způsobit přesycení spektrofotometru. Stanovení tohoto rozsahu na počátku experimentu je klíčové, protože je tím zajištěna přesnost a reprodukovatelnost následujících měření. Optimální koncentrace by měla poskytovat jasný, měřitelný a stabilní signál v definovaném rozsahu absorbance. V rámci optimalizace metody byly testovány různé koncentrace s cílem určit takovou, která poskytuje jasný, stabilní a měřitelný signál v uvedeném rozmezí absorbance.

Chemikálie

- Fenolová červeň RS (ČL 2023, ÚChL FaF MU, Brno, ČR)
- Bromthymolová modř RS1 (ČL 2023, ÚChL FaF MU, Brno, ČR)
- Aqua purificata R (ČL 2023, ÚChL FaF MU, Brno, ČR)

Přístroje a pomůcky

- Zkumavky, stojan na zkumavky
- Skleněné pipety 1 ml, 2 ml, 5 ml s balonkem, buničitá vata, střička
- Křemenné kyvety s tloušťkou 1 cm (Hellma)
- Spektrofotometr UV/Vis (Hewlett Packard 8453)

Pracovní postup

Za laboratorní teploty byly do silnostěnných zkumavek připraveny vzestupně ředěné vodné roztoky pH indikátorů. Pro každý pH indikátor byla připravena série pěti ředění. Pomocí skleněné pipety s balonkem byly postupně odebrány objemy 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml, 0,5 ml každého pH indikátoru zvlášť. Následně byla do celkového objemu 10 ml kvantitativně doplněna aqua purificata. Přehled ředění roztoků je uveden v tab. 6.

Tab. 6: Ředění pH indikátorů

Fenolová červeň	Množství indikátoru [ml]	Množství aqua purificata [ml]	Objemová koncentrace [%]	Bromthymolová modř	Množství indikátoru [ml]	Množství aqua purificata [ml]	Objemová koncentrace [%]
	0,1	9,9	1		0,1	9,9	1
	0,2	9,8	2		0,2	9,8	2
	0,3	9,7	3		0,3	9,7	3
	0,4	9,6	4		0,4	9,6	4
	0,5	9,5	5		0,5	9,5	5

Každý vzorek byl měřen samostatně pomocí UV/Vis spektrofotometru (Hewlett Packard 8453) v rozsahu vlnových délek 180–800 nm. Měření probíhala ve standardní křemenné kyvetě o tloušťce 1 cm. Jako blank byla použita aqua purificata. Získané absorbance jsou zaznamenány v tab. 7. Měření umožnila posoudit vhodnost zvolené vlnové délky i koncentraci pH indikátoru, která poskytla měřitelnou a stabilní hodnotu absorbance v rámci doporučeného rozsahu přístroje.

Výsledky

Tab. 7: Naměřené absorbance objemových koncentrací vodných roztoků pH indikátorů

Fenolová červeň	Objemová koncentrace [%]	Absorbance <430nm>	Bromthymolová modř	Objemová koncentrace [%]	Absorbance <430nm>
	1	0,65534		1	0,25827
	2	1,23310		2	0,45185
	3	1,84010		3	0,67455
	4	2,42761		4	0,79896
	5	3,01998		5	1,22220

Diskuse

Na základě získaných hodnot byly pro další měření vybrány následující objemové koncentrace. Pro FČ byl vyhodnocen jako nejoptimálnější 1% vodný roztok, jehož hodnota absorbance ve zvolené vlnové délce spadá do doporučeného pracovního rozsahu 0,1–1,5. Vyšší objemové koncentrace FČ vykazují hodnoty absorbance blížící se hodnotě 3, což již přesahuje doporučený rozsah a může negativně ovlivnit přesnost výsledků. Stejným postupem byl jako nejvhodnější pro BTM vyhodnocen 3% vodný roztok. Naměřené absorbance odpovídají teoretickým předpokladům a vykazují lineární vztah mezi koncentrací a absorbancí v souladu s Lambert-Beerovým zákonem.

Výsledky této části experimentu poskytují zajištění optimálních a stabilních podmínek a volbu vhodných pH indikátorů pro spektrofotometrické sledování enzymatické aktivity CA v dalších částech této práce. Současně je potvrzena přímá úměra mezi koncentrací barviva v roztoku a množstvím absorbovaného světla, což odpovídá očekávanému trendu, s rostoucí koncentrací barviva v roztoku dochází ke zvýšení absorbance, protože větší počet molekul barviva absorbuje více světla.

3.2.2 Referenční měření bez přítomnosti enzymu

Před již samotným testováním enzymové aktivity CA v klíčcích a následným ověřením inhibice potenciálními CAIs se musela ověřit odezva vybraných pH indikátorů na změnu pH prostředí. Pro tento účel byl připraven modelový systém bez enzymu, ve kterém bylo sledováno, zda je změna pH způsobená přítomností CO_2 dostatečně detekovatelná pomocí pH indikátorů. Tento postup umožnil validovat funkčnost spektrofotometrického měření před zavedením enzymu a CAIs do systému.

a) Příprava standardizovaného nasyceného roztoku CO_2 acidobazickou reakcí

Jako zdroj CO_2 byl zvolen nasycený roztok CO_2 připravený acidobazickou reakcí kyseliny citronové a uhličitanu sodného. Tuto reakci vyjadřuje rovnice 4. Tato metoda byla zvolená pro svou bezpečnost, dostupnost chemikálií a možnost snadného

kontrolovaného provedení v laboratorních podmínkách. Touto chemickou reakcí byl vytvořen standardizovaný nasycený roztok CO_2, který byl použitý v navazujících fázích experimentu.

Chemikálie

- Uhličitan sodný bezvodý p.a. (Lach:Ner)
- Kyselina citrónová monohydrát p.a. (Penta)
- Aqua purificata R (ČL 2023, ÚChL FaF MU, Brno, ČR)

Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy ScalTec SPB32
- Odměrné baňky, zkumavky, navažovací lodička, kopistky
- Spektrofotometr UV/Vis (Hewlett Packard 8453)
- Křemenné kyvety s délkou 1 cm (Hellma)
- Buničitá vata, střička, kádinky

Pracovní postup

Byl připraven nasycený roztok CO_2 acidobazickou reakcí kyseliny citronové a uhličitanu sodného. Nejprve byly vytvořeny zásobní roztoky obou výchozích látek. Do odměrné baňky o objemu 100 ml bylo kvantitativně převedeno 0,2103 g kyseliny citronové, navážené na analytických vahách. Po úplném rozpuštění byl objem kvantitativně doplněn aqua purificata po rysku. Zásobní roztok uhličitanu sodného byl připraven obdobně. Do další odměrné baňky o objemu 100 ml bylo kvantitativně převedeno 0,1060 g uhličitanu sodného a po rozpuštění byl roztok doplněn pomocí aqua purificata na požadovaný objem. Navážky obou látek byly záměrně vypočteny tak, aby odpovídaly přibližně ekvimolárnímu poměru reagujících složek. Tento postup byl zvolen na základě několika předchozích měření jako praktická alternativa ke stechiometrickému poměru, který je uveden pro tuto reakci.

$$2\ C_6H_8O_7 + 3\ Na_2CO_3 \rightarrow 2\ Na_3C_6H_5O_7 + 3\ H_2O + 3\ CO_2 \tag{4}$$

Použití stejného látkového množství obou reaktantů umožnilo jednodušší přípravu. Účelem nebylo přesné stanovení množství vzniklého CO_2, ale zajištění dostatečného množství rozpuštěného CO_2. Bezprostředně před použitím byly zásobní roztoky smíchány v poměru 1:1 do odměrné baňky o objemu 50 ml. Vznikl tak vodný roztok nasycený oxidem uhličitým, který byl využit při následných spektrofotometrických měřeních ke sledování změn pH.

b) Ověření odezvy pH indikátorů na CO_2 bez přítomnosti enzymu

Po přípravě nasyceného roztoku CO_2 bylo nutné provést kontrolní měření za účelem ověření schopnosti pH indikátorů detekovat změnu pH způsobenou přídavkem CO_2 do

systému. Měření byla provedena spektrofotometricky pro oba pH indikátory. Bylo provedeno kontrolní měření pH indikátoru s vodou a následně pH indikátoru s roztokem CO_2. Cílem bylo také ověřit, zda připravený nasycený roztok CO_2 poskytuje dostatečné množství rozpuštěného CO_2.

Chemikálie

- Fenolová červeň RS (ČL 2023, ÚChL FaF MU, Brno, ČR)
- Bromthymolová modř RS1 (ČL 2023, ÚChL FaF MU, Brno, ČR)
- Aqua purificata R (ČL 2023, ÚChL FaF MU, Brno, ČR)
- Nasycený roztok CO_2 – viz výše 3.2.2 a)

Přístroje a pomůcky

- Spektrofotometr UV/Vis (Hewlett Packard 8453)
- Křemenné kyvety s délkou 1 cm (Hellma)
- Odměrné baňky 50 ml, skleněné pipety, střička, buničitá vata, kádinky

Pracovní postup

Pro následná měření byly připraveny zásobní roztoky pH indikátorů na základě objemových koncentrací stanovených v experimentu uvedeném v části 3.2.1. Do odměrné baňky o objemu 50 ml bylo odměřeno 1 ml FČ, resp. 3 ml BTM, a následně byl objem doplněn po rysku pomocí aqua purificata. Zvolené objemy odpovídaly optimalizačním výsledkům z části 3.2.1, kde byly jako vhodné koncentrace určeny 1% pro FČ a 3% pro BTM. Pro toto spektrofotometrické měření byly tyto koncentrace záměrně navýšeny na dvojnásobek, a to za účelem zvýšení intenzity absorbance a celkové citlivosti spektrofotometru. Následně byla provedena čtyři měření s využitím obou pH indikátorů, vždy ve dvou variantách – pouze s aqua purificata (kontrolní měření) a s nasyceným roztokem CO_2. Pro každé měření byly do křemenné kyvety pipetovány 1 ml zásobního roztoku příslušného pH indikátoru a 1 ml nasyceného roztoku CO_2. Měření č. 1 obsahovalo FČ s aqua purificata, měření č. 2 obsahovalo taktéž FČ, ale už roztok CO_2. Měření s BTM obsahovaly v případě č. 3 aqua purificata a v případě č. 4 obsahoval roztok CO_2. Absorbance byla zaznamenávána při vlnové délce 430 nm, což odpovídá absorpčním maximům obou pH indikátorů v kyselém prostředí. U vzorků obsahující roztok CO_2 byla navíc sledována časová změna absorbance. Tato měření byla proto prováděna ve třech časových intervalech: 0 s, 30 s, 60 s.

3.2.3 Zpracování čočky jedlé a testování enzymatické aktivity CA

Pro pokračování v experimentu bylo nutné získat funkční biologický materiál obsahující aktivní enzym CA, který bude sloužit jako modelový systém pro následné testování inhibiční aktivity potenciálních inhibitorů. Pro tento účel byly zvoleny klíčky čočky jedlé (*Lens culinaris*), u nichž se předpokládalo, že v průběhu klíčení dochází k aktivaci

metabolických drah a zvýšené expresi řady enzymů, včetně CA. [103, 104] V mladých částech rostlin se vyskytuje běžně, protože hraje roli v regulaci pH a metabolismu CO_2. Pro srovnání byl paralelně připraven i extrakt z nenaklíčených semen, o nichž se předpokládalo, že aktivní enzym neobsahují, neboť se nachází ve fyziologickém klidu.

Chemikálie

- Aqua purificata R (ČL 2023, ÚChL FaF MU, Brno, ČR)
- Nasycený roztok CO_2 – viz výše 3.2.2 a)
- Zásobní roztok pH indikátorů – viz výše 3.2.2 b)

Rostlinný materiál

- Semena červené čočky jedlé (Campo Largo, Německo, šarže: 2024/04/799)

Přístroje a pomůcky

- Sklenice, síto, miska, textilie
- Analytická váha (ScalTec SPB32)
- Třenka s těrkou, kádinky 100 ml, buničitá vata
- Filtrační nálevka, filtrační papír, střička, hodinové sklíčko, kopistky
- Ultrazvuková lázeň (Kraintek – K10LM)
- Spektrofotometr UV/Vis (Hewlett Packard 8453)
- Křemenné kyvety s délkou 1 cm, 4x (Hellma)

Pracovní postupy

a) Příprava extraktu z klíčků a semen čočky jedlé

Jako biologický zdroj pro detekci aktivity enzymu CA byly využity extrakty získané z klíčků a nenaklíčených semen čočky jedlé. Semena čočky byla po vyjmutí z obalu důkladně promyta studenou vodou za účelem odstranění nečistot. Následně byla umístěna do skleněné nádoby s dostatečným množstvím studené vody tak, aby byla celá ponořena. Takto připravená čočka se nechala nabobtnat přes noc za laboratorní teploty. Druhý den ráno byla semena opět promyta studenou vodou a přenesena do sítka, ve kterém bude klíčit. Pod sítko byla umístěna nádoba, do které odkapávala voda. Semena byla překryta čistou textilií a ponechána klíčit. Po dobu čtyř dnů byla čočka pravidelně (2–3x denně) promývána studenou vodou, aby byla zajištěna vlhkost a podpořeno klíčení. Po uplynutí této doby byly klíčky dostatečně vyvinuté. Proběhlo finální promytí studenou vodou, načež byly klíčky uskladněny ve vzduchotěsném obalu a uchovávány v chladničce až do okamžiku extrakce.

K přípravě extraktu bylo na hodinové sklíčko naváženo 1,0221 g klíčků čočky jedlé. Toto množství se následně rozetřelo v třence s minimálním množstvím aqua purificata a následně se přeneslo do kádinky a přidala se aqua purificata. Vytvořený rostlinný extrakt byl filtrován přes filtrační papír. Filtrát byl vystaven působení ultrazvukové lázně za laboratorní teploty po dobu 3 minut. Totožným postupem byl připraven

také extrakt z nenaklíčených semen, jejichž navážka byla 1,0262 g. Takto připravené rostlinné extrakty klíčků i semen se nechaly 10 min stát za účelem ustálení a poté byly použity pro spektrofotometrická měření.

b) Spektrofotometrické měření aktivity CA ve vzorcích klíčků = pozitivní kontrola

Měření č. 1: FČ + CO_2 + klíčky
Do křemenné kyvety byl pipetou převeden 1 ml pH indikátoru FČ, 0,5 ml nasyceného roztoku CO_2 a 0,5 ml extraktu klíčků. Byla změřena absorbance při 430 nm a následně byly hodnoty absorbance zaznamenávány po 30 s, po 1 min, po 2 min, po 5 min.
Měření č. 2: BTM + CO_2 + klíčky
Do křemenné kyvety byl pipetou převeden 1 ml pH indikátoru BTM, 0,5 ml nasyceného roztoku CO_2 a 0,5 ml extraktu klíčků. Byla změřena absorbance při 430 nm a následně byly hodnoty absorbance zaznamenávány po 30 s, po 1 min, po 2 min, po 5 min.
Měření č. 3: CO_2 + klíčky
Do křemenné kyvety byl pipetou převeden 1 ml nasyceného roztoku CO_2 a 1 ml extraktu klíčků. Byla změřena absorbance při 430 nm.

c) Spektrofotometrické měření aktivity CA ve vzorcích semen:
Měření č. 1: FČ + CO_2 + semena
Do křemenné kyvety byl pipetou převeden 1 ml pH indikátoru FČ, 0,5 ml nasyceného roztoku CO_2 a 0,5 ml extraktu semen čočky. Byla změřena absorbance při 430 nm a následně byly hodnoty absorbance zaznamenávány po 30 s, po 1 min, po 2 min, po 5 min.
Měření č. 2: BTM + CO_2 + semena
Do křemenné kyvety byl pipetou převeden 1 ml pH indikátoru BTM, 0,5 ml nasyceného roztoku CO_2 a 0,5 ml extraktu semen. Byla změřena absorbance při 430 nm a následně byly hodnoty absorbance zaznamenávány po 30 s, po 1 min, po 2 min, po 5 min.
Měření č. 3: CO_2 + semena
Do křemenné kyvety byl pipetou převeden 1 ml nasyceného roztoku CO_2 a 1 ml extraktu semen. Byla změřena absorbance při 430 nm.

3.2.4 Sulfathiazol – negativní kontrola

Před samotným testováním potenciálních CAIs bylo nezbytné ověřit, že zvolená spektrofotometrická metoda spolehlivě a reprodukovatelně rozlišuje látky s inhibičním účinkem a neaktivními sloučeninami. Za účelem validace této analytické metody byl do měření zařazen sulfathiazol jako negativní kontrola. Sulfathiazol byl vybrán ze strukturního důvodu. Obsahuje totiž sulfonamidovou funkční skupinu, která je detekována u inhibitorů CA, avšak sám sulfathiazol inhibiční aktivitu nevykazuje, protože sulfonamidová skupina není přímo zodpovědná za inhibici. Jeho začlenění do experimentu umožnilo ověřit, že experimentální prostředí není zatíženo nespecifickou inhibicí, a že případné snížení enzymové aktivity u potenciálních CAIs je skutečně

důsledek jejich cílené interakce s enzymem. Výsledky získané v této části experimentu byly využity jako referenční hodnoty pro hodnocení inhibiční aktivity CAI, konkrétně při výpočtu relativních účinností CAIs.

Chemikálie

- Uhličitan sodný bezvodý p.a. (Lach:Ner)
- Aqua purificata R (ČL 2023, ÚChL FaF MU, Brno, ČR)
- Sulfathiazol R (ČL 2023, ÚChL FaF MU, Brno, ČR)
- Dimethylsulfoxid pro spektroskopii (Uvasol)
- Zásobní roztok FČ – viz výše 3.2.2. b)
- Zásobní roztok BTM – viz výše 3.2.2 b)
- Zásobní roztok kyseliny citrónové – viz výše 3.2.2 a)

Rostlinný materiál

- Extrakt z klíčků čočky jedlé – viz výše 3.2.3 a)

Přístroje a pomůcky

- Analytická váha (ScalTec SPB32)
- Odměrná baňka, navažovací lodička, kopistky, filtrační nálevka, zkumavky
- Spektrofotometr UV/Vis (Hewlett Packard 8453)
- Křemenné kyvety s tloušťkou 1 cm (Hellma)
- Buničitá vata, střička, kádinky
- Ultrazvuková lázeň (Kraintek – K10LM)

Pracovní postup

Pro účely testování vlivu sulfathiazolu na CA byla připravena série čtyř roztoků o definovaných koncentracích účinné látky. Požadované koncentrace a navážená množství sulfathiazolu jsou uvedeny v tab. 8. Tyto koncentrace vycházely z předchozích optimalizačních experimentů. Cílem bylo záměrně pracovat s nízkými koncentracemi, které jsou dostatečné k odhalení případného inhibičního efektu, aniž by došlo k přesycení detektoru.

Pro rozředění sulfathiazolu byl nejprve připraven zásobní roztok uhličitanu sodného o celkovém objemu 500 ml stejným způsobem jako v úloze 3.2.2 a). Na analytické váze bylo odváženo 0,5331 g uhličitanu sodného, který byl následně kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 500 ml. K úplnému rozpuštění látky byla využita ultrazvuková lázeň. Připravený roztok sloužil jako výchozí medium pro přípravu odměrných roztoků sulfathiazolu různých koncentrací. Zároveň poskytoval stabilní zásadité prostředí pro následné *in situ* generování CO_2 v křemenné kyvetě s kyselinou citronovou. To umožnilo přesně načasovat začátek enzymové reakce a udržet konzistentní podmínky ve všech vzorcích.

Navážky sulfathiazolu byly jednotlivě rozpuštěny v 0,1 ml dimethylsulfoxidu (DMSO) a následně kvantitativně převedeny do odměrných baněk o objemu 50 ml za použití připraveného zásobního roztoku uhličitanu sodného. Objem každé baňky byl poté tímto roztokem doplněn po rysku. Tímto způsobem byly připraveny čtyři pracovní roztoky sulfathiazolu s přesně definovaným obsahem účinné látky.

Tab. 8: Požadované koncentrace a odpovídající navážky sulfathiazolu

Vzorek	Požadovaná koncentrace [g/50 ml]	Navážka sulfathiazolu [g]
Roztok 1	$1{,}0 \cdot 10^{-4}$	0,0013
Roztok 2	$2{,}0 \cdot 10^{-4}$	0,0026
Roztok 3	$3{,}0 \cdot 10^{-4}$	0,0038
Roztok 4	$4{,}0 \cdot 10^{-4}$	0,0051

Následné spektrofotometrické měření probíhalo v křemenných kyvetách, do kterých bylo postupně pipetováno: 1 ml zásobního roztoku pH indikátoru (FČ/BTM), 0,25 ml zásobního roztoku kyseliny citronové, 0,25 ml odměrného roztoku uhličitanu sodného se zvolenou koncentrací sulfathiazolu a 0,5 ml extraktu z klíčků čočky jako zdroje CA. Po smíchání všech složek byla měřena absorbance při vlnové délce 430 nm v časových intervalech 0 s, 30 s, 60 s, 120 s, 300 s. Cílem bylo ověřit, zda v přítomnosti sulfathiazolu dojde k ovlivnění rychlosti změny pH a tím i enzymatické aktivity CA.

