

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Umělé enzymy v analýze biologicky aktivních látek

Vít Hrušat

Bakalářská práce

2021

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Vít Hrušat**
Osobní číslo: **C17011**
Studijní program: **B2802 Chemie a technická chemie**
Studijní obor: **Chemie a technická chemie**
Téma práce: **Umělé enzymy v analýze biologicky aktivních látek**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. Z dostupné literatury zpracujte rešerši zaměřenou na: rozdělení umělých enzymů; metody sloužící k charakterizaci jejich katalytické aktivity. Provedte rovněž jejich srovnání s klasickými enzymy. U vybraných umělých enzymů se zaměřte na popis mechanismů jejich katalytického působení. V neposlední řadě nastiňte možnosti konstrukce senzorů na bázi umělých enzymů.
2. V experimentální části proveďte, u vybraných komplexů mědi, základní charakterizaci jejich katalytické aktivity pomocí dostupných metod. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte.

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

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

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

Datum zadání bakalářské práce: **5. února 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2020

Prohlašuji:

Práci s názvem Umělé enzymy v analýze biologicky aktivních látek jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

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

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

V Pardubicích dne 13. 07. 2021

Vít Hrušat

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Tomáši Mikyskovi, Ph.D. za odborné vedení, za pomoc a rady při zpracování této práce.

Dále bych chtěl poděkovat konzultantovi bakalářské práce Ing. Milanovi Sýsovi, Ph.D. za schopné a ochotné vedení při prováděných experimentech.

Velká vděčnost také náleží mé rodině za mentální oporu projevenou jak při psaní této práce, tak při celé době studia.

Anotace

Tato bakalářská práce se zabývá popisem, studiem a problematikou využití umělých enzymů. Je zde zpracována obecná charakteristika umělých enzymů, umělé enzymy jsou rozděleny do skupin podle skeletu, je charakterizovaná jejich aktivita, jsou porovnány s přírodními enzymy a je podán přehled komplexů mědi s jejich využitím. Dále jsou také popsány mechanismy katecholázové aktivity komplexů mědi a využití umělých enzymů v biosenzorech. Poslední část práce se zabývá kolorimetrickým měřením aktivity acetátového komplexu mědi $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$ na vybraných substrátech.

Klíčová slova

Umělé enzymy, aktivita umělých enzymů, komplexy mědi, katecholázová aktivita, biosenzor, biologicky aktivní látky

Tittle

Artificial enzymes in analysis of bioactive compounds

Annotation

This bachelor thesis deals with the description, study and use of artificial enzymes. The general characteristics of artificial enzymes are elaborated here, artificial enzymes are divided into groups according to to skeleton, their activity is characterized, they are compared with natural enzymes and an overview of copper complexes with their use is given. The mechanisms of catecholase activity of copper complexes and the use of artificial enzymes in biosensors is also elaborated. The last part of the work deals with colorimetric measurement of the activity of copper acetate complex $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$ on selected substrates.

Keywords

Artificial enzymes, activity of artificial enzymes, copper complexes, catecholase activity, biosensor, bioactive compounds

Obsah

1. Umělé enzymy	15
1.1. Obecná charakteristika umělých enzymů	15
1.2. Rozdělení umělých enzymů	16
1.2.1. Představení různých způsobů rozdělení enzymů	16
1.2.2. Polymerní umělé enzymy	16
1.2.3. Supramolekulární umělé enzymy	17
1.2.4. Nanomolekulární umělé enzymy	18
1.2.5. Proteinové umělé enzymy	19
1.3. Možnosti charakterizace aktivity umělých enzymů	20
1.3.1. Enzymová kinetika a její grafické znázornění	20
1.3.2. Metody stanovení aktivity umělých enzymů (komplexů)	22
1.4. Porovnání aktivity enzymů a umělých enzymů	24
1.5. Přehled umělých enzymů (komplexů) mědi a jejich využití.	25
2. Mechanismy katecholázové aktivity komplexů mědi	28
2.1. Popis mechanistických drah katecholázové aktivity komplexů mědi	28
2.2. Vliv nejdůležitějších faktorů na katecholázovou aktivitu komplexů mědi	31
3. Možnosti konstrukce biosenzorů na bázi umělých enzymů pro elektroanalýzu	34
3.1. Představení biosenzorů a jejich klasifikace	34
3.2. Elektrochemické biosenzory na bázi umělých enzymů	34
3.2.1. Biosenzor využívající magnetické nanočástice Fe ₃ O ₄ pro detekci cholinu	35
3.2.2. Biosenzor využívající Ru(CN) ₆ ukotvené do škváry pro detekci H ₂ O ₂ a glukózy	36
4. Experimentální část	39
4.1. Pomůcky a chemikálie	39
4.1.1. Chemikálie	39
4.1.2. Pomůcky	39
4.2. Příprava a uchování zásobních roztoků	40

4.2.1. Příprava 0,01 M roztoku $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$	40
4.2.2. Příprava 0,1 M roztoku epinefrinu.....	40
4.2.3. Příprava 0,1 M roztoku dopaminu	40
4.2.4. Příprava 0,1 M roztoku noradrenalinu	41
4.2.5. Uchovávání zásobních roztoků.....	41
5. Výsledky a diskuse	42
5.1. Měření UV-VIS spekter při oxidaci vybraných neurotransmiterů s využitím acetátového komplexu mědi	42
5.2. Měření kinetiky oxidace vybraných neurotransmiterů s využitím acetátového komplexu mědi	44
5.2.1. Kinetické parametry $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$ pro epinefrin	46
5.2.2. Kinetika oxidace dopaminu	47
5.2.3. Kinetika oxidace noradrenalinu	48
5.2.4. Shrnutí zjištěných kinetických paramentů umělého enzymu $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$	49
6. Závěr	50
7. Použitá literatura	52