3.2.5 Hodnocení inhibiční aktivity potenciálních CAIs

V rámci tohoto experimentu byly testovány tři nasyntetizované sloučeniny označené jako 176, 200 a 241, u nichž byla na základě jejich chemické struktury předpokládaná inhibiční aktivita vůči CA. Cílem měření tedy bylo ověřit, zda tyto látky skutečně vykazují inhibiční účinek. Při hodnocení byla pro srovnání použita negativní kontrola a měření bez inhibitoru. Výsledná data budou sloužit k výpočtu relativní inhibiční účinnosti každého potenciálního CAI. Součástí hodnocení je rovněž srovnání vhodnosti použitých pH indikátorů pro tuto metodu.

Chemikálie

- Syntetizované sloučeniny 176, 200, 241 (RNDr. Eva Havránková, Ph.D., ÚChL FaF MU, Brno, ČR)
- Uhličitan sodný bezvodý p.a. (Lach:Ner)
- Aqua purificata R (ČL 2023, ÚChL FaF MU, Brno, ČR)
- Dimethylsulfoxid pro spektroskopii (Uvasol)
- Zásobní roztok FČ – viz výše 3.2.2. b)
- Zásobní roztok BTM – viz výše 3.2.2 b)

- Zásobní roztok kyseliny citrónové – viz výše 3.2.2 a)

Rostlinný materiál

- Extrakt z klíčků čočky jedlé – viz výše 3.2.3 a)

Přístroje a pomůcky

- Analytická váha (ScalTec SPB32)
- Odměrná baňka, navažovací lodička, kopistky, filtrační nálevka, zkumavky
- Spektrofotometr UV/Vis (Hewlett Packard 8453)
- Křemenné kyvety s tloušťkou 1 cm (Hellma)
- Buničitá vata, střička, kádinky
- Ultrazvuková lázeň (Kraintek – K10LM)

Pracovní postup

Na základě předchozích optimalizačních experimentů a spektrofotometrických měření sulfathiazolu byla cílová koncentrace každé testované látky stanovena na $3 \cdot 10^{-4}$ g/50 ml. Jednotlivé látky byly nejprve testovány na rozpustnost. Ukázalo se, že všechny látky byly obtížně rozpustné v zásobním roztoku uhličitanu, i v kyselině, a proto byly nakonec rozpuštěny v minimálním objemu DMSO. Z požadované koncentrace byly vypočítány navážky jednotlivých zkoumaných látek. Každá látka byla navážena a postupně rozpuštěna ve 0,1 ml DMSO. Následně byly tyto roztoky kvantitativně převedeny do odměrných baněk o objemu 50 ml za použití zásobního roztoku uhličitanu sodného, připraveného stejně jako v 3.2.4. Tímto roztokem byl následně doplněn objem v baňkách po rysku. Takto vznikly odměrné všech tří testovaných látek v požadované koncentraci, které byly dále analyzovány pomocí spektrofotometrie. Do křemenné kyvety se pipetovalo: 1 ml zásobního roztoku příslušného pH indikátoru (FČ/BTM), 0,25 ml odměrného roztoku uhličitanu sodného s požadovanou koncentrací CAI (176, 200, 241), 0,25 ml zásobního roztoku kyseliny citronové a 0,5 ml extraktu z klíčků čočky jako zdroje CA. Absorbance byla měřena při 430 nm v časových intervalech 0 s, 30 s, 60 s, 120 s, 300 s. Cílem bylo sledovat kinetiku změn absorbance a z toho vyhodnotit případnou inhibiční účinnost testovaných CAIs na aktivitu CA.

3.3 Výsledky a hodnocení

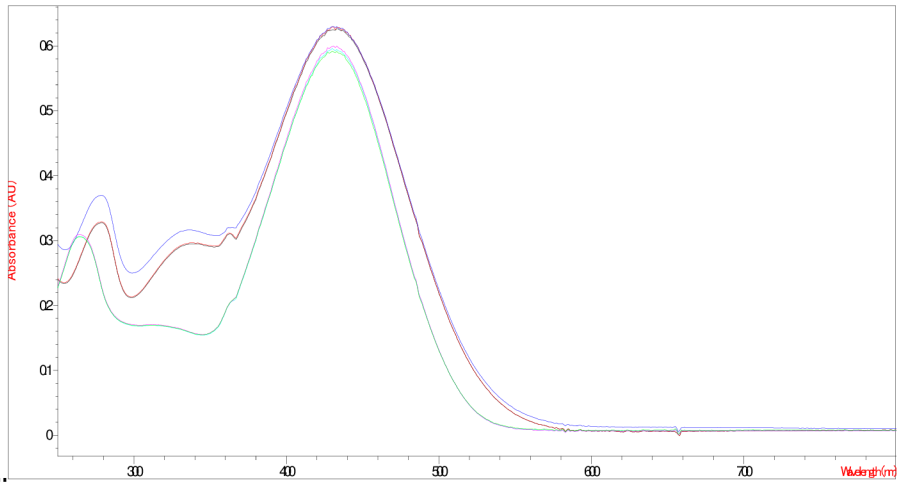
Kapitola obsahuje analýzu výsledků jednotlivých experimentálních optimalizačních úloh s cílem ověřit správnost metodiky a posoudit účinky testovaných látek na aktivitu enzymu CA. Hodnocení je založeno na porovnávání rychlostí reakcí a výpočtu relativní inhibiční účinnosti inhibitorů.

3.3.1 Referenční měření

Za účelem ověření funkčnosti zvolených pH indikátorů byla provedena kontrolní měření, která sledují měřitelnou změnu absorbance způsobenou rozpuštěním CO_2 ve vodném prostředí bez přítomnosti enzymu CA. Tato měření slouží jako referenční základ pro další části experimentu, kde se změna pH očekává v důsledku enzymem katalyzované hydratace CO_2.

Tab. 9: Kontrolní měření absorbance pH indikátorů bez přítomnosti CA

	Fenolová červeň		Bromthymolová modř	
Čas	+ Aqua purificata	+ CO_2	+ Aqua purificata	+ CO_2
0	0,57819	0,59587	0,61045	0,62474
30	-	0,59900	-	0,62923
60	-	0,59197	-	0,62964



Obr. 25: Absorpční spektrum pH indikátorů – FČ, BTM

V rámci testování odezvy pH indikátorů nebyl primárně sledován směr změny absorbance, ale především existence změny. Jakákoli měřitelná změna totiž svědčí o tom, že v systému probíhá acidobazická reakce způsobená rozpuštěním CO_2 a následným poklesem pH. U obou pH indikátorů došlo po přidání nasyceného roztoku CO_2 ke

zvýšení hodnoty absorbance oproti hodnotám z kontrolního měření s použitím aqua purificata. Tato odezva potvrzuje, že oba pH indikátory jsou schopny v daných podmínkách detekovat změnu pH a jsou vhodné pro použití v dalších fázích experimentu sledujícího enzymatickou aktivitu CA i účinnost jejich inhibitorů.

3.3.2 Detekce aktivity CA v rostlinném materiálu (pozitivní kontrola)

Zjištění přítomnosti CA a stanovení její enzymové aktivity v rostlinném materiálu představovalo klíčovou část experimentu. Tato podkapitola shrnuje a hodnotí výsledky měření, která byla provedena podle metodických postupů uvedených v kapitole 3.2. Ke sledování enzymové aktivity byla použita nepřímá spektrofotometrická metoda založená na sledování změn pH vyvolaných enzymatickou reakcí s CO_2 v čase. Změny byly kvantifikovány měřením časového vývoje absorbance pH indikátorů při definované vlnové délce. Klíčící semena byla zvolena jako možný zdroj enzymu, neboť se jedná o metabolicky aktivní část rostliny. CA se tak pravděpodobněji nachází v klíčcích než v nenaklíčených semenech. Proto pro srovnání byl analyzován i extrakt z nenaklíčených semen čočky jedlé. Klíčky čočky byly vybrány z důvodu zvýšené metabolické aktivity a literárního předpokladu obsahu aktivní CA. [103, 104]

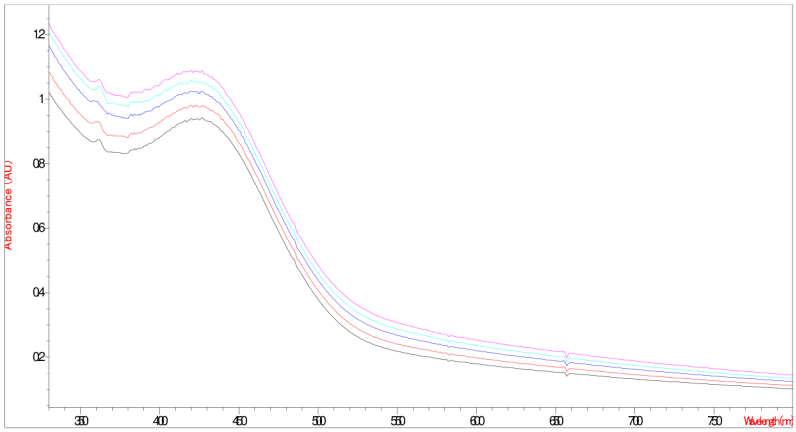
Naměřené absorbance pro extrakt z klíčků

Výsledky měření klíčků jsou uvedeny v tab. 10 a absorpční spektrum je znázorněno na obr. 26, 27.

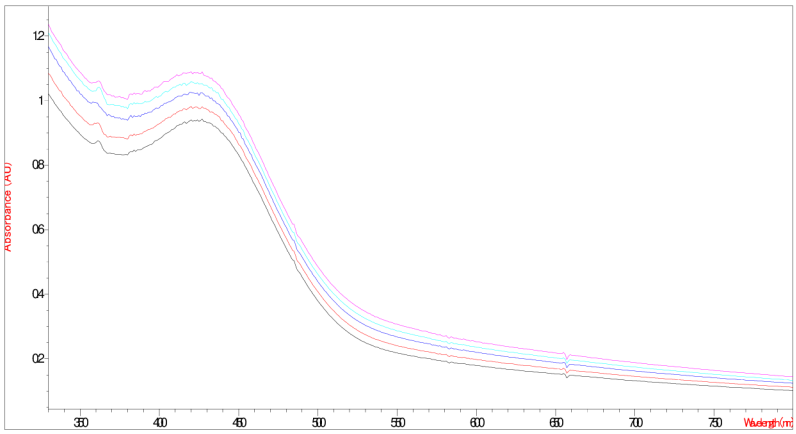
Tab. 10: Naměřené hodnoty absorbance v měření enzymové aktivity CA v klíčcích

Čas [s]	Měření 1 (FČ+CO_2+klíčky) Absorbance <430 nm>	Měření 2 (BTM+CO_2+klíčky) Absorbance <430 nm>	Měření 3 (CO_2+klíčky) Absorbance <430 nm>
0	0,93229	0,98337	0,66685
30	0,97245	1,01150	-
60	1,01420	1,01730	-
120	1,04690	1,02460	-
300	1,07580	1,04340	-

V tab. 10 jsou zobrazeny hodnoty absorbancí měřené při vlnové délce 430 nm pro tři varianty vzorků. Indikátorové sestavy (měření 1 a 2) vykazují postupné zvyšování absorbance, což svědčí o rozdílné citlivosti pH indikátorů na přítomnost enzymu.



Obr. 26: Absorpční spektrum FČ + CO_2 + klíčky



Obr. 27: Absorpční spektrum BM + CO_2 + klíčky

Naměřené absorbance pro extrakt ze semen

Výsledky měření semen jsou uvedeny v tab. 11.

Tab. 11: Naměřené hodnoty absorbance v měření enzymové aktivity CA v semenech

Čas [s]	Měření 1 (FČ+CO_2+semena)	Měření 2 (BTM+CO_2+semena)	Měření 3 (CO_2+semena)
0	2,02420	2,27630	2,03480
30	2,01300	2,24650	-
60	2,01390	2,24400	-
120	2,01150	2,22050	-
300	2,02570	2,22750	-

Metodika hodnocení experimentu

Pro vyhodnocení enzymové aktivity a následné posouzení účinnosti potenciálních CAIs je nutné převést naměřená data na kvantitativní hodnoty. Z tohoto důvodu byly vypočítány rychlosti reakce a relativní inhibiční účinnosti.

Rychlost reakce byla vypočítána podle vzorce (5). Rychlost reakce je definována jako změna absorbance v čase. Počítá se jako podíl rozdílu absorbance mezi dvěma po sobě jdoucími časovými body a časového intervalu mezi nimi. Změna absorbance, jako klíčový parametr rychlosti reakce, se vypočítá jako rozdíl mezi absorbancí v čase t_2

$$v = \frac{\Delta A}{\Delta t} = \frac{A_2 - A_1}{t_2 - t_1} \tag{5}$$

a absorbancí v předcházejícím čase t_1, a to podle vzorce (6). [105–107]

$$\Delta A = A_2 - A_1 \tag{6}$$

Rychlosti jsou vypočítány pro jednotlivé časové úseky a poskytují přímé srovnání mezi vzorky. Vysoké hodnoty rychlostí odpovídají přítomnosti aktivní CA, zatímco nízké nebo záporné hodnoty signalizují inhibici reakce enzymem.

Pro následné hodnocení inhibičního účinku jednotlivých testovaných látek se stanoví relativní procentuální inhibiční účinnost. Výpočet vychází ze vztahu (7), kde se rychlost reakce vzorku s testovaným inhibitorem porovnává s negativní kontrolou.

$$[\%] = \left(1 - \frac{v_{inhibitor}}{v_{negativní\ kontrola}}\right) \cdot 100 \tag{7}$$

Výsledek je poté vyjádřen v procentech. [108]

Zhodnocení přítomnosti CA v klíčcích čočky jedlé

a) Porovnání rychlosti reakce mezi vzorky potenciálně obsahujícími CA a kontrolními vzorky bez enzymu

V tomto hodnocení jsou vzorky obsahující rostlinný extrakt porovnávány s referenčním vzorkem, který extrakt neobsahuje. V tomto kontrolním vzorku nedochází k enzymově katalyzované reakci, a proto veškeré zaznamenané změny pH odrážejí pouze spontánní, hydrataci CO_2. Porovnání s tímto referenčním vzorkem tak umožňuje jednoznačně odlišit změny způsobené přítomností aktivní CA od změn vyplývajících z přirozených chemických procesů. Tato kontrola je nezbytná pro vyloučení falešně pozitivních výsledků a zajišťuje správnou interpretaci naměřených dat. Rychlost

reakce byla vypočítána podle vzorce (5). Například rychlost reakce pro vzorek s FČ s klíčky v časovém intervalu 0−30 s byla vypočítána podle vztahu (8).

$$v\,(0-30s) = \frac{0{,}97245 - 0{,}93229}{30-0} = 0{,}001339\ abs/s \tag{8}$$

Tab. 12: FČ – porovnání rychlostí reakce u vzorků klíčků s CA a bez CA

vzorek	Klíčky s CA (FČ+CO_2+klíčky)		Bez klíčků (FČ+CO_2)	
Čas [s]	Absorbance <430 nm>	ΔA/Δt [abs/s]	Absorbance <430 nm>	ΔA/Δt [abs/s]
0	0,93229	-	0,59587	-
30	0,97245	0,001339	0,59900	0,000104
60	1,01420	0,001392	0,59197	−0,000234

Analogicky byly vypočteny rychlosti také pro kontrolní vzorky bez enzymu. Například rychlost reakce pro BTM bez klíčků i intervalu 0−30 s byla vypočtena podle vzorce (9):

$$v\,(0-30\,s) = \frac{0{,}62923 - 0{,}62474}{30-0} = 0{,}000149667\ abs/s \tag{9}$$

Tab. 13: BTM – porovnání rychlosti reakce u vzorků klíčků s CA a bez CA

vzorek	Klíčky s CA (BTM+CO_2+klíčky)		Bez klíčků (BTM+CO_2)	
Čas [s]	Absorbance <430 nm>	ΔA/Δt [abs/s]	Absorbance <430 nm>	ΔA/Δt [abs/s]
0	0,98337	-	0,62474	-
30	1,01150	0,000938	0,62923	0,000150
60	1,01730	0,000193	0,62964	0,000014

Zhodnocení přítomnosti CA v nenaklíčených semenech čočky jedlé

Analogickými výpočty jako u klíčků byly z naměřených absorbancí z tab. 11 stanoveny rychlosti reakce pro oba pH indikátory u semen:

Tab. 14: FČ – porovnání rychlostí reakcí u vzorků semen

vzorek	Semena (FČ+CO_2+semena)		Bez semen (FČ+CO_2)	
Čas [s]	Absorbance <430 nm>	ΔA/Δt [abs/s]	Absorbance <430 nm>	ΔA/Δt [abs/s]
0	2,02420	-	0,59587	-
30	2,01300	−0,000373	0,5990	0,000104
60	2,01390	0,000030	0,59197	−0,000234

Tab. 15: BTM – porovnání rychlostí reakcí u vzorků semen

vzorek	Semena (BTM+CO_2+semena)		Bez semen (BTM+CO_2)	
Čas [s]	Absorbance <430 nm>	ΔA/Δt [abs/s]	Absorbance <430 nm>	ΔA/Δt [abs/s]
0	2,27630	-	0,62474	-
30	2,24650	−0,000993	0,62923	0,000150
60	2,24400	−0,000083	0,62964	0,000014

b) Detekce CA v rostlinných extraktech s využitím prodlouženého časové intervalu

Pro přesnější důkaz přítomnosti CA v klíčcích a nepřítomnosti CA v semenech byla využita rychlost reakce za delší časový úsek (5 min), který vystihuje celkový průběh enzymatické reakce.

Výpočty byly provedeny podle vztahu (10), kde $A_{konečná}$ a $A_{počáteční}$ představují hodnoty absorbance v čase 300 s a 0 s, a t je celkový čas reakce, tedy 300 s.

$$v\ [abs/s] = \frac{A_{konečná} - A_{počáteční}}{t} \tag{10}$$

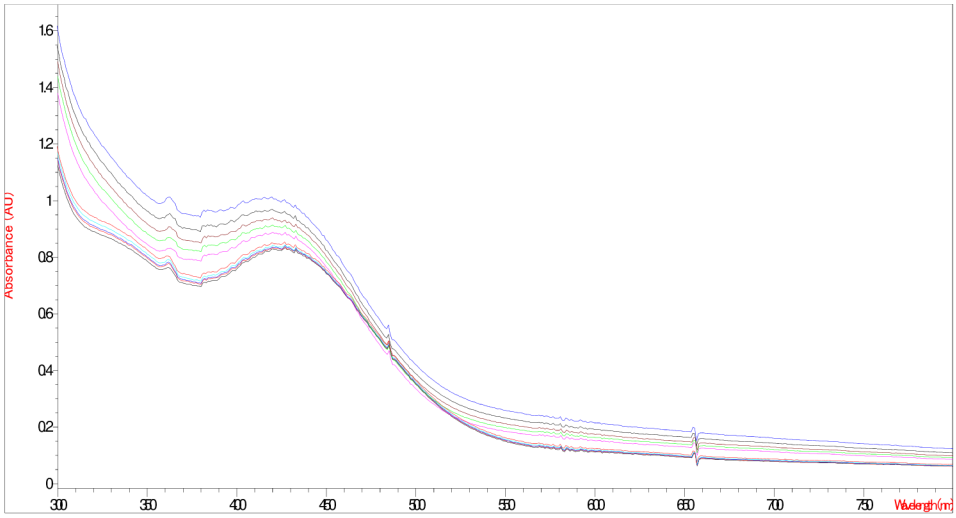
Tab. 16: Porovnání přítomnosti CA v klíčcích a semenech pomocí rychlosti reakce v prodlouženém čase

Vzorek	pH indikátor	$A_{počáteční}$	$A_{konečná}$	ΔA	Rychlost reakce [abs/s]	Přítomnost CA
Klíčky	FČ	0,93229	1.07580	0,14351	0,028702	Ano
	BTM	0.98337	1,04340	0,06003	0,012010	Ano
Semena	FČ	2,02420	2,02570	0,00150	0,000300	Ne
	BTM	2,27630	2,22750	−0,04880	−0,009760	Ne

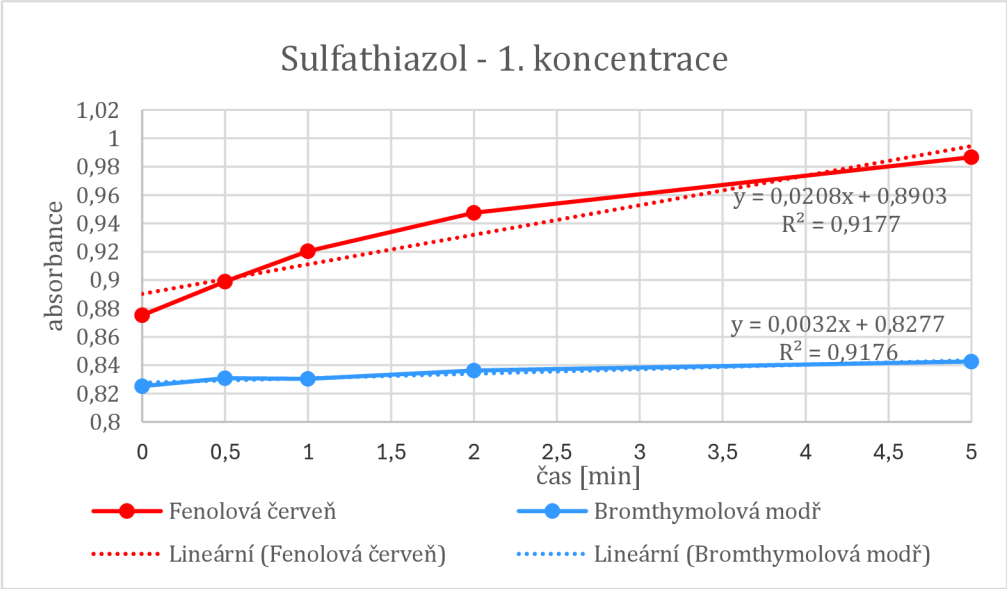
3.3.3 Sulfathiazol – negativní kontrola

Tab. 17: Naměřené absorbance – sulfathiazol 1. koncentrace

Čas [min]	FČ Absorbance <430 nm>	BTM Absorbance <430 nm>
0	0,87524	0,82519
0,5	0,89895	0,83087
1	0,92043	0,83049
2	0,94744	0,83614
5	0,98671	0,84258



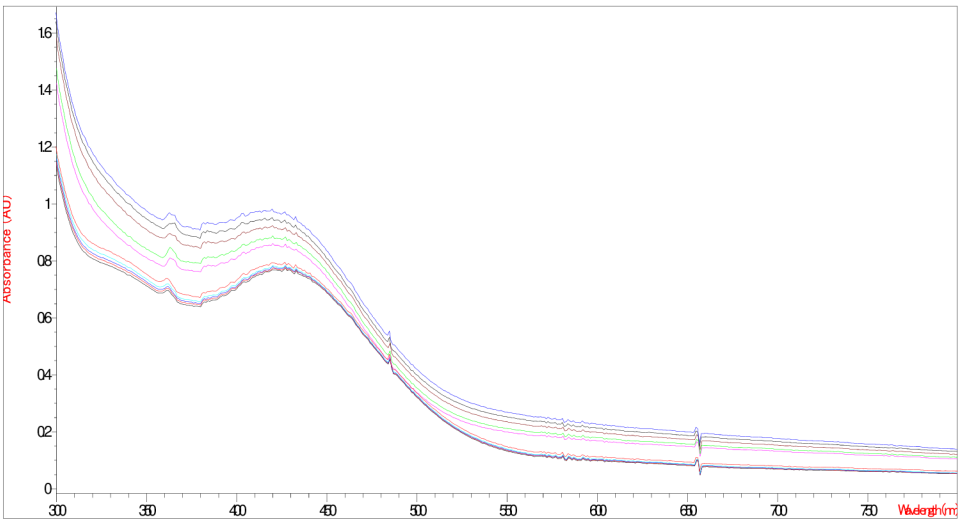
Obr. 28: Absorpční spektrum – sulfathiazol 1.koncentrace



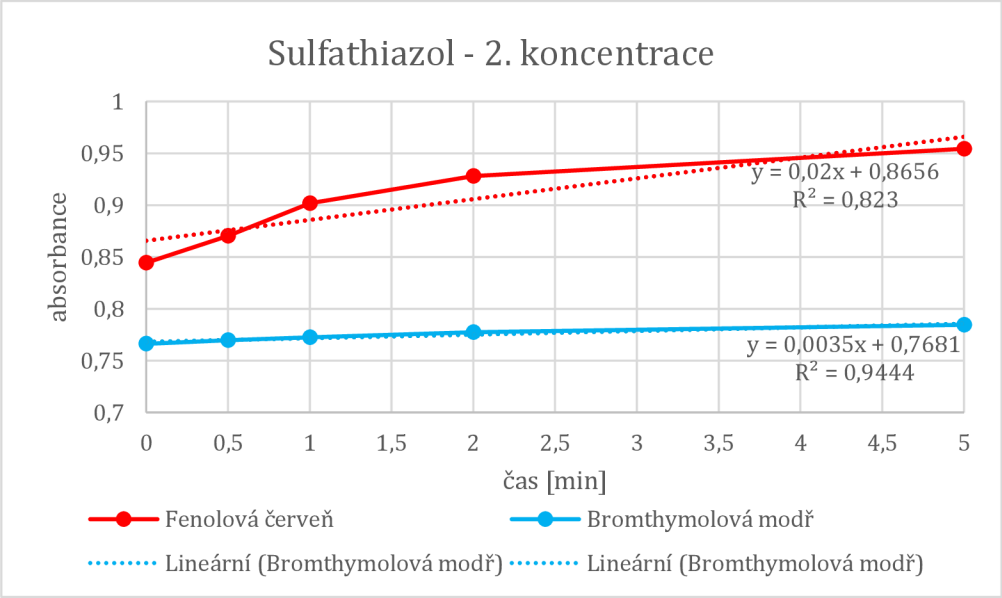
Obr. 29: Graf zobrazující absorbanci v čase pro 1. koncentrace sulfathiazolu

Tab. 18: Naměřené absorbance – sulfathiazol 2.koncentrace

Čas [min]	FČ Absorbance <430 nm>	BTM Absorbance <430 nm>
0	0,84436	0,76617
0,5	0,87029	0,76974
1	0,90161	0,77236
2	0,92804	0,77753
5	0,95432	0,78451



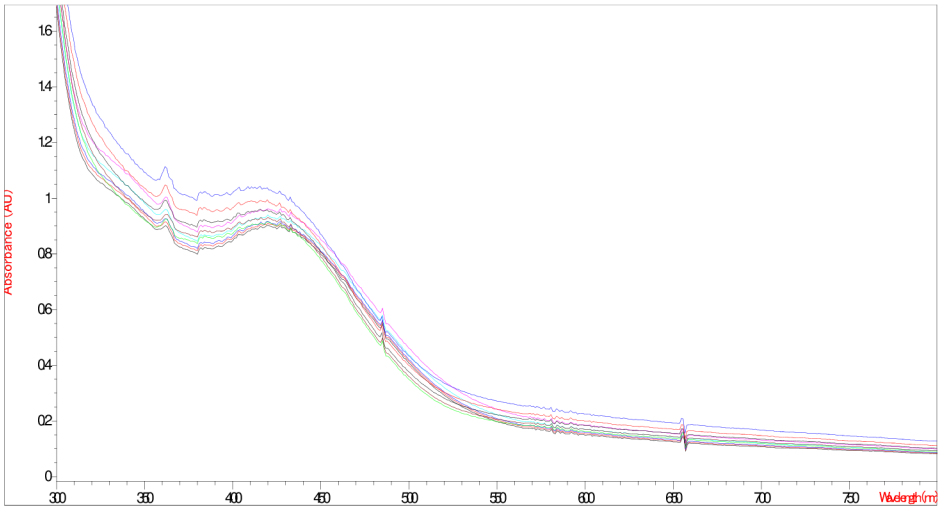
Obr. 30: Absorpční spektrum – sulfathiazol 2. koncentrace



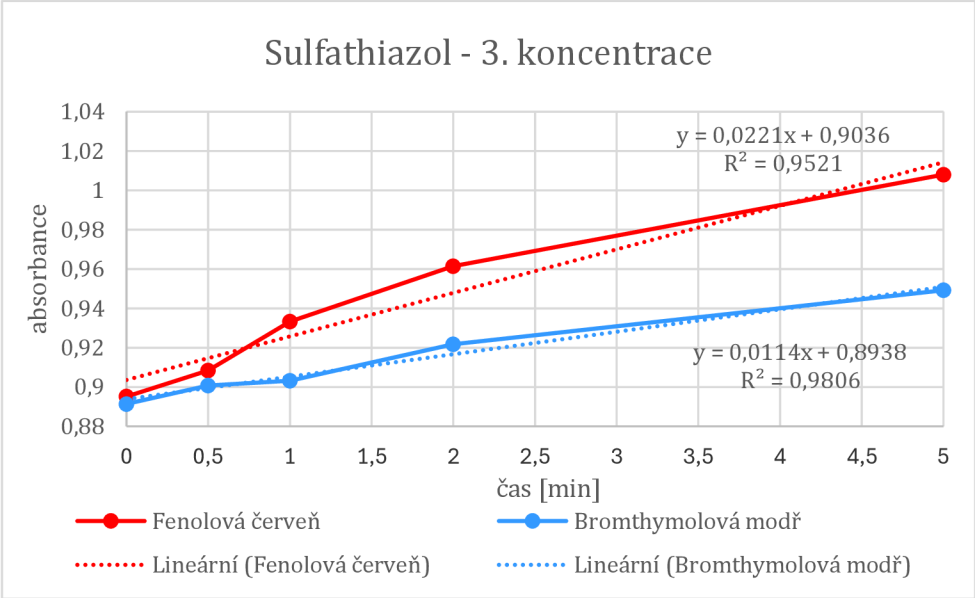
Obr. 31: Graf zobrazující absorbanci v čase pro 2. koncentrace sulfathiazolu

Tab. 19: Naměřené absorbance – sulfathiazol 3. koncentrace

Čas [min]	FČ Absorbance <430 nm>	BTM Absorbance <430 nm>
0	0,89514	0,89139
0,5	0,90837	0,90074
1	0,93324	0,90313
2	0,96138	0,92175
5	1,00800	0,94920



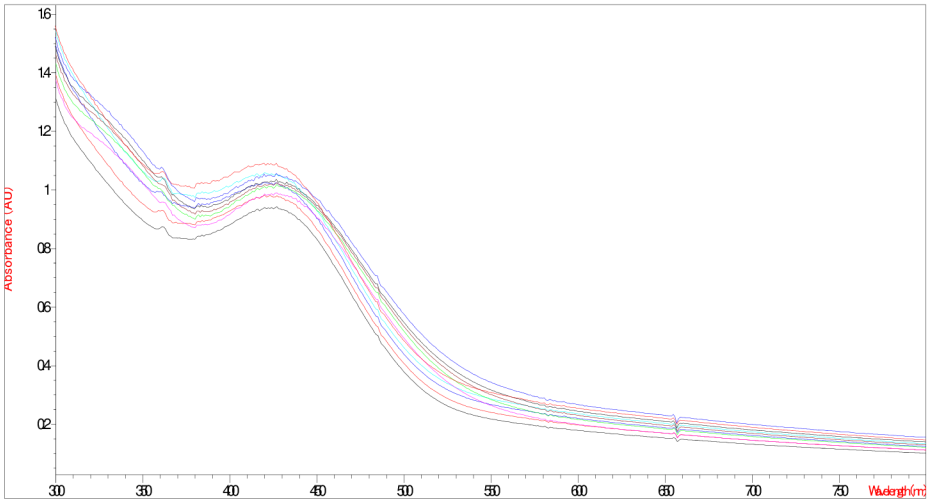
Obr. 32: Absorpční spektrum – sulfathiazol 3. koncentrace



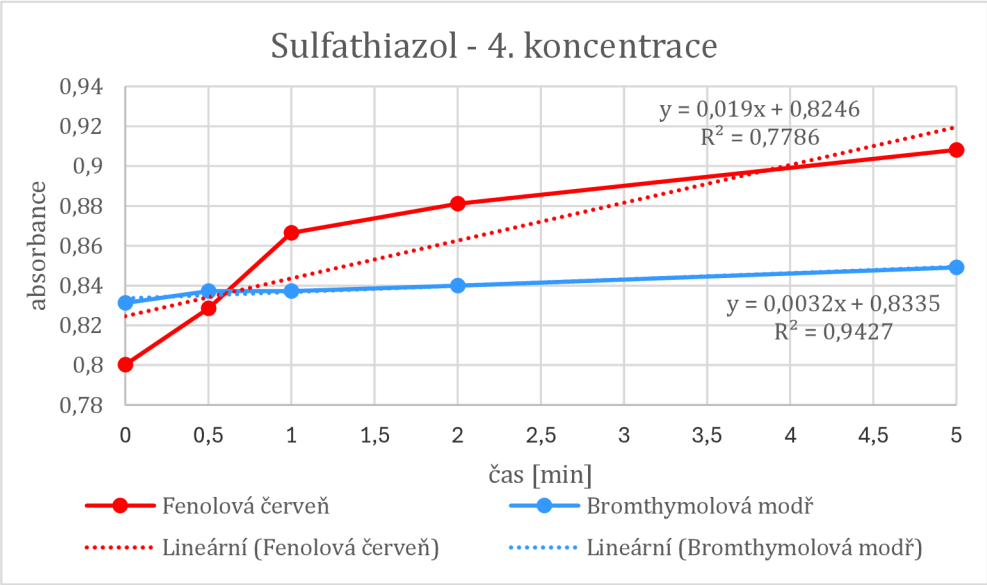
Obr. 33: Graf zobrazující absorbanci v čase pro 3. koncentrace sulfathiazolu

Tab. 20: Naměřené absorbance – sulfathiazol 4. koncentrace

Čas [min]	FČ Absorbance <430 nm>	BTM Absorbance <430 nm>
0	0,80025	0,83125
0,5	0,82845	0,83714
1	0,86646	0,83726
2	0,88107	0,83993
5	0,90812	0,84909



Obr. 34: Absorpční spektrum – sulfathiazol 4. koncentrace



Obr. 35: Graf zobrazující absorbanci v čase pro 4. koncentrace sulfathiazolu

Pro optimální zhodnocení sulfathiazolu jako negativní kontroly byly z naměřených hodnot absorbancí v čase podle vzorců (5) a (6) spočítány ΔA a rychlosti reakcí.

Tab. 21: Sulfathiazol 1. koncentrace – hodnoty rychlosti reakce

Fenolová červeň			
Čas [s]	**Absorbance <430 nm>**	**ΔA**	**Rychlost reakce *v* [abs/s]**
0	0,87524	-	-
30	0,89895	0,02371	0,000790
60	0,92043	0,02371	0,000716
120	0,94744	0,02701	0,000450
300	0,98671	0,03927	0,000218
Bromthymolová modř			
Čas [s]	**Absorbance <430 nm>**	**ΔA**	**Rychlost reakce *v* [abs/s]**
0	0,82519	-	-
30	0,83087	0,00568	0,000189
60	0,83049	−0,00038	−0,000013
120	0,83614	0,00565	0,000094
300	0,84258	0,00644	0,000036

Tab. 22: Sulfathiazol 2. koncentrace – hodnoty rychlostí reakce

Fenolová červeň			
Čas [s]	**Absorbance <430 nm>**	**ΔA**	**Rychlost reakce *v* [abs/s]**
0	0,84436	-	-
30	0,87029	0,02593	0,000864
60	0,90161	0,03132	0,001044
120	0,92804	0,02643	0,000441
300	0,95432	0,02628	0,000146
Bromthymolová modř			
Čas [s]	**Absorbance <430 nm>**	**ΔA**	**Rychlost reakce *v* [abs/s]**
0	0,76617	-	-
30	0,76974	0,00357	0,000119
60	0,77236	0,00262	0,000087
120	0,77753	0,00517	0,000086
300	0,78451	0,00698	0,000039

Tab. 23: Sulfathiazol 3. koncentrace – hodnoty rychlostí reakce

Fenolová červeň			
Čas [s]	**Absorbance <430 nm>**	$\Delta A = A_{t2} - A_{t1}$	**Rychlost reakce** $v\ [abs/s]$
0	0,89514	-	-
30	0,90837	0,01323	0,000441
60	0,93324	0,02487	0,000829
120	0,96138	0,02814	0,000469
300	1,00800	0,04662	0,000259
Bromthymolová modř			
Čas [s]	**Absorbance <430 nm>**	**ΔA**	**Rychlost reakce** v **[abs/s]**
0	0,89139	-	-
30	0,90074	0,00935	0,000312
60	0,90313	0,00239	0,000080
120	0,92175	0,01862	0,000310
300	0,94920	0,02745	0,000153

Tab. 24: Sulfathiazol 4. koncentrace – hodnoty rychlostí reakce

Fenolová červeň			
Čas [s]	**Absorbance <430 nm>**	**ΔA**	**Rychlost reakce** v **[abs/s]**
0	0,80025	-	-
30	0,82845	0,02820	0,000940
60	0,86646	0,03801	0,001267
120	0,88107	0,01461	0,000244
300	0,90812	0,02705	0,000150
Bromthymolová modř			
Čas [s]	**Absorbance <430 nm>**	**ΔA**	**Rychlost reakce** v **[abs/s]**
0	0,83125	-	-
30	0,83714	0,00589	0,000196
60	0,83726	0,00012	0,000004
120	0,83993	0,00267	0,000045
300	0,84909	0,00916	0,000051

Z výsledků znázorněných v tabulkách výše vyplývá, že sulfathiazol může být použit jako negativní kontrola. Je tomu tak, protože jeho přítomnost nevede k významné změně absorbance. Enzymová aktivita CA je zachována, i když je rychlost reakce mírně snížena v porovnání se systémem bez sulfathiazolu.

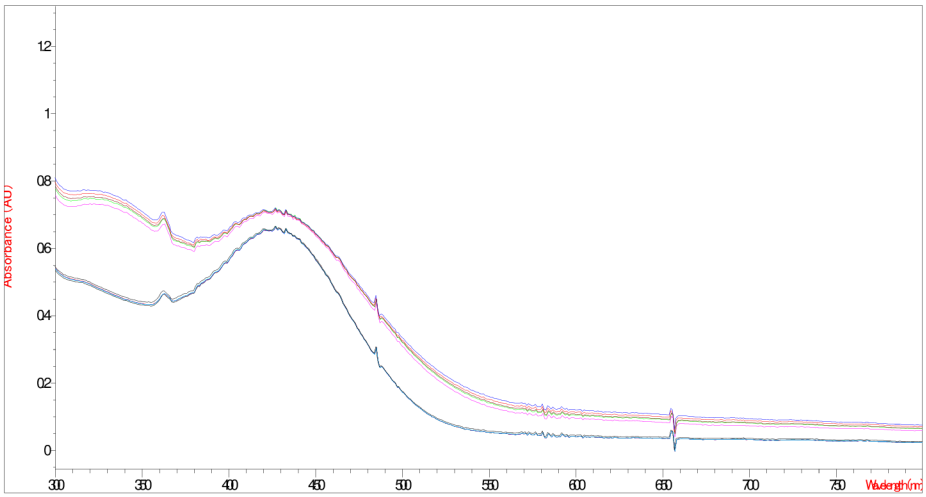
Tímto hodnocením se sulfathiazol osvědčil jako spolehlivá referenční látka pro následující hodnocení potenciálních CAIs. Zároveň je viditelné, že FČ se ukázala jako citlivější pH indikátor v porovnání s BTM. FČ reaguje rychleji a výrazněji, zatímco reakce s BTM jsou pozvolnější a mně dynamické. Sulfathiazol v testovaném rozsahu koncentrací neprokázal inhibiční účinek na enzym CA.

Navíc z porovnání rychlostí reakce všech čtyř koncentrací sulfathiazolu vyplynulo, že koncentrace číslo tři představuje nejvhodnější negativní kontrolu. Poskytuje vyrovnané a stabilní hodnoty rychlostí reakce a bez výkyvů nebo záporných hodnot a to jak u FČ, tak BTM.

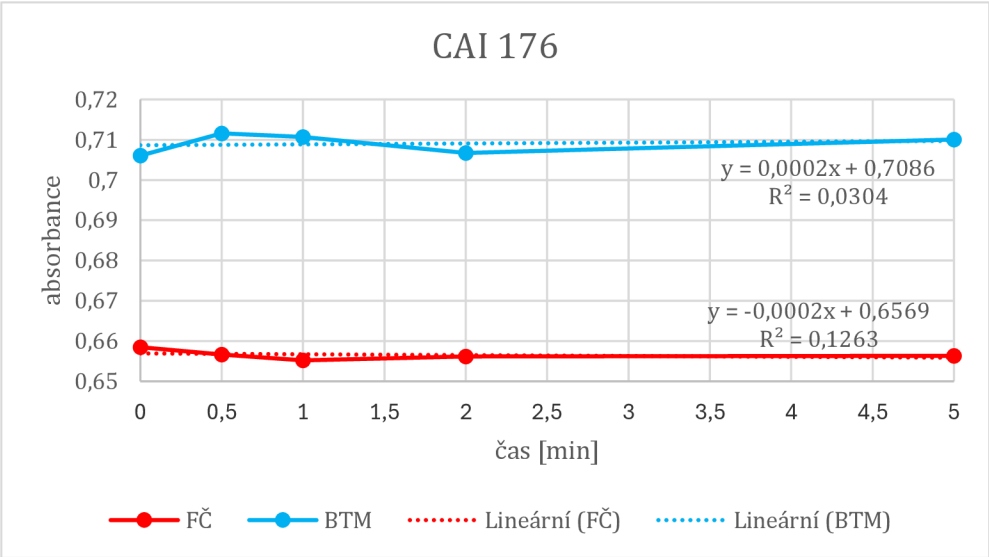
3.3.4 Potenciální CAIs

Tab. 25: Naměřené absorbance – CAI 176

Čas [min]	FČ Absorbance <430 nm>	BTM Absorbance <430 nm>
0	0,65847	0,70605
0,5	0,65668	0,71159
1	0,65520	0,71065
2	0,65618	0,70670
5	0,65631	0,71002



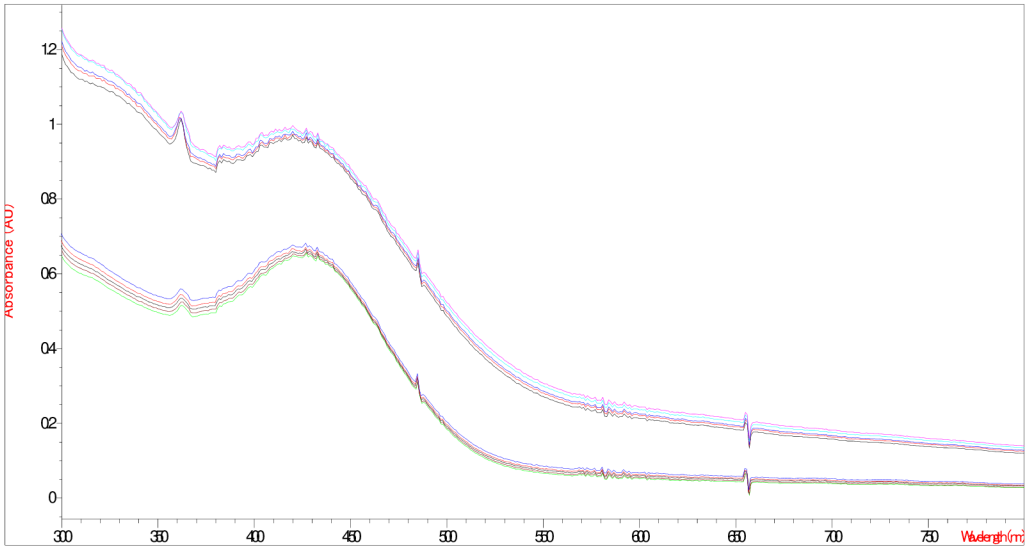
Obr. 36: Absorpční spektrum – CAI 176



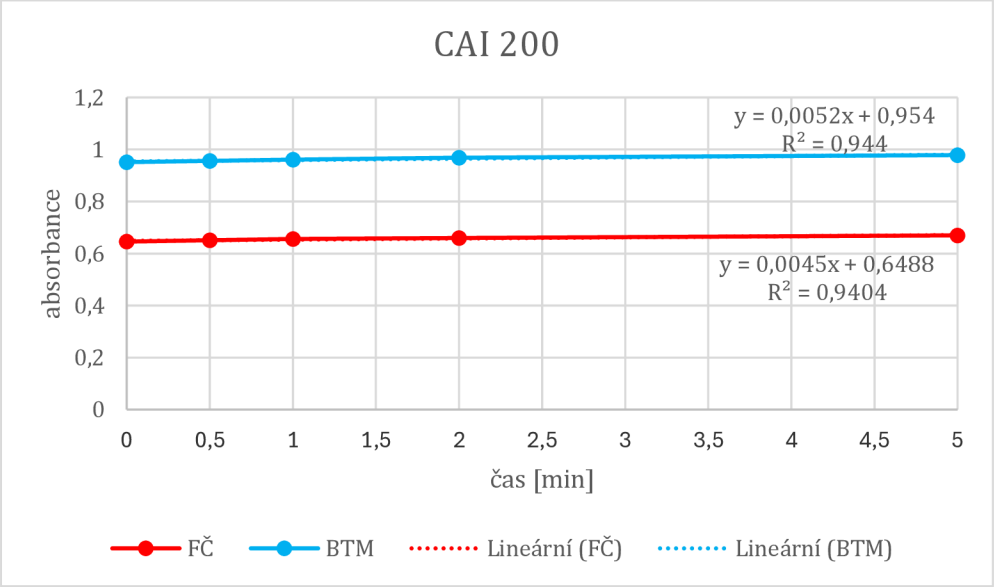
Obr. 37: Graf zobrazující absorbanci v čase pro CAI 176

Tab. 26: Naměřené absorbance – CAI 200

Čas [min]	FČ Absorbance <430 nm>	BTM Absorbance <430 nm>
0	0,64590	0,95135
0,5	0,65078	0,95604
1	0,65542	0,96054
2	0,66002	0,96816
5	0,66983	0,97848



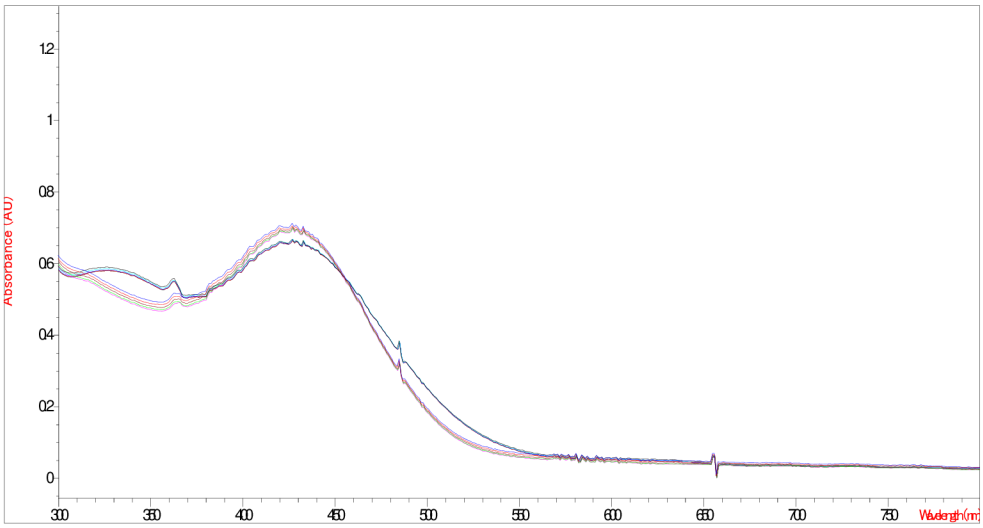
Obr. 38: Absorpční spektrum – CAI 200



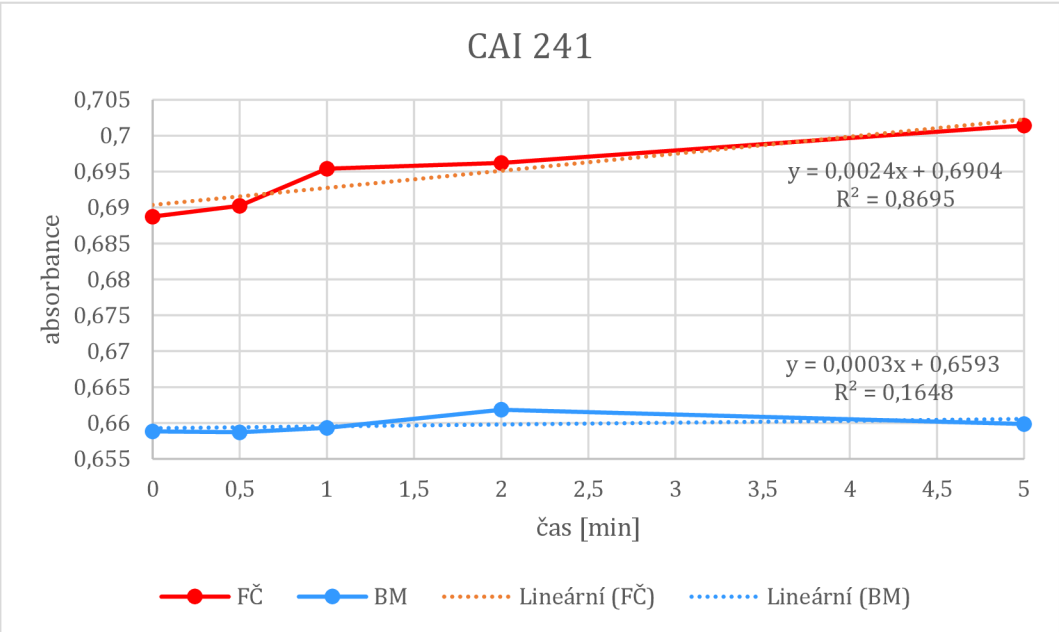
Obr. 39: Graf zobrazující absorbanci v čase pro CAI 200

Tab. 27: Naměřené absorbance – CAI 241

Čas [min]	FČ Absorbance <430 nm>	BTM Absorbance <430 nm>
0	0,68874	0,65882
0,5	0,69024	0,65871
1	0,69543	0,65933
2	0,69619	0,66184
5	0,70142	0,65986



Obr. 40: Absorpční spektrum – CAI 241



Obr. 41: Graf zobrazující absorbanci v čase pro CAI 241

Naměřené hodnoty absorbancí sloužily k vyhodnocení, zda potenciální CAIs vykazují inhibiční aktivitu, případně v jaké míře. Pro každou testovanou látku byly z těchto absorbancí v jednotlivých časových intervalech vypočteny změny absorbance ΔA podle vzorce (6). Tyto hodnoty byly následně využity k výpočtu rychlostí jednotlivých reakcí podle vzorce (5). Výpočet rychlosti umožňuje kvantifikovat průběh enzymatické reakce katalyzované CA, a tím nepřímo posoudit její aktivitu v přítomnosti potenciálního CAI. Čím nižší rychlost reakce, tím více je enzymová aktivita inhibována, což značí vyšší inhibiční schopnost dané testované látky.

Pro lepší přehlednost a porovnání účinku jednotlivých CAIs byly získané hodnoty rychlostí reakcí zpracovány do grafů. Samotné grafy byly sestaveny zvlášť pro FČ a zvlášť pro BTM.

Tab. 28: CAI 176 – vypočítané ΔA a rychlosti reakce pro CAIs

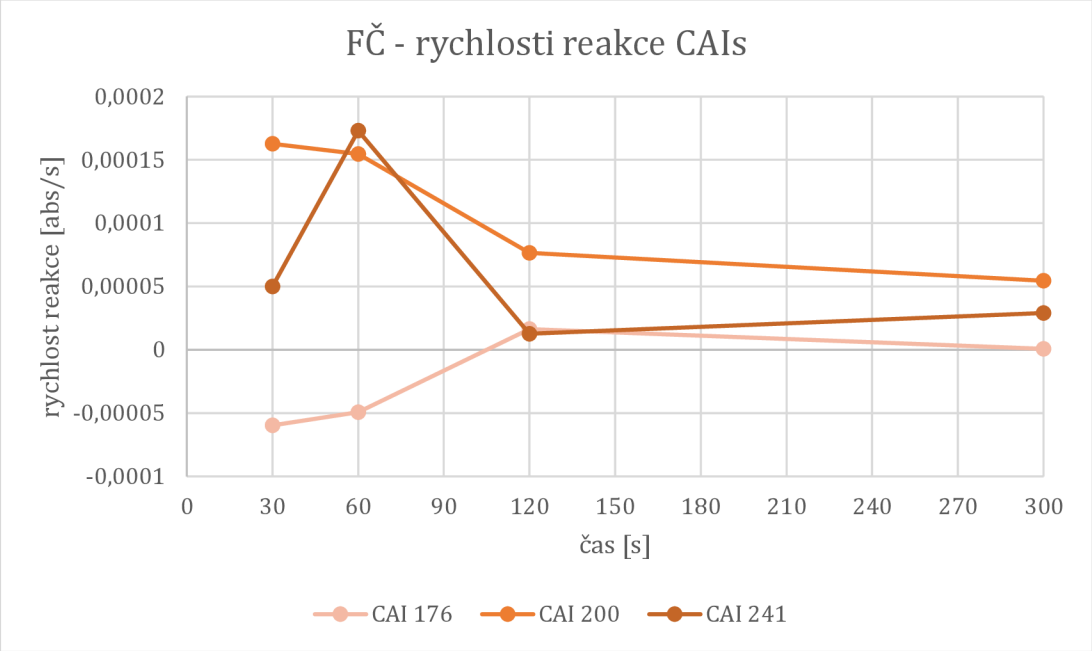
CAI 176			
Fenolová červeň			
Čas [s]	**Absorbance <430 nm>**	**ΔA**	**Rychlost reakce *v* [abs/s]**
0	0,65847	-	-
30	0,65668	−0,00179	−0,0000597
60	0,6552	−0,00148	−0,0000493
120	0,65618	0,00098	0,0000163
300	0,65631	0,00013	0,0000007
Bromthymolová modř			
Čas [s]	**Absorbance <430 nm>**	**ΔA**	**Rychlost reakce *v* [abs/s]**
0	0,70605	-	-
30	0,71159	0,00554	0,0001847
60	0,71065	−0,00094	−0,0000313
120	0,70670	−0,00395	−0,0000658
300	0,71002	0,00332	0,0000184

Tab. 29: CAI 200 – vypočítané ΔA a rychlosti reakce pro CAIs

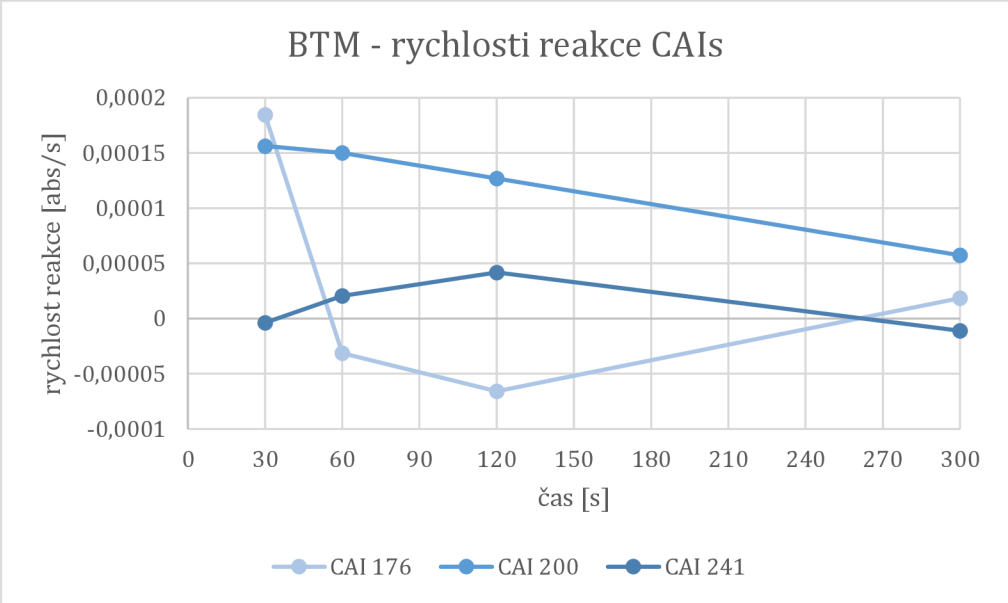
Fenolová červeň			
Čas [s]	**Absorbance <430 nm>**	**ΔA**	**Rychlost reakce *v* [abs/s]**
0	0,64590	-	-
30	0,65078	0,00488	0,0001627
60	0,65542	0,00464	0,0001547
120	0,66002	0,00460	0,0000767
300	0,66983	0,00981	0,0000545
Bromthymolová modř			
Čas [s]	**Absorbance <430 nm>**	**ΔA**	**Rychlost reakce *v* [abs/s]**
0	0,95135	-	-
30	0,95604	0,00469	0,0001563
60	0,96054	0,00450	0,0001500
120	0,96816	0,00762	0,0001270
300	0,97848	0,01032	0,0000573

Tab. 30: CAI 241 – vypočítané ΔA a rychlosti reakce pro CAIs

Fenolová červeň			
Čas [s]	**Absorbance <430 nm>**	**ΔA**	**Rychlost reakce *v* [abs/s]**
0	0,68874	-	-
30	0,69024	0,00150	0,0000500
60	0,69543	0,00519	0,0001730
120	0,69619	0,00076	0,0000127
300	0,70142	0,00523	0,0000291
Bromthymolová modř			
Čas [s]	**Absorbance <430 nm>**	**ΔA**	**Rychlost reakce *v* [abs/s]**
0	0,65882	-	-
30	0,65871	−0,00011	−0,0000037
60	0,65933	0,00062	0,0000207
120	0,66184	0,00251	0,0000418
300	0,65986	−0,00198	−0,0000110



Obr. 42: Vývoj rychlostí reakcí CAIs v systému s FČ



Obr. 43: Vývoj rychlostí reakcí CAIs v systému s BTM

Pro komplexnější posouzení účinku jednotlivých inhibitorů na aktivitu CA byly vypočítány také průměrné rychlosti reakcí za prodloužený časový interval 300 sekund.

Tab. 31: Průměrné rychlosti reakcí za 300 s ve vzorcích s pozitivní kontrolou, negativní kontrolou a CAIs

Vzorek	⌀ rychlost reakce FČ [abs/s]	⌀ rychlost reakce BTM [abs/s]
+ kontrola – klíčky	0,0008593	0,0003393
- kontrola – sulfathiazol	0,0004995	0,0002135
CAI 176	−0,0000230	0,0000265
CAI 200	0,0001121	0,0001227
CAI 241	0,0000662	0,0000120

Následně byly vypočteny průměrné rychlosti reakcí použity pro výpočet relativní procentuální inhibiční účinnosti jednotlivých inhibitorů zvlášť pro každý ze dvou pH indikátorů. V tab. 32. jsou uvedené výsledky pro všechny čtyři koncentrace sulfathiazolu.

Tab. 32: Relativní procentuální inhibiční účinnost jednotlivých CAIs v závislosti na koncentraci sulfathiazolu a typu pH indikátoru

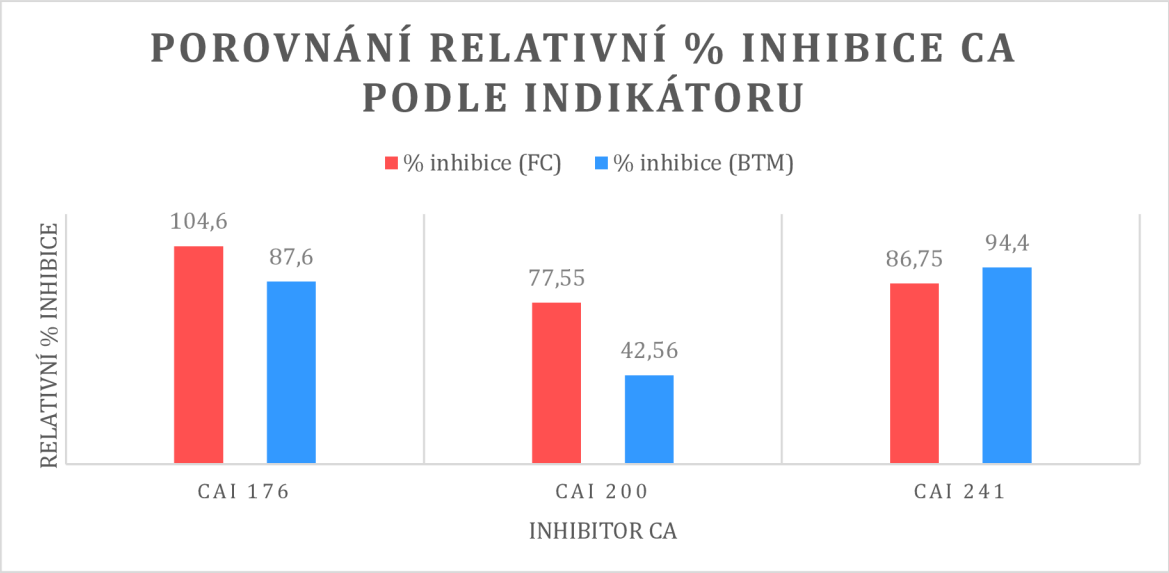
pH indikátor	Fenolová červeň			
Koncentrace sulfathiazolu	1. koncentrace	2. koncentrace	3. koncentrace	4. koncentrace
CAI 176	104,23 %	103,69 %	104,60 %	103,54 %
CAI 200	79,38 %	82,02 %	77,55 %	82,76 %
CAI 241	87,83 %	89,39 %	86,75 %	89,82 %
pH indikátor	Bromthymolová modř			
Koncentrace sulfathiazolu	1. koncentrace	2. koncentrace	3. koncentrace	4. koncentrace
176	99,39 %	68,02 %	87,60 %	64,17 %
200	97,18 %	−48,11 %	42,56 %	−65,92 %
241	99,72 %	85,56 %	94,40 %	83,82 %

V tab. 33 jsou zaznamenané finální výsledky. Jedná se o porovnání CAIs se sulfathiazolem ve 3. koncentraci.

Tab. 33: Přehled inhibiční účinnosti testovaných CAIs na aktivitu CA měřenou pH indikátory

Inhibitor	⌀ rychlost reakce FČ [abs/s]	⌀ rychlost reakce BTM [abs/s]	% inhibice (FČ)	% inhibice (BTM)	Interpretace
+ kontrola: klíčky	0,0008593	0,0003393	0 %	0 %	Neinhibuje
- kontrola: sulfathiazol	0,0004995	0,0002135	0 %	0 %	Neinhibuje
CAI 176	−0,0000230	0,0000265	104,60 %	87,60 %	Nejsilnější inhibitor
CAI 200	0,0001121	0,0001227	77,55 %	42,56 %	Slabý inhibitor
CAI 241	0,0000662	0,0000120	86,75 %	94,40 %	Středně silný inhibitor

Za účelem přehlednějšího porovnání výsledků a usnadnění interpretace výsledných dat byl sestaven sloupcový graf na obr. 44.



Obr. 44: Graf vyobrazující srovnání účinnosti CAIs podle typu pH indikátoru

3.4 Vztah chemické struktury a inhibiční účinnosti

Jedním z klíčových cílů této diplomové práce je podrobné hodnocení vztahu mezi chemickou strukturou syntetických potenciálních CAIs a jejich inhibiční účinností vůči CA. Tímto způsobem se identifikují důležité strukturní prvky odpovědné za inhibici enzymové aktivity, což se využije při dalším vývoji CAIs. V této kapitole se nachází srovnání CAIs z hlediska jejich struktury a dosažených relativních inhibičních účinností, které byly vypočítány výše podle vzorce (7). Strukturní faktory z kap. 2.3 jsou zde aplikované v praxi.

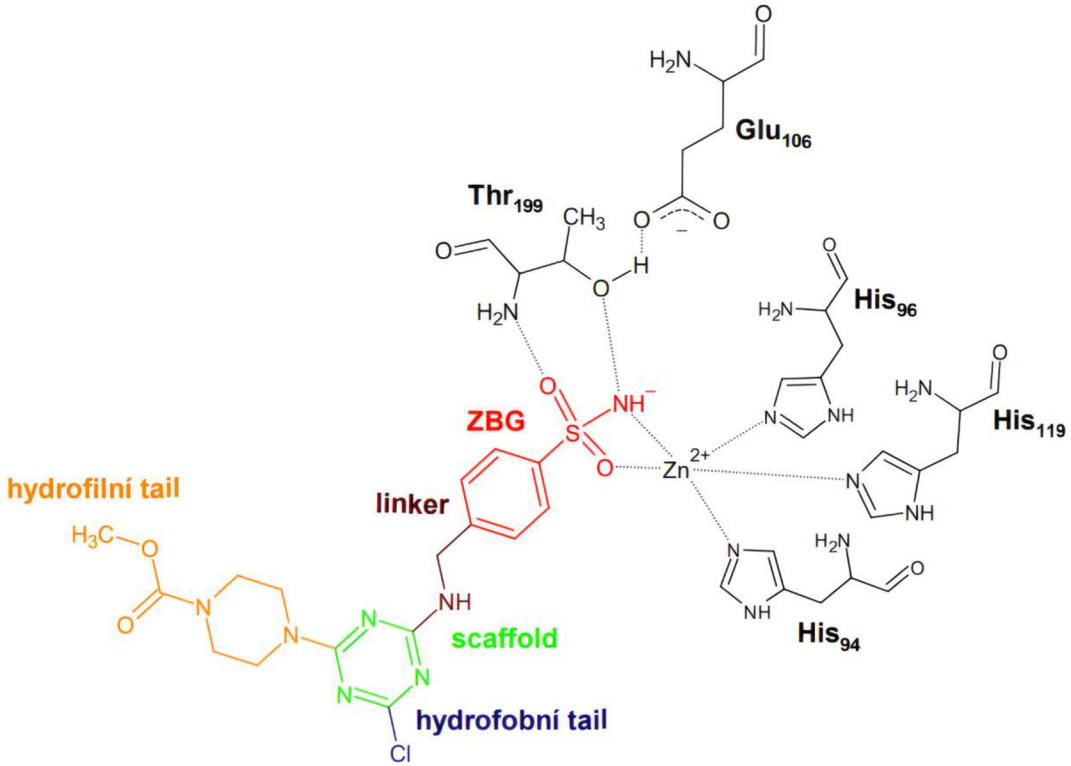
Testované CAIs v této práci jsou si podobné scaffoldem, u všech se totiž vyskytuje 1,3,5-triazinové jádro. Je tomu tak, protože sulfonamidy navázané na triazinové jádro vykazují zvýšenou afinitu k CA. [72, 109] Dalším společným rysem je ZBG, konkrétně tedy sulfonamidová skupina, na kterou je pomocí kruhového přístupu připojen aromatický kruh. [110] Díky tomu CAI interaguje se zinečnatým kationem v aktivním místě a se strážci brány. [44] Posledním společným znakem je hydrofobní tail na scaffoldu. Jedná se o navázaný chlor, který díky svému hydrofobnímu charakteru interaguje s hydrofobní polovinou aktivního místa. [111] Testované CAIs se však liší ostatními částmi farmakoforu, které ovlivňují interakce s aktivním místem CA. Právě jim lze přičítat rozdílnou inhibiční účinnost a jsou zmíněné níže.

CAI 176: Methyl-4-(4-{[4-(aminosulfonyl)benzyl]amino}-6-chlor-1,3,5-triazin-2-yl)piperazin-1-karboxylát

Tato sloučenina vykázala nejvyšší inhibiční účinek ze všech tří testovaných CAIs. V případě FČ dosáhl CAI nejvyšší hodnoty inhibičního účinku 104,6 %, což naznačuje úplné zablokování enzymatické aktivity. V přítomnosti BTM byl zaznamenán druhý nejvyšší inhibiční účinek (87,6 %).

Část farmakoforu, kterou se liší vůči ostatním CAIs, je přítomnost benzylu navázaného na sulfonamidovou skupinu. Jedná se o hydrofobní část molekuly, která pozitivně ovlivňuje inhibiční účinek. Je tomu tak, protože se jedná o méně objemný substituent než u CAI 200. Tento strukturní motiv přispívá k lepší kompatibilitě s aktivním místem CA. [72, 112]

Další výraznou strukturní výhodou tohoto inhibitoru je struktura hydrofilního tailu. Jedná se o methylesterovou skupinu navázanou přímo na piperazinový kruh, jenž je napojen na scaffold. Takto uspořádaný hydrofilní tail napomáhá účinné vazbě na cílový enzym. Přítomnost piperazinového kruhu nesoucí esterovou funkční skupinu zlepšuje vazebné vlastnosti CAI. Tato kombinace substituentů poskytuje vhodnou prostorovou orientaci pro efektivní inhibici. Zároveň snižuje riziko nevhodných interakcí s ostatními biologickými strukturami. Výsledkem je také vyšší selektivita a méně nežádoucích účinků. [72, 111]



Obr. 45: CAI 176 v aktivním místě, vlastní tvorba

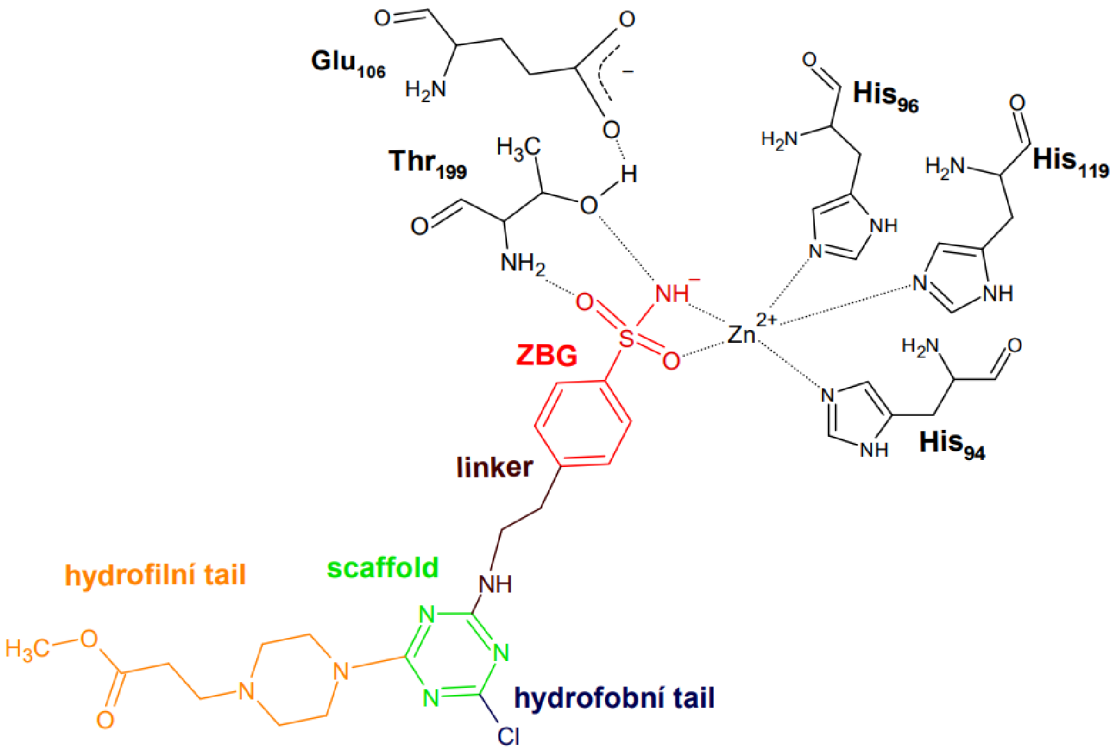
CAI 200: Methyl-3-(4-{4-chlor-6-[(4-sulfamoylfenethyl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl}piperazin-1-yl)propanoát

CAI 200 vykázal nejnižší inhibiční účinnost ve srovnání s ostatními CAIs. V přítomnosti FČ dosáhla inhibice hodnoty 77,55 %. V prostředí BTM byl její účinek výrazně nižší. Inhibiční aktivita dosáhla hodnoty pouze 42,56 %, což je nejnižší hodnota z celé testované série. Tento výsledek by mohl být na začátku experimentu překvapivý, zejména s ohledem na strukturní podobnost s nejúčinnějším inhibitorem CAI 176. Rozdíl v inhibiční účinnosti lze však vysvětlit dvěma klíčovými strukturálními odlišnostmi, které ovlivňují schopnost molekuly navázat se na aktivní místo enzymu.

První z těchto rozdílů spočívá v přítomnosti objemného substituentu. Konkrétně piperazinylethylové skupiny zakončené propanoátem, která je navázaná na triazinové jádro. Tento postranní řetězec je oproti karboxylátu u CAI 176 nejen delší, ale také prostorově náročnější. A právě toto znesnadňuje správné usazení celé molekuly do aktivního místa CA. V důsledku toho se může stát, že jednotlivé části CAI nebudou správně orientovány vůči klíčovým vazebným zbytkům enzymu. To může vést k tomu, že sulfonamidová skupina ztratí kontakt se zinečnatým kationtem nebo s okolními AMK, což negativně ovlivní celkovou účinnost inhibice. [72, 109, 110]

Druhým rozdílem je nahrazení benzylové části fenylethylovou. Tato změna přináší větší flexibilitu molekul, jež vede k horší orientaci aromatické části v aktivním

místě enzymu. To může oslabit interakci s klíčovými zbytky CA i koordinaci na zinečnatý kation, což se negativně projeví na inhibiční aktivitě. Obecně totiž o tomto typu sloučenin platí, že prodloužení alkylového řetězce vede ke zhoršení inhibiční aktivity. [72, 112, 113]



Obr. 46: CAI 200 v aktivním místě, vlastní tvorba

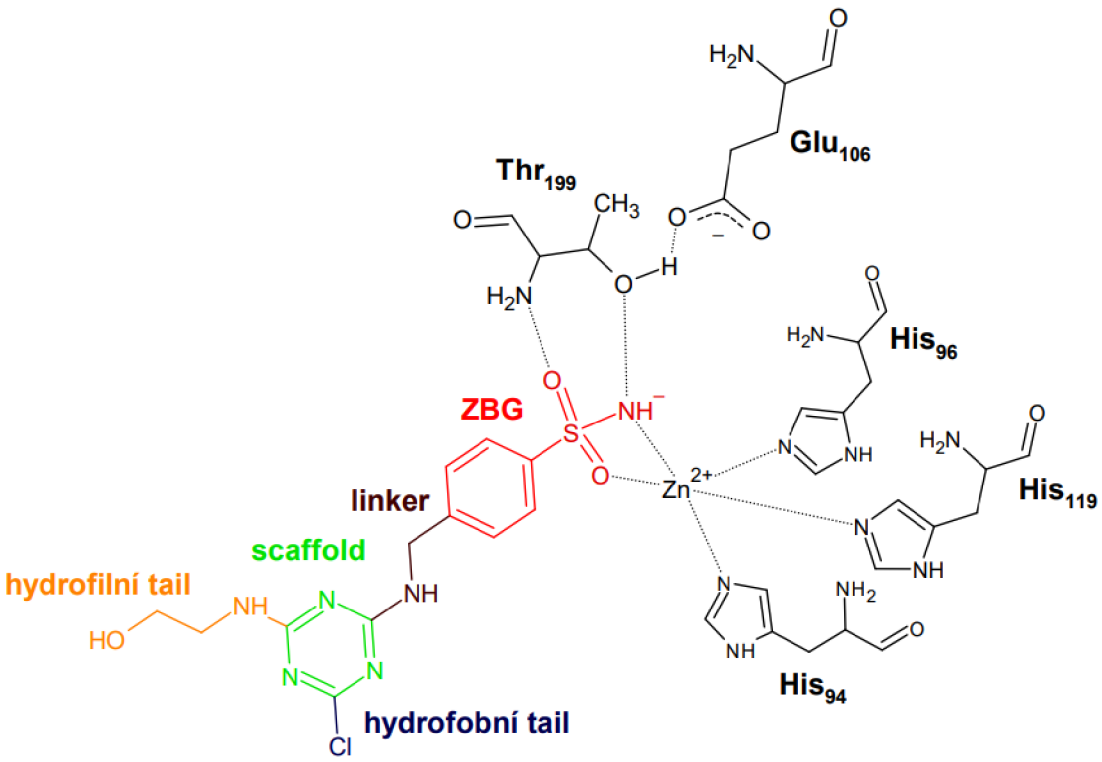
CAI 241: 4-[({4-chlor-6-[(2-hydroxyethyl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl}amino)methyl] benzensulfonamid

Třetí testovaný CAI inhiboval CA velmi dobře. V přítomnosti FČ jeho inhibice dosáhla hodnoty 86,75 % a v přítomnosti BTM dokonce 94,4 %. V porovnání s ostatními testovanými CAIs se řadí mezi středně inhibující inhibitor.

Tuto skutečnost lze přičíst několika strukturním rysům. Základ struktury je podobný CAI 176. Liší se pouze v hydrofilním tailu. CAI 241 neobsahuje na scaffoldu piperazinový kruh. Na triazinové jádro je přímo navázána hydroxyethylaminová skupina, která poskytuje dostatečnou hydrofilitu pro interakci s polárními částmi aktivního místa, a přitom nezvyšuje prostorové nároky molekuly. [114]

Stejně jako u CAI 176 i zde silnou inhibici podporuje methylenový můstek mezi triazinem a benzensulfonamidovou skupinou. Tento strukturní prvek zajišťuje potřebnou flexibilitu a umožňuje správné prostorové uspořádání molekuly. To napomáhá efektivní orientaci funkčních skupin v aktivním místě CA. Výsledkem je účinné navázání na zinkový kation a stabilizace komplexu pomocí interakcí s klíčovými AMK

nacházející se v aktivním místě. Tyto vlastnosti vedou k výrazné inhibici enzymu, která však nedosahuje nejvyšších hodnot u FČ, ale dosahuje nejvyšší hodnoty u BTM. [72, 109, 114]



Obr. 47: CAI 241 v aktivním místě, vlastní tvorba

4 Diskuse

Experimentální část mé práce byla navržena jako sled na sebe navazujících kroků vedoucích k vyvinutí metody a optimalizaci jejích podmínek pro testování inhibitorů CA. Hlavní myšlenkou bylo ověřit, zda je možné pomocí jednoduchého spektrofotometrického postupu sledovat aktivitu CA a hodnotit účinnost jejich inhibitorů. Zvolená metoda je založena na nepřímém měření, konkrétně na detekci změn pH v reakčním prostředí, které vznikají v důsledku enzymatické hydratace oxidu uhličitého. Tyto změny pH byly zaznamenávány spektrofotometricky pomocí dvou vybraných pH indikátorů, které mění svou absorbanci v závislosti na koncentraci protonů v roztoku.

V první řadě bylo nutné ověřit, zda zvolená spektrofotometrické metoda dokáže detekovat změny pH vyvolané přítomností CO_2. Tento krok byl klíčový, protože tvořil základ celé navrhované metody. Pokud je totiž systém schopen reagovat na změny pH, je následně možné sledovat i aktivitu enzymu, který tento proces katalyzuje.

Zahajovacím krokem byla optimalizace pH indikátorů, a to jak z hlediska výběru typu pH indikátoru, tak z hlediska koncentrace. Jako testované pH indikátory byly vybrány FČ a BTM. Výběr vychází z údajů uvedených v ČL 2023. Oba pH indikátory mění svou barvu v reakci na změnu pH, ale liší se rozsahem účinnosti. FČ je citlivější v neutrálnějším až mírně zásaditějším rozmezí pH, tedy 6,8–8,5. BTM reaguje spíše v kyselejším až mírně zásaditém pH, konkrétně 5,8–7,4. Informace byly získané z literatury a ČL 2023. Měřením bylo zjištěno, že optimální koncentrace pH indikátorů činila 1 % u FČ a 3 % u BTM, u obou ve formě vodných roztoků. Nižší koncentrace FČ odpovídala její silné absorpční schopnosti. Naopak BTM vyžaduje vyšší koncentraci kvůli slabší intenzitě zbarvení. Tyto úpravy pak zajistily čitelný a měřitelný signál.

Posléze byl v rámci ověřování do systému zaveden CO_2 jako substrát schopný vyvolat pokles pH nezávisle na enzymové aktivitě. K tomuto účelu byl zvolen nasycený roztok oxidu uhličitého připravený acidobazickou reakcí kyseliny citronové a uhličitanu sodného, viz reakce (4). Jednalo se o efektivní, levný a lehce řízený způsob zisku CO_2. Při reakci došlo k disociaci kyseliny citronové, čímž byly uvolněny protony, které se následně navázaly na HCO_3^- za vzniku nestabilní H_2CO_3, která se rozkládá na vodu a CO_2. V roztoku zůstala jako vedlejší produkt sůl, konkrétně citronan sodný.

Byly připraveny vzorky s přídavkem nasyceného roztoku CO_2 a kontrolní vzorky bez jeho přítomnosti. V kontrolách byla použita dvojnásobná koncentrace pH indikátoru pro zvýraznění odezvy pH indikátorů. Po přidání CO_2 byl u obou pH indikátorů zaznamenán nárůst absorbance, což potvrzuje pokles pH v důsledku acidifikace. Naměřené absorbance, které jsou v tomto textu diskutovány, jsou uvedené v tab. 9. Odpovídající absorpční spektrum je znázorněno na obr. 25. Výraznější změna byla zaznamenána u FČ, zatímco BTM reagovala méně. Tyto odlišnosti odpovídají jejich rozdílné citlivosti vůči pH. Nelze však přehlédnout, že celkový nárůst absorbance nebyl chemicky tak výrazný, jak bylo očekáváno. Důvodů, proč velká změna absorbance

nenastala, je více. Jedním z nich může být nedostatečná úroveň kyselosti nasyceného roztoku CO_2. Je totiž zřejmé, že pokud se ve vodě z rozpuštěného CO_2 nevytvoří dostatek kyseliny uhličité, okyselení nebude tak výrazné, pH se sníží pouze mírně a změna absorbance nebude tak výrazná. Dalším důvodem mohou být chyby v měření dané různými faktory experimentálních podmínek. Může se jednat o nepřesnost v odměřování či vážení, nedostatečnou čistotu kyvet nebo nastavení spektrofotometru. I přesto byla tato fáze optimalizace považována za úspěšnou, protože prokázala, že metoda dokáže zaznamenat změny pH způsobené CO_2 i bez enzymové aktivity. Tato skutečnost potvrzuje vhodnost zvolené metody pro následující fáze vývoje metody. Je také důležité zmínit, že z naměřených absorbancí v dalších fázích vývoje metody vyplynulo, že tato metoda je efektivní a poskytuje dostatečné množství rozpuštěného CO_2 pro její správné fungování.

Druhou fází bylo testování schopnosti metody zachytit enzymatickou aktivitu CA přirozeně přítomnou v rostlinném materiálu. K tomuto účelu byly připraveny extrakty z klíčků a semen čočky jedlé. U klíčků se očekávala přítomnost CA, zatímco semena sloužila jako negativní biologická kontrola v rámci optimalizace celé metody. Oba tyto typy extraktů byly měřeny za stejných podmínek. Spektrofotometrickým měřením bylo sledováno, zda dochází ke změně pH v důsledku přítomnosti CA. Naměřené absorbance klíčků jsou zaznamenány v tab. 10 a odpovídající absorpční spektra jsou znázorněna na obr. 26, 27. V případě semen jsou hodnoty absorbancí uvedeny v tab. 11 a absorpční spektra nejsou v práci uvedena, jelikož hodnoty absorbancí byly tak vysoké, že vizualizace prostřednictvím spekter by nepřispěla k hlubšímu porozumění výsledků.

Z naměřených dat lze jednoznačně konstatovat, že ve vzorcích s extraktem z klíčků dochází k výrazně rychlejšímu nárůstu absorbance v čase. Tento vývoj potvrzuje probíhající okyselení roztoku, a tím i aktivitu přítomného enzymu CA. Ze získaných absorbancí je zřejmá rozdílnost v citlivosti obou pH indikátorů na změny pH. Jednotlivé absorbance v měření s FČ v průběhu pěti minut postupně narůstají z počáteční hodnoty 0,93229 až na 1,0758. U měření s BTM je počáteční hodnota 0,98337 a po 5 minutách dosáhla hodnoty 1,04340. BTM je tedy méně citlivá na nižší pH než FČ. Z toho plyne, že FČ je vhodnějším pH indikátorem pro tuto metodu, tedy v měření při nízkých koncentracích CA ve vzorku. Kontrolní hodnota z měření bez pH indikátoru činila 0,66685, což potvrzuje, že změny absorbance vznikají výhradně v důsledku odezvy pH indikátorů na pH.

Naopak měření provedená se semeny čočky vykazují odlišný průběh. Ještě před samotným spektrofotometrickým měřením bylo vizuálně patrné, že extrakt ze semen měl vyšší barevnou intenzitu než ten z klíčků. Spektrofotometrické měření to potvrdilo. Získané hodnoty absorbancí byly mnohem vyšší v porovnání s klíčky a v čase nebyl pozorován výrazný nárůst, spíše kolísavost. U FČ se hodnoty pohybovaly od 2,02420 do 2,02570, u BTM od 2,27630 do 2,22750. Za minimálními rozdíly v absorbancích stojí vyskytující se pigment v semenech. Absorbance kontrolního měření bez

pH indikátoru byla 2,03480. Jedná se o srovnatelnou hodnotu s měřeními s pH indikátory, což potvrzuje, že nedošlo k žádné detekovatelné enzymatické aktivitě. Tento výsledek potvrzuje očekávané biologické předpoklady přítomnosti CA pouze v metabolicky aktivních částech rostlin.

Na základě naměřených hodnot absorbancí byly následně vypočteny změny absorbance a rychlosti reakce. Výsledky vypočítaných hodnot pro klíčky jsou uvedeny v tab. 12, 13. Nejvyšší rychlost reakce byla zaznamenána u FČ během prvních 30 s, konkrétně 0,001339 abs/s, zatímco v kontrolním vzorku pouze 0,0001043 abs/s, což představuje více než desetinásobný rozdíl. U BTM byly naměřeny obdobné hodnoty, přičemž rychlost reakce u vzorku s klíčky činila 0,000937667 abs/s, zatímco v kontrolním vzorku jen 0,000149667 abs/s. Tyto rozdíly potvrzují, že v přítomnosti CA dochází k výrazně rychlejší hydrataci CO_2. Z porovnání obou pH indikátorů opět vychází FČ jako vhodnější pH indikátor. Analogickými výpočty byly rychlosti reakce vypočteny i pro semena. Výsledky jsou zaznamenané v tab. 14, 15. Pro pH indikátor FČ je patrné, že ve vzorcích obsahující extrakt ze semen je ΔA minimální. V intervalu 0–30 s došlo dokonce k mírnému poklesu absorbance do záporné hodnoty (v = –0,00037333 abs/s), následovaný velmi malým vzestupem v následujícím intervalu (30–60 s). Oproti tomu kontrolní vzorek bez semen vykazuje očekávaný průběh s mírně rostoucí absorbancí na začátku, což odpovídá tomu, že acidobazická reakce probíhá. V systému s BTM je situace obdobná. Vzorek obsahující extrakt semen vykazuje mezi 0 a 30 s pokles absorbance a tedy i zápornou hodnotu rychlosti reakce (v = –0,00099333 abs/s). Stejně je tomu tak i v následujícím intervalu 30–60 s, kde došlo k ještě většímu poklesu rychlosti reakce (v = –0,0000833 abs/s).

V případě obou pH indikátorů se rychlosti reakce pohybují v nízkých hodnotách, které neodpovídají dynamice enzymově katalyzované hydrataci CO_2. Absence strmého nárůstu absorbance a velmi nízké nebo až záporné hodnoty rychlosti reakce potvrzují, že semena čočky postrádají měřitelnou aktivitu CA. Tyto výsledky jsou v souladu s očekáváním, že se enzym CA nachází pouze v metabolicky aktivních pletivech, nikoli však ve fyziologicky stálých semenech.

Pro přesnější detekci CA v rostlinných extraktech byl použit výpočet rychlosti reakce v delším časovém úseku, konkrétně 300 s. Tento výpočet umožňuje vystihnout celkový průběh enzymové reakce. Výhodné to je zejména proto, kdyby aktivita CA byla nižší a projevila se až v pozdějších fázích měření. Vypočítané hodnoty uvedené v tab. 16 ukazují, že extrakty z klíčků vykazují výrazně vyšší rychlosti reakce než extrakty ze semen, a to u obou pH indikátorů. U FČ dosáhla rychlost reakce hodnoty 0,028702 abs/s, zatímco u semen pouze 0,0003 abs/s. Podobný rozdíl je patrná i u BTM. U klíčků činila rychlost reakce 0,01201 abs/s, zatímco u semen byla záporná, konkrétně –0,00976 abs/s. Tato záporná hodnota svědčí o mírném poklesu absorbance v tomto měření. Tyto rozdíly jsou natolik výrazné, že lze s jistotou potvrdit přítomnost CA v klíčcích. Naopak nízké nebo až záporné hodnoty rychlosti

u nenaklíčených semen indikují buď úplnou absenci CA, nebo jeho aktivitu na úrovni pod hranicí detekce.

Na základě provedených měření bylo potvrzeno, že zvolená spektrofotometrická metoda, využívající pH indikátory, spolehlivě rozlišuje vzorky s aktivní CA od těch, kde enzym chybí. Výsledky prokázaly, že enzym CA je přítomen v klíčcích, zatímco v semenech nebyla jeho aktivita detekována. FČ se z těchto hodnocení ukázala jako vhodnější pH indikátor oproti BTM. Zařazení semen jako biologické negativní kontroly potvrdilo, že sledované změny absorbancí skutečně souvisí s enzymatickou aktivitou.

Ve třetí fázi vývoje metody byl do experimentu zahrnut sulfathiazol. Účelem zařazení sulfathiazolu bylo jeho použití jako negativní kontroly pro hodnocení inhibičního účinku studovaných látek na CA. Cílem této fáze bylo verifikovat, zda zvolená metoda je schopna odlišit látky bez inhibičního účinku vůči CA, jako je právě sulfathiazol, od skutečných inhibitorů CA. Sulfathiazol není známý jako inhibitor CA. Byl zvolen jako vhodný model na základě své chemické struktury. Přestože ve své struktuře obsahuje sulfonamidovou funkční skupinu, která se vyskytuje i u CAIs, sám o sobě inhibici nevykazuje. Od testovaných CAIs se odlišuje zejména scaffoldem. Zatímco CAIs obsahují 1,3,5-triazinový kruh a jako scaffold benzenové jádro, sulfathiazol je založen na heterocyklickém thiazolovém kruhu. Tento chemický fakt potvrdil, že případná inhibice CA v následujícím testování CAI, nebyla způsobena sulfathiazolem, ale skutečně syntetizovanými sloučeninami.

Pro experiment byly připraveny čtyři roztoky sulfathiazolu v různých koncentracích. Každý vzorek byl následně měřen s oběma pH indikátory za přítomnosti CO_2 a extraktu z klíčků čočky, přičemž byla sledována změna absorbance v čase. Naměřené hodnoty pro jednotlivé koncentrace jsou uvedeny v tab. 17–20. Odpovídající absorpční spektra pak na obr. 28, 30, 32 a 34. Na základě údajů o naměřených absorbancích byly sestaveny grafy závislosti absorbance na čase, které umožnily sledovat průběh reakce při každé koncentraci sulfathiazolu. Tyto grafy jsou zobrazené na obr. 29, 31, 33 a 35. Absorbance ve všech případech zůstávala relativně stabilní, bez prudkých výkyvů, které by značily inhibici aktivity CA. U žádné koncentrace nebyl zaznamenán takový průběh, který by odpovídal typickému chování účinně fungujícímu inhibitoru CA. Rozdíly mezi pH indikátory jsou však opět patrné. FČ vykazovala o něco vyšší citlivost a čitelnější signál, zatímco BTM reagovala pomaleji.

Obdobně jako ve druhé části, i zde na základě absorbancí v jednotlivých časových intervalech byly vypočteny rychlosti reakce. Výsledky těchto výpočtů jsou uvedeny v tab. 21–24. Zjištěné rychlosti byly oproti měřením s klíčky bez přítomnosti sulfathiazolu třikrát menší, přesto však nedosahovaly hodnot, které by naznačovaly výraznou inhibici aktivity CA. Nejvyšší rychlost vykazovala FČ při 4. koncentraci sulfathiazolu v intervalu 30–60 s. Tato rychlost měla hodnotu 0,001267 abs/s. Nejnižší rychlost reakce pak dosahoval vzorek s 1. koncentrací sulfathiazolu ve spojení s BTM ve stejném časovém intervalu. Tato rychlost činila $v = -0{,}000012667$ abs/s.

Sulfathiazol se ve všech koncentracích vyznačoval nižšími rychlostmi reakcí než bez jeho přítomnosti, avšak inhibiční účinek nevykazoval. Proto enzymová aktivita CA zůstala zachována. Tímto hodnocením se sulfathiazol osvědčil jako spolehlivá referenční látka pro následující hodnocení potenciálních CAIs. Zároveň z výsledných rychlostí reakcí vyplývá, že FČ se opět ukázala jako vhodnější pH indikátor v porovnání s BTM. FČ totiž reaguje rychleji a výrazněji, zatímco reakce s BTM jsou pozvolnější a méně dynamické. Navíc z porovnání rychlostí reakce všech čtyř koncentrací sulfathiazolu vyšlo najevo, že koncentrace číslo tři představuje nejvhodnější negativní kontrolu. Poskytuje vyrovnané a stabilní hodnoty rychlostí reakce, a to bez výkyvů či záporných hodnot u obou pH indikátorů. Proto byla koncentrace $3 \cdot 10^{-4}$ g/50 ml zvolena jako nejoptimálnější pro další fáze experimentu.

Čtvrtou a poslední fází vývoje metody bylo finální testování inhibičního účinku syntetických derivátů 1,3,5-triazinu na aktivitu CA v biologickém systému obsahující extrakt z klíčků čočky s přítomnou CA. Pro vlastní testování byly použity tři syntetizované látky s potenciálním inhibičním účinkem, označené jako CAI 176, CAI 200, CAI 241. Výběr těchto sloučenin byl založen na přítomnosti funkčních skupin, které se běžně vyskytují u známých inhibitorů CA, jako je sulfonamidová funkční skupina a 1,3,5-triazinové jádro. Vzhledem k omezené rozpustnosti těchto látek ve vodném prostředí, byly jednotlivé roztoky připraveny podobným způsobem jako vzorky sulfathiazolem, a to rozpuštěním vzorků v minimálním množství DMSO a následným vytvořením roztoku s uhličitanem sodným. Spektrofotometricky byl poté měřen vzorek obsahující extrakt z klíčků čočky, roztok kyseliny citronové, roztok uhličitanu sodného s testovaným inhibitorem a postupně oba vodné roztoky pH indikátorů. Naměřené absorbance jednotlivých potenciálních inhibitorů jsou uvedeny v tab. 25–27. Odpovídající absorpční spektra jsou vyobrazeny na obr. 36, 38, 40. Grafy naměřených absorbancí vyjadřují obr. 37, 49, 41.

Poté následovalo standardní vypočítání rychlostí reakcí, a to v časových intervalech obdobně jako v předchozích fázích vývoje metody. Výsledky výpočtů jsou uvedeny v tabulkách 28–30. Tyto hodnoty umožnily přímé srovnání mezi testovanými látkami, pozitivní kontrolou (bez inhibitoru a sulfathiazolu, měření s klíčky), a negativní kontrolou (sulfathiazol).

Z výsledků výpočtů vyplynulo, že všechny tři testované látky, vedly k určitému snížení rychlosti reakce v porovnání s měřením s klíčky, ve kterých byla CA plně aktivní (pozitivní kontrola). To naznačuje, že tyto látky ovlivnily aktivitu enzymu CA. Míra inhibice však nebyla u všech CAIs stejná. Nejvýraznější snížení rychlosti reakce bylo pozorováno u CAI 176, zejména při použití FČ v časových intervalech 0–60 s. Až v pozdějších intervalech docházelo k mírnému nárůstu rychlostí, avšak hodnoty zůstávaly i nadále pod úrovní ostatních CAIs. Ve srovnání s negativní kontrolou byly reakční rychlosti CAI 176 podstatně nižší, což potvrzuje inhibiční účinek CAI 176. V porovnání s pozitivní kontrolou, tedy s měřením obsahující klíčky bez inhibitoru či sulfathiazolu, nedosahovaly vypočtené rychlosti CAI 176 ani poloviny hodnot kontrolního měření.

Výsledky navíc vykazovaly stabilitu napříč celým sledovaným časovým úsekem, což svědčí o konzistentním inhibičním působení. Na základě těchto údajů lze CAI 176 označit za nejslibnější a nejúčinnější inhibitor z hodnocené trojice sloučenin.

U látky CAI 200 jsou výsledné rychlosti reakcí řádově vyšší než u CAI 176. Ačkoli ve srovnání s pozitivní kontrolou (měření pouze s klíčky) jsou rychlosti nižší, k výrazné inhibici nedochází. U BTM se rychlosti pohybují v podobných hodnotách. Z tohoto důvodu CAI 200 působí pouze slabě inhibičně vůči CA, nebo jeho účinek není natolik silný, aby reakci zásadně zpomalil.

CAI 241 se hodnotami pohybuje mezi zbývajícími dvěma CAIs. U FČ jsou rychlosti nižší než u CAI 200, avšak vyšší než u CAI 176. Průběh je rovnoměrný, což značí určitý inhibiční účinek, avšak méně výrazný. U BTM došlo ke kolísání hodnot a objevily se i záporné rychlosti.

Rychlosti reakcí byly dále graficky zpracovány a znázorněny na obr. 42, 43. Z grafu pro FČ je patrné, že látka CAI 176 dosahuje nejvyššího inhibičního účinku. V intervalu 0–60 s jsou hodnoty záporné, což naznačuje silnou inhibici. Po 120 s dochází k mírnému nárůstu rychlosti, který může být způsoben spotřebováním CO_2. CAI 200 dosahuje nejvyšší rychlosti ve druhém intervalu 30–60 s, ale poté rychlost klesá a stabilizuje se na nízké úrovni. Proto CAI 200 vykazuje nejnižší inhibiční potenciál. Naopak CAI 241 vykazuje relativně rovnoměrný průběh s mírně rostoucí tendencí, ale zůstává v celém měření pod hodnotami CAI 200, což svědčí o jejím mírně silnějším inhibičním účinku. Graf na obr. 43 pro BTM vykazuje podobný trend, avšak s nižší citlivostí na malé rozdíly mezi inhibitory. V grafu pro BTM má CAI 176 zpočátku nejvyšší rychlost, poté však prudce klesá, rychlosti zůstávají v nízkých hodnotách a poté zase stoupnou. Tento nevyzpytatelný průběh ukazuje, že CAI 176 v systému BTM nefunguje jako silný inhibitor, spíše slabší. CAI 200 má v průběhu celé reakce kladné hodnoty, které jsou však nejvyšší ze všech CAIs. Průběh je rovnoměrný, avšak klesající a potvrzuje to pouze částečnou inhibici. CAI 241 vykazuje nízké hodnoty kolem nuly, v některých intervalech i záporné. Tyto výsledky odpovídají silné inhibiční aktivitě v systému s BTM.

Naměřené absorbance byly také využity k výpočtu průměrných rychlostí reakcí. Tento výpočet umožňoval lépe vystihnout celkový průběh reakce v čase, a to zejména v případech, kdy mohla být inhibice méně výrazná nebo nastupovala pomaleji. Výsledné hodnoty byly porovnávány napříč testovanými vzorky, a to se dvěma referenčními hodnotami. S měřením pouze s klíčky (pozitivní kontrola) a se sulfathiazolem (negativní kontrola). Vypočítané hodnoty jsou uvedeny v tab. 31, zvlášť pro FČ a BTM. Z porovnání jednoznačně vyplynulo, že nejvyšší rychlosti reakce dosáhl vzorek s klíčky, což odpovídá přirozené enzymatické aktivitě CA bez inhibičního zásahu. Přítomnost sulfathiazolu sice vedla k mírnému zpomalení reakce, avšak hodnoty rychlostí potvrzují, že k inhibici CA nedochází. CA zůstala funkční, a rozdíl oproti pozitivní kontrole lze přičíst např. fyzikálním vlivům nebo menší interferenci s měřením. Z testovaných inhibitorů vykazoval nejnižší průměrnou rychlost CAI 176, a to u obou pH

indikátorů. Tento inhibitor prakticky zcela zastavil enzymatickou přeměnu CO_2, jelikož rychlost u FČ byla dokonce záporná. CAI 241 také inhiboval CA, ale ne v takovém rozsahu jako CAI 176. Naopak CAI 200 měl ze všech tří inhibitorů nejvyšší průměrnou rychlost, takže byl považován za nejslabší inhibitor CA.

Vypočítané rychlosti reakcí sloužily jako podklad pro výpočet relativní inhibiční účinnosti jednotlivých CAIs vůči negativní kontrole. Výpočty byly provedeny podle vzorce (7), kde jako referenční rychlost $v_{negativní\ kontrola}$ byla použita průměrná rychlost sulfathiazolu. V tab. 32 jsou zaznamenané % účinnosti pro všechny čtyři koncentrace sulfathiazolu. Z hodnot vyplývá, že CAI 176 vykazuje ve všech případech vysokou inhibiční účinnost. U FČ dokonce přesahující 100 %, což značí úplné potlačení enzymatické aktivity CA. Může to být také důsledkem výpočtu z průměrných rychlostí reakce. U BTM jsou hodnoty stále velmi vysoké. CAI 200 má účinek velmi kolísavý a výrazně nižší. V systému s FČ hodnoty kolísají mezi 77–83 %. Zatímco v systému s BTM jsou hodnoty ve 2. a 4. koncentraci dokonce záporné. CAI 241 vykazuje stabilní a poměrně vysoké hodnoty, s mírnými rozdíly mezi pH indikátory. Nejvyrovnanější hodnoty napříč všemi CAIs a pH indikátory vykazuje 3. koncentrace sulfathiazolu. Tato koncentrace se jeví jako nejvhodnější pro srovnání inhibiční aktivity CAI, protože poskytuje konzistentní hodnoty relativních procentuálních inhibičních účinností.

V tab. 33 je uvedené finální porovnání všech CAIs se 3. koncentrací sulfathiazolu a pozitivní kontrolou (měření pouze s klíčky). Ze srovnání v této tabulce vyplývá, že CAI 176 byl nejsilnějším inhibitorem CA, zejména v systému s FČ. CAI 241 vykazoval rovněž vysokou inhibiční účinnost, nejlépe však působil v BTM. CAI 200 měl nejslabší inhibiční účinek. Silnějším inhibitorem byl v systému s FČ. Z těchto procentuálních inhibičních účinností byl pro finální vyhodnocení a porovnání jednotlivých CAIs sestaven sloupcový graf vyobrazený na obr. 44.

Na základě porovnání strukturních vlastností CAIs a výsledků inhibiční účinnosti v kap. 3.4, lze konstatovat, že inhibiční účinek jednotlivých testovaných sloučenin je ovlivněn přítomností sulfonamidové skupiny. Samotná přítomnost této funkční skupiny však k silné inhibici nestačí. Rozhodující je celkové prostorové uspořádání molekuly a povaha substituentů navázaných na 1,3,5-triazinový scaffold.

Struktura CAI 176, jakožto nejúčinnějšího inhibitoru, je charakteristická přítomností benzylové skupiny a methylesteru navázaného na piperazinový kruh. Tato kombinace substituentů zajišťuje efektivní ukotvení v aktivním místě CA a zároveň podporuje vazebné interakce s klíčovými oblastmi enzymu.

CAI 200 naopak vykazoval nejnižší inhibiční potenciál. Důvodem je přítomnost objemnějšího a flexibilnějšího postranního řetězce, tedy fenylethylu s propanoátem, který zhoršuje orientaci klíčových skupin v aktivním místě a snižuje účinnost vazebných interakcí

CAI 241 představuje strukturální i inhibiční kompromis. Strukturně se podobá CAI 176, avšak místo piperazinového kruhu obsahuje přímo navázanou hydroxyethyaminovou skupinu. Tím se odlišuje i od CAI 200. Tato hydrofilní skupina má menší

prostorové nároky, čímž zvyšuje inhibiční účinek. K silné inhibici dále přispívá methylenový můstek mezi triazinem a benzensulfoanamidem, jenž umožňuje správnou orientaci v aktivním místě, stejně jako u CAI 176.

Výsledky poslední fáze potvrdily, že zvolená spektrofotometrická metoda je schopná nejen detekovat přítomnost aktivní CA, ale také je vhodná pro screening potenciálních inhibitorů CA ve vodném biologickém systému bez nutnosti specifické izolace enzymu.

Na základě všech provedených měření lze testované CAIs seřadit následovně: CAI 176 > CAI 241 > CAI 200.

5 Závěr

Předložená diplomová práce byla zaměřena na vývoj a optimalizaci jednoduché spektrofotometrické metody pro hodnocení inhibiční aktivity látek vůči enzymu CA získaného z rostlinného materiálu.

V teoretické části byl shrnut biologický význam CA, její molekulární struktura, jednotlivé třídy a izoformy, a fyziologické funkce v organismu. Podrobně byl popsán také mechanismus katalýzy. Dále byla věnována pozornost inhibitorům CA, od popisu mechanismů inhibice až po vývoj inhibitorů různými chemickými přístupy. Zvláštní důraz byl kladen na vztah mezi chemickou strukturou inhibitorů a jejich biologickým účinkem. Poslední kapitola teoretické části byla věnovaná analytickým metodám používaným ke studiu CAs. Popsány byly výhody a nevýhody tradičních metod a byla odůvodněna volba spektrofotometrie v kombinaci s pH indikátory, jako vhodné řešení pro vyvíjenou metodu. Byl vysvětlen její princip a uvedeny metody hodnocení.

Experimentální část této práce byla navržena jako sled logicky navazujících fází, jejichž cílem bylo ověřit funkčnost systému, potvrdit enzymovou aktivitu a testovat inhibiční účinky.

V první kapitole byly charakterizovány studované látky v rámci tomto experimentu. Byly vyobrazeny jejich chemické struktury, chemické a fyzikální vlastnosti. Nejprve byla ověřena schopnost zvolené metody detekovat změny pH vyvolané přítomností CO_2. V této fázi byla provedena optimalizace typu a koncentrace pH indikátorů, konkrétně fenolové červeně a bromthymolové modři. Následně byla metoda úspěšně aplikována na detekci enzymatické aktivity v rostlinném materiálu. Výsledky ukázaly, že CA je přítomna v klíčcích čočky, zatímco v semenech čočky aktivní enzym detekován nebyl. Ve třetí fázi byl jako negativní kontrola testován sulfathiazol, který neprokázal inhibiční účinek na CA. Ve finálním kroku byly testovány tři syntetizované inhibitory. Z nich vykázal nejvyšší inhibiční účinnost CAI 176, CAI 241 střední inhibiční účinnost a CAI 200 nejslabší inhibici. Z výsledků jednoznačně vyplynulo, že FČ byla citlivější na změny pH než BTM.

Závěrem lze konstatovat, že vyvinutá metoda splnila stanovený cíl. Je časově i finančně nenáročná, snadno reprodukovatelná, aplikovatelná v běžně vybavené laboratoři a vhodná pro rutinní screening inhibitorů CA. Fenolová červeň se přitom potvrdila jako nejvhodnější pH indikátor pro tuto metodu. Je důležité zmínit také to, že navrhovaná metoda je nejen nová a originální, poskytuje především významný přínos do vývoje inhibitorů CA z pohledu analýzy nových potenciálních léčiv. Ačkoli výsledky této práce ukazují, že navržená metoda je funkční, spolehlivá a vhodná pro hodnocení inhibiční účinnosti vůči CA, metoda si nicméně nadále žádá další ověřovací a validační studie na širším spektru vzorků a inhibitorů.

Použité zdroje

[1] SUPURAN, Claudiu T. Structure and function of carbonic anhydrases. *The Biochemical journal* [online]. 2016, **473**(14), 2023–2032 [vid. 2025-02-11]. ISSN 1470-8728. Dostupné z: doi:10.1042/BCJ20160115

[2] *IUBMB Nomenclature Home Page* [online]. [vid. 2025-02-11]. Dostupné z: https://iubmb.qmul.ac.uk/

[3] PALMER, Trevor a Phillip BONNER. *ENZYMES: Biochemistry, Biotechnology and Clinical Chemistry*. Second Edition. B.m.: Woodhead Publishing, 2007. ISBN 978-1-904275-27-5.

[4] *Carbonic anhydrase | Enzyme Function, Catalysis & Regulation | Britannica* [online]. [vid. 2025-02-11]. Dostupné z: https://www.britannica.com/science/carbonic-anhydrase

[5] KIRCHEVA, Nikoleta, Silvia ANGELOVA a Todor DUDEV. Carbonic Anhydrases: Different Active Sites, Same Metal Selectivity Rules. *Molecules* [online]. 2024, **29** [vid. 2025-02-11]. Dostupné z: doi:10.3390/molecules29091995

[6] AKOCAK, Suleyman a Claudiu T. SUPURAN. Activation of α-, β-, γ- δ-, ζ- and η-class of carbonic anhydrases with amines and amino acids: a review. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2019, **34**(1), 1652–1659 [vid. 2025-02-12]. ISSN 14756374. Dostupné z: doi:10.1080/14756366.2019.1664501

[7] SUPURAN, Claudiu T. Carbonic anhydrase versatility: from pH regulation to CO2 sensing and metabolism. *Frontiers in Molecular Biosciences* [online]. 2023, **10**, 1326633 [vid. 2025-02-12]. ISSN 2296889X. Dostupné z: doi:10.3389/FMOLB.2023.1326633/BIBTEX

[8] SUPURAN, Claudiu T. A simple yet multifaceted 90 years old, evergreen enzyme: Carbonic anhydrase, its inhibition and activation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online]. 2023, **93**, 129411 [vid. 2025-02-12]. ISSN 0960-894X. Dostupné z: doi:10.1016/J.BMCL.2023.129411

[9] NOCENTINI, Alessio, Clemente CAPASSO a Claudiu T. SUPURAN. Carbonic Anhydrase Inhibitors as Novel Antibacterials in the Era of Antibiotic Resistance: Where Are We Now? *Antibiotics (Basel, Switzerland)* [online]. 2023, **12**(1) [vid. 2025-02-12]. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/ANTIBIOTICS12010142

[10] SUPURAN, Claudiu T. Carbonic Anhydrases - An Overview. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2008, **14**(7), 603–614 [vid. 2025-02-12]. ISSN 13816128. Dostupné z: doi:10.2174/138161208783877884

[11] FERRARONI, Marta. γ-Carbonic anhydrases. *Carbonic Anhydrases: Biochemistry and Pharmacology of an Evergreen Pharmaceutical Target* [online]. 2019, 79–105 [vid. 2025-02-25]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816476-1.00004-6

[12] SUPURAN, Claudiu T. a Clemente CAPASSO. An Overview of the Bacterial Carbonic Anhydrases. *Metabolites* [online]. 2017, **7**(4) [vid. 2025-02-25]. ISSN 2218-1989. Dostupné z: doi:10.3390/METABO7040056

[13] SUPURAN, Claudiu T. Bacterial carbonic anhydrases as drug targets: toward novel antibiotics? *Frontiers in pharmacology* [online]. 2011, **2** [vid. 2025-02-25]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/FPHAR.2011.00034

[14] BEAUCHEMIN, Mathieu a David MORSE. δ-Carbonic Anhydrases: Structure, Distribution, and Potential Roles. *Carbonic Anhydrases as Biocatalysts: From Theory to Medical and Industrial Applications* [online]. 2015, 337–349 [vid. 2025-02-25]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-63258-6.00019-6

[15] SUPURAN, Claudiu T. a Clemente CAPASSO. The η-class carbonic anhydrases as drug targets for antimalarial agents. *Expert opinion on therapeutic targets* [online]. 2015, **19**(4), 551–563 [vid. 2025-02-25]. ISSN 1744-7631. Dostupné z: doi:10.1517/14728222.2014.991312

[16] D'AMBROSIO, Katia, Anna DI FIORE, Martina BUONANNO, Simona Maria MONTI a Giuseppina DE SIMONE. η- and θ-carbonic anhydrases. *Carbonic Anhydrases: Biochemistry and Pharmacology of an Evergreen Pharmaceutical Target* [online]. 2019, 139–148 [vid. 2025-02-25]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816476-1.00007-1

[17] NOCENTINI, Alessio, Claudiu T. SUPURAN a Clemente CAPASSO. An overview on the recently discovered iota-carbonic anhydrases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2021, **36**(1), 1988–1995 [vid. 2025-02-12]. ISSN 14756374. Dostupné z: doi:10.1080/14756366.2021.1972995

[18] LOMELINO, Carrie L., Claudiu T. SUPURAN a Robert MCKENNA. Non-Classical Inhibition of Carbonic Anhydrase. *International journal of molecular sciences* [online]. 2016, **17**(7) [vid. 2025-02-25]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/IJMS17071150

[19] GOKCEN, Taner, Ilhami GULCIN, Turan OZTURK a Ahmet C. GOREN. A class of sulfonamides as carbonic anhydrase I and II inhibitors. *Journal of Enzyme*

Inhibition and Medicinal Chemistry [online]. 2016, **31**, 180–188 [vid. 2025-02-12]. ISSN 14756374. Dostupné z: doi:10.1080/14756366.2016.1198900

[20] DI FIORE, Anna, Katia D'AMBROSIO, Joelle AYOUB, Vincenzo ALTERIO a Giuseppina DE SIMONE. α-Carbonic anhydrases. *Carbonic Anhydrases: Biochemistry and Pharmacology of an Evergreen Pharmaceutical Target* [online]. 2019, 19–54 [vid. 2025-02-25]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816476-1.00002-2

[21] CARTA, Fabrizio, Claudiu T. SUPURAN a Andrea SCOZZAFAVA. Sulfonamides and their isosters as carbonic anhydrase inhibitors. *Future medicinal chemistry* [online]. 2014, **6**(10), 1149–1165 [vid. 2025-02-23]. ISSN 1756-8927. Dostupné z: doi:10.4155/FMC.14.68

[22] ERZURUM, Delal, Derya OSMANIYE, Begüm Nurpelin SAĞLLK, Serkan LEVENT, Yusuf ÖZKAY a Zafer Aslm KAPLANCLKLL. Design, synthesis, and biological activity studies of carbonic anhydrase inhibitors. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* [online]. 2023, **78**(11–12), 421–432 [vid. 2025-02-13]. ISSN 18657125. Dostupné z: doi:10.1515/ZNC-2023-0102/DOWNLOADASSET/SUPPL/J_ZNC-2023-0102_SUPPL_001.DOCX

[23] DE SIMONE, Giuseppina, Vincenzo ALTERIO a Claudiu T. SUPURAN. Exploiting the hydrophobic and hydrophilic binding sites for designing carbonic anhydrase inhibitors. *Expert Opinion on Drug Discovery* [online]. 2013, **8**(7), 793–810 [vid. 2025-02-13]. ISSN 17460441. Dostupné z: doi:10.1517/17460441.2013.795145

[24] *Obecná struktura enzymů – WikiSkripta* [online]. [vid. 2025-02-12]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Obecn%C3%A1_struktura_enzym%C5%AF

[25] LOMELINO, Carrie L., Jacob T. ANDRING a Robert MCKENNA. Crystallography and Its Impact on Carbonic Anhydrase Research. *International Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2018, **2018**(1), 9419521 [vid. 2025-02-12]. ISSN 2090-2077. Dostupné z: doi:10.1155/2018/9419521

[26] SUPURAN, Claudiu T. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews Drug Discovery 2008 7:2* [online]. 2008, **7**(2), 168–181 [vid. 2025-02-12]. ISSN 1474-1784. Dostupné z: doi:10.1038/nrd2467

[27] JONSSON, Bengt Harald a Anders LILJAS. Perspectives on the Classical Enzyme Carbonic Anhydrase and the Search for Inhibitors. *Biophysical Journal* [online]. 2020, **119**(7), 1275–1280 [vid. 2025-02-12]. ISSN 15420086. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2020.08.020

[28] TU, Chingkuang, Lauren FOSTER, Andrea ALVARADO, Robert MCKENNA, David N. SILVERMAN a Susan C. FROST. Role of zinc in catalytic activity of carbonic anhydrase IX. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2012, **521**(1–2), 90–94 [vid. 2025-02-12]. ISSN 0003-9861. Dostupné z: doi:10.1016/J.ABB.2012.03.017

[29] SINGH, Priti, Mohammed ARIFUDDIN, Claudiu T. SUPURAN a Sridhar Goud NERELLA. Carbonic anhydrase inhibitors: Structural insights and therapeutic potential. *Bioorganic Chemistry* [online]. 2025, **156**, 108224 [vid. 2025-02-12]. ISSN 0045-2068. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOORG.2025.108224

[30] KIM, Jin Kyun, Cheol LEE, Seon Woo LIM, Aniruddha ADHIKARI, Jacob T. ANDRING, Robert MCKENNA, Cheol Min GHIM a Chae Un KIM. Elucidating the role of metal ions in carbonic anhydrase catalysis. *Nature communications* [online]. 2020, **11**(1) [vid. 2025-02-22]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/S41467-020-18425-5

[31] YADAV, Pulala Raghuveer, Syed Hussain BASHA a Pavan Kumar PINDI. Role of Thr199 residue in human β-carbonic anhydrase-II pH-dependent activity elucidated by microsecond simulation analysis. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* [online]. 2022, **40**(11), 5016–5025 [vid. 2025-02-12]. ISSN 15380254. Dostupné z: doi:10.1080/07391102.2020.1865203

[32] KUMAR, Amit, Kiran SIWACH, Claudiu T. SUPURAN a Pawan K. SHARMA. A decade of tail-approach based design of selective as well as potent tumor associated carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorganic Chemistry* [online]. 2022, **126**, 105920 [vid. 2025-02-16]. ISSN 0045-2068. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOORG.2022.105920

[33] BOONE, Christopher D., Melissa PINARD, Rob MCKENNA a David SILVERMAN. Catalytic Mechanism of α-Class Carbonic Anhydrases: CO2 Hydration and Proton Transfer. *Subcellular Biochemistry* [online]. 2014, **75**, 31–52 [vid. 2025-02-22]. ISSN 03060225. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-007-7359-2_3

[34] SUPURAN, Claudiu T. How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2016, **31**(3), 345–360 [vid. 2025-02-12]. ISSN 14756374. Dostupné z: doi:10.3109/14756366.2015.1122001

[35] GANGULY, Abir, Trung Quan LUONG, Oliver BRYLSKI, Michael DIRKMANN, David MÖLLER, Simon EBBINGHAUS, Frank SCHULZ, Roland WINTER, Elsa SANCHEZ-GARCIA a Walter THIEL. Elucidation of the Catalytic Mechanism of a Miniature Zinc Finger Hydrolase. *Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2017, **121**(26), 6390–6398 [vid. 2025-02-12]. ISSN 15205207. Dostupné z: doi:10.1021/ACS.JPCB.7B05027/SUPPL_FILE/JP7B05027_SI_001.PDF

[36] BANDEIRA, Nuno A.G., Somenath GARAI, Achim MÜLLER a Carles BO. The mechanism of CO2 hydration: a porous metal oxide nanocapsule catalyst can mimic the biological carbonic anhydrase role. *Chemical communications (Cambridge, England)* [online]. 2015, **51**(85), 15596–15599 [vid. 2025-02-12]. ISSN 1364-548X. Dostupné z: doi:10.1039/C5CC06423F

[37] SUPURAN, Claudiu T. Carbonic Anhydrase Activators. *Future Medicinal Chemistry* [online]. 2018, **10**(5), 561–573 [vid. 2025-02-12]. ISSN 17568927. Dostupné z: doi:10.4155/FMC-2017-0223

[38] PESCHKE, Michael, Arthur T. BLADES a Paul KEBARLE. Metalloion-ligand binding energies and biological function of metalloenzymes such as carbonic anhydrase. A study based on ab initio calculations and experimental ion-ligand equilibria in the gas phase. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2000, **122**(7), 1492–1505 [vid. 2025-02-12]. ISSN 00027863. Dostupné z: doi:10.1021/JA992406L/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JA992406LE00042.GIF

[39] SUPURAN, Claudiu T. Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2012, **27**(6), 759–772 [vid. 2025-02-12]. ISSN 14756366. Dostupné z: doi:10.3109/14756366.2012.672983

[40] SILVERMAN, David N. a Robert MCKENNA. Solvent-Mediated Proton Transfer in Catalysis by Carbonic Anhydrase. *Accounts of Chemical Research* [online]. 2007, **40**(8), 669–675 [vid. 2025-02-25]. ISSN 00014842. Dostupné z: doi:10.1021/AR7000588

[41] KOENIG, SEYMOUR H. a RODNEY D. BROWN. Ligand exchange at the active site of the carbonic anhydrases: a „ping-ping-pong" view. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 1984, **429**(1), 99–108 [vid. 2025-02-12]. ISSN 0077-8923. Dostupné z: doi:10.1111/J.1749-6632.1984.TB12319.X

[42] WINUM, Jean-Yves, Andrea SCOZZAFAVA, Jean-Louis MONTERO a Claudiu SUPURAN. New zinc binding motifs in the design of selective carbonic anhydrase inhibitors. *Mini reviews in medicinal chemistry* [online]. 2006, **6**(8), 921–936 [vid. 2025-02-22]. ISSN 1389-5575. Dostupné z: doi:10.2174/138955706777934946

[43] D'AMBROSIO, Katia, Anna DI FIORE, Vincenzo ALTERIO, Emma LANGELLA, Simona Maria MONTI, Claudiu T. SUPURAN a Giuseppina DE SIMONE. Multiple Binding Modes of Inhibitors to Human Carbonic Anhydrases: An Update on the Design of Isoform-Specific Modulators of Activity. *Chemical reviews* [online]. 2025, **125**(1) [vid. 2025-02-12]. ISSN 1520-6890. Dostupné z: doi:10.1021/ACS.CHEMREV.4C00278

[44] NERELLA, Sridhar Goud, Pavitra S. THACKER, Mohammed ARIFUDDIN a Claudiu T. SUPURAN. Tumor associated carbonic anhydrase inhibitors: Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports* [online]. 2024, **10**, 100131 [vid. 2025-02-12]. ISSN 2772-4174. Dostupné z: doi:10.1016/J.EJMCR.2024.100131

[45] VULLO, Daniela a Fabrizio CARTA. Mechanisms of action of carbonic anhydrase inhibitors: zinc binders. *Carbonic Anhydrases: Biochemistry and Pharmacology of an Evergreen Pharmaceutical Target* [online]. 2019, 187–222 [vid. 2025-02-23]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816476-1.00009-5

[46] SUPURAN, Claudiu T. Carbon- versus sulphur-based zinc binding groups for carbonic anhydrase inhibitors? *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* [online]. 2018, **33**(1), 485–495 [vid. 2025-02-25]. ISSN 1475-6374. Dostupné z: doi:10.1080/14756366.2018.1428572

[47] WISCHELER, Johannes Schulze, Alessio INNOCENTI, Daniela VULLO, Arpita AGRAWAL, Seth M. COHEN, Andreas HEINE, Claudiu T. SUPURAN a Gerhard KLEBE. Bidentate Zinc Chelators for α-Carbonic Anhydrases that Produce a Trigonal Bipyramidal Coordination Geometry. *ChemMedChem* [online]. 2010, **5**(9), 1609–1615 [vid. 2025-02-25]. ISSN 1860-7187. Dostupné z: doi:10.1002/CMDC.201000200

[48] SUPURAN, C. T. a A. SCOZZAFAVA. Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutic potential. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* [online]. 2000, **10**(5), 575–600 [vid. 2025-02-22]. ISSN 13543776. Dostupné z: doi:10.1517/13543776.10.5.575

[49] SUPURAN, Claudiu T., Andrea SCOZZAFAVA a Angela CASINI. Carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal research reviews* [online]. 2003, **23**(2), 146–189 [vid. 2025-02-16]. ISSN 0198-6325. Dostupné z: doi:10.1002/MED.10025

[50] NAIR, Satish K., Peter A. LUDWIG a David W. CHRISTIANSON. Two-Site Binding of Phenol in the Active Site of Human Carbonic Anhydrase II: Structural Implications for Substrate Association. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1994, **116**(8), 3659–3660 [vid. 2025-02-12]. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/JA00087A086

[51] KARIOTI, Anastasia, Fabrizio CARTA a Claudiu T. SUPURAN. Phenols and Polyphenols as Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Molecules 2016, Vol. 21, Page 1649* [online]. 2016, **21**(12), 1649 [vid. 2025-02-12]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/MOLECULES21121649

[52] BOZDAG, Murat, Andrea ANGELI a Muhammet TANC. Mechanisms of action of carbonic anhydrase inhibitors: compounds that anchor to the zinc-bound nucleophile. *Carbonic Anhydrases: Biochemistry and Pharmacology of an Evergreen Pharmaceutical Target* [online]. 2019, 223–243 [vid. 2025-02-25]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816476-1.00010-1

[53] SUPURAN, Claudiu T. a Andrea SCOZZAFAVA. Mechanism of action of carbonic anhydrase inhibitors: compounds occluding the entrance of the active site. *Carbonic Anhydrases: Biochemistry and Pharmacology of an Evergreen Pharmaceutical Target* [online]. 2019, 245–255 [vid. 2025-02-25]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816476-1.00011-3

[54] D'AMBROSIO, Katia, Simone CARRADORI, Simona M. MONTI, Martina BUONANNO, Daniela SECCI, Daniela VULLO, Claudiu T. SUPURAN a Giuseppina DE SIMONE. Out of the active site binding pocket for carbonic anhydrase inhibitors. *Chemical communications (Cambridge, England)* [online]. 2015, **51**(2), 302–305 [vid. 2025-02-12]. ISSN 1364-548X. Dostupné z: doi:10.1039/C4CC07320G

[55] CARRADORI, Simone a Paolo GUGLIELMI. Mechanisms of action of carbonic anhydrase inhibitors: compounds that bind "out of the binding site" and compounds with an unknown mechanism of action. *Carbonic Anhydrases: Biochemistry and Pharmacology of an Evergreen Pharmaceutical Target* [online]. 2019, 257–268 [vid. 2025-02-26]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816476-1.00012-5

[56] PRATIWI, Rimadani, Adira RAHMAWATY a Aliya Nur HASANAH. Simple Analytical Method on the Determination of Dexamethasone in Herbal Medicine. *Journal of Spectroscopy* [online]. 2022, **2022**(1), 5141647 [vid. 2025-03-29]. ISSN 2314-4939. Dostupné z: doi:10.1155/2022/5141647

[57] GUHA, Rajarshi. On exploring structure-activity relationships. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2013, **993**, 81–94 [vid. 2025-02-16]. ISSN 1940-6029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-62703-342-8_6

[58] KUČEROVÁ a MARTA. Vazebné síly: typy interakcí léčiv s molekulovými cíli v organismu. *http://solen.cz/doi/10.36290/far.2024.019.html* [online]. 2024, **38**(3), 118–122 [vid. 2025-02-16]. ISSN 12127973. Dostupné z: doi:10.36290/FAR.2024.019

[59] CUFFARO, Doretta, Elisa NUTI a Armando ROSSELLO. An overview of carbohydrate-based carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* [online]. 2020, **35**(1), 1906–1922 [vid. 2025-02-16]. ISSN 1475-6374. Dostupné z: doi:10.1080/14756366.2020.1825409

[60] TAWFIK, Haytham O., Andrea PETRENI, Claudiu T. SUPURAN a Mervat H. EL-HAMAMSY. Discovery of new carbonic anhydrase IX inhibitors as anticancer agents by toning the hydrophobic and hydrophilic rims of the active site to encounter the dual-tail approach. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2022, **232**, 114190 [vid. 2025-02-20]. ISSN 0223-5234. Dostupné z: doi:10.1016/J.EJMECH.2022.114190

[61] SHAMBAUGH, George E. History of Sulfonamides. *Archives of Otolaryngology* [online]. 1966, **83**(1), 1–2 [vid. 2025-02-23]. ISSN 0003-9977. Dostupné z: doi:10.1001/ARCHOTOL.1966.00760020003001

[62] KUMAR, Shubham, Sandeep RULHANIA, Shalini JASWAL a Vikramdeep MONGA. Recent advances in the medicinal chemistry of carbonic anhydrase inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2021, **209**, 112923 [vid. 2025-02-26]. ISSN 0223-5234. Dostupné z: doi:10.1016/J.EJMECH.2020.112923

[63] SUPURAN, Claudiu T. a Clemente CAPASSO. Antibacterial carbonic anhydrase inhibitors: an update on the recent literature. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* [online]. 2020, **30**(12), 963–982 [vid. 2025-02-26]. ISSN 17447674. Dostupné z: doi:10.1080/13543776.2020.1811853

[64] MASINI, Emanuela, Fabrizio CARTA, Andrea SCOZZAFAVA a Claudiu T. SUPURAN. Antiglaucoma carbonic anhydrase inhibitors: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents* [online]. 2013, **23**(6), 705–716 [vid. 2025-02-23]. ISSN 1744-7674. Dostupné z: doi:10.1517/13543776.2013.794788

[65] ANGELI, Andrea, Marta FERRARONI, Alessandro BONARDI, Claudiu T. SUPURAN a Alessio NOCENTINI. Diversely N-substituted benzenesulfonamides dissimilarly bind to human carbonic anhydrases: crystallographic investigations of N-nitrosulfonamides. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2023, **38**(1) [vid. 2025-02-26]. ISSN 14756374. Dostupné z: doi:10.1080/14756366.2023.2178430

[66] PACCHIANO, Fabio, Mayank AGGARWAL, Balendu Sankara AVVARU, Arthur H. ROBBINS, Andrea SCOZZAFAVA, Robert MCKENNA a Claudiu T. SUPURAN. Selective hydrophobic pocket binding observed within the carbonic anhydrase II active site accommodate different 4-substituted-ureido-benzenesulfonamides and correlate to inhibitor potency. *Chemical communications (Cambridge, England)* [online]. 2010, **46**(44), 8371–8373 [vid. 2025-02-26]. ISSN 1364-548X. Dostupné z: doi:10.1039/C0CC02707C

[67] GHARAT, Ruchita, Arati PRABHU a Mihir P. KHAMBETE. Potential of triazines in Alzheimer's disease: A versatile privileged scaffold. *Archiv der Pharmazie*

[online]. 2022, **355**(4) [vid. 2025-02-20]. ISSN 1521-4184. Dostupné z: doi:10.1002/ARDP.202100388

[68] SINGLA, Prinka, Vijay LUXAMI a Kamaldeep PAUL. Triazine as a promising scaffold for its versatile biological behavior. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2015, **102**, 39–57 [vid. 2025-02-20]. ISSN 0223-5234. Dostupné z: doi:10.1016/J.EJMECH.2015.07.037

[69] SHARMA, Anamika, Rotimi SHEYI, Beatriz G. DE LA TORRE, Ayman EL-FAHAM a Fernando ALBERICIO. s-Triazine: A Privileged Structure for Drug Discovery and Bioconjugation. *Molecules (Basel, Switzerland)* [online]. 2021, **26**(4) [vid. 2025-02-20]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/MOLECULES26040864

[70] SINGH, Saumya, Milan K. MANDAL, Anup MASIH, Ashmita SAHA, Surajit K. GHOSH, Hans R. BHAT a Udaya P. SINGH. 1,3,5-Triazine: A versatile pharmacophore with diverse biological activities. *Archiv der Pharmazie* [online]. 2021, **354**(6) [vid. 2025-02-20]. ISSN 1521-4184. Dostupné z: doi:10.1002/ARDP.202000363

[71] MOOIBROEK, Tiddo J. a Patrick GAMEZ. The s-triazine ring, a remarkable unit to generate supramolecular interactions. *Inorganica Chimica Acta* [online]. 2007, **360**(1), 381–404 [vid. 2025-02-20]. ISSN 0020-1693. Dostupné z: doi:10.1016/J.ICA.2006.07.061

[72] HAVRÁNKOVÁ, Eva, Jozef CSÖLLEI, Daniela VULLO, Vladimír GARAJ, Pavel PAZDERA a Claudiu T. SUPURAN. Novel sulfonamide incorporating piperazine, aminoalcohol and 1,3,5-triazine structural motifs with carbonic anhydrase I, II and IX inhibitory action. *Bioorganic Chemistry* [online]. 2018, **77**, 25–37 [vid. 2025-02-20]. ISSN 0045-2068. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOORG.2017.12.034

[73] KUMAR, Rajeev, Amar SINGH, Jitendra SINGH, Hariram SINGH, R.K. ROY a Anurag CHAUDHARY. 1,2,3-Triazine scaffold as a potent biologically active moiety: a mini review. *Mini reviews in medicinal chemistry* [online]. 2014, **14**(1), 72–83 [vid. 2025-02-20]. ISSN 1875-5607. Dostupné z: doi:10.2174/1389557513666140103111017

[74] CASCIOFERRO, Stella, Barbara PARRINO, Virginia SPANÒ, Anna CARBONE, Alessandra MONTALBANO, Paola BARRAJA, Patrizia DIANA a Girolamo CIRRINCIONE. An overview on the recent developments of 1,2,4-triazine derivatives as anticancer compounds. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2017, **142**, 328–375 [vid. 2025-02-20]. ISSN 0223-5234. Dostupné z: doi:10.1016/J.EJMECH.2017.08.009

[75] ALI, Muhammad Imran a Muhammad Moazzam NASEER. Recent biological applications of heterocyclic hybrids containing s-triazine scaffold. *RSC advances* [online]. 2023, **13**(43), 30462–30490 [vid. 2025-02-20]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/D3RA05953G

[76] LIU, Hao, Sihui LONG, K. P. RAKESH a Gao Feng ZHA. Structure-activity relationships (SAR) of triazine derivatives: Promising antimicrobial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2020, **185**, 111804 [vid. 2025-02-20]. ISSN 0223-5234. Dostupné z: doi:10.1016/J.EJMECH.2019.111804

[77] TANPURE, Rajendra P., Bin REN, Thomas S. PEAT, Laurent F. BORNAGHI, Daniela VULLO, Claudiu T. SUPURAN a Sally Ann POULSEN. Carbonic anhydrase inhibitors with dual-tail moieties to match the hydrophobic and hydrophilic halves of the carbonic anhydrase active site. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2015, **58**(3), 1494–1501 [vid. 2025-04-15]. ISSN 15204804. Dostupné z: doi:10.1021/JM501798G/SUPPL_FILE/JM501798G_SI_001.PDF

[78] BONARDI, Alessandro, Alessio NOCENTINI, Silvia BUA, Jacob COMBS, Carrie LOMELINO, Jacob ANDRING, Laura LUCARINI, Silvia SGAMBELLONE, Emanuela MASINI, Robert MCKENNA, Paola GRATTERI a Claudiu T. SUPURAN. Sulfonamide Inhibitors of Human Carbonic Anhydrases Designed through a Three-Tails Approach: Improving Ligand/Isoform Matching and Selectivity of Action. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2020, **63**(13), 7422–7444 [vid. 2025-04-15]. ISSN 15204804. Dostupné z: doi:10.1021/ACS.JMEDCHEM.0C00733/SUPPL_FILE/JM0C00733_SI_003.CSV

[79] FUCHS, Werner, Franziska STEGER, Johanna REICH, Doris RIBITSCH, Simon K.M.R. RITTMANN a Günther BOCHMANN. A Simple and Straightforward Method for Activity Measurement of Carbonic Anhydrases. *Catalysts 2021, Vol. 11, Page 819* [online]. 2021, **11**(7), 819 [vid. 2025-03-10]. ISSN 2073-4344. Dostupné z: doi:10.3390/CATAL11070819

[80] WILBUR, K. M. a N. G. ANDERSON. ELECTROMETRIC AND COLORIMETRIC DETERMINATION OF CARBONIC ANHYDRASE. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1948, **176**(1), 147–154 [vid. 2025-03-10]. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(18)51011-5

[81] KIM, Joo Hyun a Byung Hoon JO. A Colorimetric CO2 Hydration Assay for Facile, Accurate, and Precise Determination of Carbonic Anhydrase Activity. *Catalysts 2022, Vol. 12, Page 1391* [online]. 2022, **12**(11), 1391 [vid. 2025-03-10]. ISSN 2073-4344. Dostupné z: doi:10.3390/CATAL12111391

[82] GOMEZ-HENS, A. a D. PEREZ-BENDITO. The stopped-flow technique in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta* [online]. 1991, **242**(C), 147–177

[vid. 2025-03-11]. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2670(91)87060-K

[83] *2.1.6: Stopped Flow - Chemistry LibreTexts* [online]. [vid. 2025-03-11]. Dostupné z: https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/02%3A_Reaction_Rates/2.01%3A_Experimental_Determination_of_Kinetics/2.1.06%3A_Stopped_Flow

[84] WANG, Sheila C. a Deborah B. ZAMBLE. Fluorescence analysis of sulfonamide binding to carbonic anhydrase. *Biochemistry and Molecular Biology Education* [online]. 2006, **34**(5), 364–368 [vid. 2025-03-11]. ISSN 1539-3429. Dostupné z: doi:10.1002/BMB.2006.494034052656

[85] LI, Huai Na a Yun Xiang CI. A new rapid fluorimetric method for the determination of carbonic anhydrase. *Analytica Chimica Acta* [online]. 1995, **317**(1–3), 353–357 [vid. 2025-03-11]. ISSN 0003-2670. Dostupné z: doi:10.1016/0003-2670(95)00389-4

[86] KOUTNIK, Petr, Elena G. SHCHERBAKOVA, Samer GOZEM, Mehmet G. CAGLAYAN, Tsuyoshi MINAMI a Pavel ANZENBACHER. Fluorescence-Based Assay for Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Chem* [online]. 2017, **2**(2), 271–282 [vid. 2025-03-11]. ISSN 24519294. Dostupné z: doi:10.1016/J.CHEMPR.2017.01.011/ATTACHMENT/6AF5894C-69F9-47EE-85F1-9FBB580812BD/MMC13.PDF

[87] SHINGLES, Richard a James V. MORONEY. Measurement of Carbonic Anhydrase Activity Using a Sensitive Fluorometric Assay. *Analytical Biochemistry* [online]. 1997, **252**(1), 190–197 [vid. 2025-03-11]. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1006/ABIO.1997.2305

[88] *Český lékopis 2023*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2023. ISBN 978-80-271-7040-1;978-80-271-5059-5.

[89] *2.1.5: Spectrophotometry - Chemistry LibreTexts* [online]. [vid. 2025-03-27]. Dostupné z: https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/02%3A_Reaction_Rates/2.01%3A_Experimental_Determination_of_Kinetics/2.1.05%3A_Spectrophotometry

[90] OPATŘILOVÁ, Radka. *Absorpční spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti* [online]. 2023 [vid. 2025-03-15]. Dostupné z: https://is.muni.cz/auth/el/pharm/podzim2023/F1AL1_15/103599459/Absorpcni_spektrofotometrie_dyslqvtf.pdf?predmet=1567758;lang=cs

[91] DADI, Murali, Mohd YASIR, Murali DADI a Mohd YASIR. Spectroscopy and Spectrophotometry: Principles and Applications for Colorimetric and Related Other Analysis. *Colorimetry* [online]. 2022 [vid. 2025-03-27]. Dostupné z: doi:10.5772/INTECHOPEN.101106

[92] SCHEELINE, Alexander. How to Design a Spectrometer. *Applied Spectroscopy* [online]. 2017, **71**(10), 2237–2252 [vid. 2025-03-27]. ISSN 19433530. Dostupné z: doi:10.1177/0003702817720468/SUPPL_FILE/SUPPLEMENTARY_MATERIAL2.ZIP

[93] L.C. PASSOS, Marieta a M. Lúcia M.F.S. SARAIVA. Detection in UV-visible spectrophotometry: Detectors, detection systems, and detection strategies. *Measurement* [online]. 2019, **135**, 896–904 [vid. 2025-03-27]. ISSN 0263-2241. Dostupné z: doi:10.1016/J.MEASUREMENT.2018.12.045

[94] MORRIS, Rob. Spectrophotometry. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* [online]. 2015, **11**(1), 2.1.1-2.1.30 [vid. 2025-03-27]. ISSN 1948-3430. Dostupné z: doi:10.1002/9780470089941.ET0201S11

[95] MONOGAROVA, O. V., K. V. OSKOLOK a V. V. APYARI. Colorimetry in Chemical Analysis. *Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2018, **73**(11), 1076–1084 [vid. 2025-03-28]. ISSN 10619348. Dostupné z: doi:10.1134/S1061934818110060/TABLES/8

[96] KHALIFAH, Raja G. The Carbon Dioxide Hydration Activity of Carbonic Anhydrase: I. STOP-FLOW KINETIC STUDIES ON THE NATIVE HUMAN ISOENZYMES B AND C. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1971, **246**(8), 2561–2573 [vid. 2025-03-28]. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(18)62326-9

[97] TU, C., G. SANYAL, G. C. WYNNS a D. N. SILVERMAN. The pH dependence of the hydration of CO2 catalyzed by carbonic anhydrase III from skeletal muscle of the cat. Steady state and equilibrium studies. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1983, **258**(14), 8867–8871 [vid. 2025-03-28]. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(18)32136-7

[98] POCKER, Y. a R. R. MIKSCH. Plant carbonic anhydrase. Properties and bicarbonate dehydration kinetics. *Biochemistry* [online]. 1978, **17**(6), 1119–1125 [vid. 2025-03-28]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/BI00599A028

[99] IDREES, Danish, Mohd SHAHBAAZ, Krishna BISETTY, Asimul ISLAM, Faizan AHMAD a Md Imtaiyaz HASSAN. Effect of pH on structure, function, and stability of mitochondrial carbonic anhydrase VA. *Journal of biomolecular structure & dynamics* [online]. 2017, **35**(2), 449–461 [vid. 2025-03-28]. ISSN 1538-0254. Dostupné z: doi:10.1080/07391102.2016.1149097

[100] ASIRI, Abdullah M., Muhammed S. AL-AMOUDI, Tariq A. AL-TALHI a Abdullah D. AL-TALHI. Photodegradation of Rhodamine 6G and phenol red by nanosized TiO2 under solar irradiation. *Journal of Saudi Chemical Society* [online]. 2011, **15**(2), 121–128 [vid. 2025-04-17]. ISSN 13196103. Dostupné z: doi:10.1016/J.JSCS.2010.06.005

[101] RUNGSIMA, Chayapol, Netipong BOONYAN, Marhsilin KLORVAN a Boonsri KUSUKTHAM. Hydrogel sensors with pH sensitivity. *Polymer Bulletin* [online]. 2021, **78**(10), 5769–5787 [vid. 2025-04-17]. ISSN 14362449. Dostupné z: doi:10.1007/S00289-020-03398-8/FIGURES/6

[102] MURÁRIKOVÁ, Katarína. *Hodnocení biologicky aktivních látek „In vitro" a výpočtovými metodami.* 2024.

[103] TIWARI, A., P. KUMAR, S. SINGH a S. A. ANSARI. Carbonic anhydrase in relation to higher plants. *Photosynthetica* [online]. 2005, **43**(1), 1–11 [vid. 2025-03-28]. ISSN 03003604. Dostupné z: doi:10.1007/S11099-005-1011-0/METRICS

[104] DIMARIO, Robert J., Harmony CLAYTON, Ananya MUKHERJEE, Martha LUDWIG a James V. MORONEY. Plant Carbonic Anhydrases: Structures, Locations, Evolution, and Physiological Roles. *Molecular Plant* [online]. 2017, **10**(1), 30–46 [vid. 2025-03-28]. ISSN 17529867. Dostupné z: doi:10.1016/J.MOLP.2016.09.001/ASSET/304FCD79-6344-4B66-9892-8DD46EA86F7C/MAIN.ASSETS/GR4.JPG

[105] BURGESS, Richard R. Chapter 3 Use of Bioinformatics in Planning a Protein Purification. *Methods in Enzymology* [online]. 2009, **463**(C), 21–28 [vid. 2025-03-28]. ISSN 00766879. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(09)63003-2

[106] COONEY, Michael J. Kinetic Measurements for Enzyme Immobilization. *Methods in Molecular Biology* [online]. 2017, **1504**, 215–232 [vid. 2025-03-28]. ISSN 1940-6029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-6499-4_17

[107] MATOLYGINA, D. A., N. S. DUSHUTINA, E. D. OVCHINNIKOVA, N. L. EREMEEV, N. G. BELOGUROVA, D. L. ATROSHENKO, S. A. SMIRNOV, S. S. SAVIN, V. I. TISHKOV, A. V. LEVASHOV a P. A. LEVASHOV. Enzymatic Lysis of Living Microbial Cells: A Universal Approach to Calculating the Rate of Cell Lysis in Turbidimetric Measurements. *Moscow University Chemistry Bulletin* [online]. 2018, **73**(2), 47–52 [vid. 2025-03-28]. ISSN 19350260. Dostupné z: doi:10.3103/S0027131418020104/METRICS

[108] HUA, Fang, Peng ZHOU, Hao Yue WU, Gang Xiu CHU, Zhong Wen XIE a Guan Hu BAO. Inhibition of α-glucosidase and α-amylase by flavonoid glycosides from Lu'an GuaPian tea: molecular docking and interaction mechanism. *Food &*

Function [online]. 2018, **9**(8), 4173–4183 [vid. 2025-03-28]. ISSN 2042-650X. Dostupné z: doi:10.1039/C8FO00562A

[109] GARAJ, Vladimir, Luca PUCCETTI, Giuseppe FASOLIS, Jean Yves WINUM, Jean Louis MONTERO, Andrea SCOZZAFAVA, Daniela VULLO, Alessio INNOCENTI a Claudiu T. SUPURAN. Carbonic anhydrase inhibitors: novel sulfonamides incorporating 1,3,5-triazine moieties as inhibitors of the cytosolic and tumour-associated carbonic anhydrase isozymes I, II and IX. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* [online]. 2005, **15**(12), 3102–3108 [vid. 2025-04-16]. ISSN 0960-894X. Dostupné z: doi:10.1016/J.BMCL.2005.04.056

[110] AGGARWAL, Mayank, Bhargav KONDETI a Robert MCKENNA. Insights towards sulfonamide drug specificity in α-carbonic anhydrases. *Bioorganic & medicinal chemistry* [online]. 2013, **21**(6), 1526–1533 [vid. 2025-04-16]. ISSN 1464-3391. Dostupné z: doi:10.1016/J.BMC.2012.08.019

[111] DE SIMONE, Giuseppina, Vincenzo ALTERIO a Claudiu T. SUPURAN. Exploiting the hydrophobic and hydrophilic binding sites for designing carbonic anhydrase inhibitors. *Expert Opinion on Drug Discovery* [online]. 2013, **8**(7), 793–810 [vid. 2025-04-16]. ISSN 17460441. Dostupné z: doi:10.1517/17460441.2013.795145

[112] BORIACK-SJODIN, P. Ann, Samantha ZEITLIN, Huang Hsing CHEN, Lori CRENSHAW, Sharon GROSS, Anura DANTANARAYANA, Pete DELGADO, Jesse A. MAY, Tom DEAN a David W. CHRISTIANSON. Structural analysis of inhibitor binding to human carbonic anhydrase II. *Protein science : a publication of the Protein Society* [online]. 1998, **7**(12), 2483–2489 [vid. 2025-04-16]. ISSN 0961-8368. Dostupné z: doi:10.1002/PRO.5560071201

[113] VEDANI, Angelo a Edgar F. MEYER. Structure-Activity Relationships of Sulfonamide Drugs and Human Carbonic Anhydrase C: Modeling of Inhibitor Molecules into the Receptor Site of the Enzyme with an Interactive Computer Graphics Display. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 1984, **73**(3), 352–358 [vid. 2025-04-16]. ISSN 0022-3549. Dostupné z: doi:10.1002/JPS.2600730316

[114] HAVRÁNKOVÁ, Eva. *Nové deriváty 1,3,5-triazinu s potenciálním inhibičním účinkem proti hCA IX a bakteriálním CA: Syntéza a stanovení biologické aktivity*. 2020.