Seznam obrázků

Obrázek 1: Znázornění podobnosti Heme proteinu a enzymu HKUST-1 Převzato a upraveno z [23].....	18
Obrázek 2: Rovnice Michaelise a Mentenové	20
Obrázek 3: Porovnání různých metod znázornění kinetiky enzymů Převzato a upraveno z [41]	21
Obrázek 4:Znázornění různých způsobů inhibice s využitím metody Lineweaver-Burk Převzato a Upraveno z [42]	21
Obrázek 5:Typická reakce katalyzovaná oxidázovými enzymy Převzato a upraveno z [54] ..	23
Obrázek 6: Reakce používaná pro stanovení peroxidázové aktivity Převzato a upraveno z [60]	24
Obrázek 7: Reakce, kterou katalyzují aminotranferázové enzymy Nakresleno, zdroj informací:[2]	25
Obrázek 8: Příklady ligandů pro výrobu umělých katechol oxidázových enzymů mědi Převzato a upraveno z [21]	26
Obrázek 9: Popis mechanistických drah katecholázové aktivity na příkladu oxidace pyrokatecholu na ortho-benzochinonu Nakresleno Zdroj informací: [21]	28
Obrázek 10: Katecholázové mechanistické dráhy jednojaderných komplexů mědi při oxidaci 3,5DTBC Převzato a Upraveno z [21].....	30
Obrázek 11: Katecholázové mechanistické dráhy dvoujaderných komplexů mědi při oxidaci 3,5-DTBC Převzato a Upraveno z [21]	30
Obrázek 12: Struktura komplexů mědi demonstrující vliv různých faktorů na katecholázovou aktivitu Převzato z [93,94].....	32
Obrázek 13: Obecné schéma biosenzoru Převzato a upraveno z [101]	34
Obrázek 14: Schéma výroby biosenzoru Au / CH / GA / Fe ₃ O ₄ -MNPs / GA / ChOx Převzato z [102].....	35
Obrázek 15: Schéma reakce důkazu cholinu ve vodném roztoku Převzato z [102].....	36
Obrázek 16: Schéma výroby biosenzoru CPE/CFe*-RP/GOx/Ts Převzato a upraveno z [103]	37
Obrázek 17: Reakční schéma oxidace glukózy Převzato a upraveno z [103]	37
Obrázek 18: Měřicí přístroj Shimadzu UV-2450 UV-Vis Spektrofotometr.....	40

Obrázek 19: a) Měrná kyveta s $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})(\text{EtOH})](\text{ClO}_4)_2$ + methanol připravená k měření b) Měrná kyveta se zreagováním epinefrinem c) Měrná kyveta se zreagováním dopaminem d) Měrná kyveta se zreagováním noradrenalinem42

Seznam tabulek

Tabulka 1: Ukázkové příklady nanoenzymů Převzato a upraveno z [4]	19
Tabulka 2: Porovnání aktivity umělého enzymu	25
Tabulka 3: Přehled umělých katechol oxidázových enzymů, které mají vysokou aktivitu Převzato a upraveno z [21]	27
Tabulka 4: Kinetické parametry komplexů mědi demonstrující vliv různých faktorů na katecholázovou aktivitu Převzato z: [11]	32
Tabulka 5: Kinetické parametry komplexu $[\text{Cu}_2(\text{L17})(\text{N}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ měřeného v acetonitrilu a methanolu Převzato z: [11]	33
Tabulka 6: Měření roztoky neurotransmiterů	46
Tabulka 7: Shrnutí výsledných hodnot kinetických parametrů $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})(\text{EtOH})](\text{ClO}_4)_2$ pro vybrané neurotransmitery	49

Seznam použitých zkratek

3,5-DTBC – 3,5-di-tert-butylkatechol

$[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$ – acetátový komplex mědi

MOFs – metalicko-organická rámová struktura

NP – nanočástice

IFABP-PX60 – střevní mastné kyseliny vázající protein – pyridoxamin60

TON – číslo přeměny

TOF – frekvence přeměny

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

ATP – adenosintrifosfát

VIS – viditelné spektrum

SOD – superoxid dismutáza

ABTS – kyselina 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová)

hhMb – myoglobin z koňského srdce

TAT – tyrosin aminotransferáza

TMB – 3,3',5,5' -tetramethylbenzidin

3,5-DTBQ – 3,5-di-tert-butyl-o-benzochinon

BRS – biorekogniční složka

ChOx – cholinoxidáza

CPE – uhlíková pastová elektroda

CFe* – průmyslová odpadní škvára obohacená železem

RP – rutheniový nachový komplex

GOx – glukózaoxidáza

Ts – Tosflex

RSD – relativní směrodatná odchylka

Úvod

Tato bakalářská práce se zabývá popisem, studiem a využitím umělých enzymů. Všeobecně lze tvrdit, že umělé enzymy napodobují aktivity přírodních enzymů. Aktivit přírodních enzymů se využívá v různých průmyslových odvětvích. Výzkum umělých enzymů ukázal, že využití umělých enzymů je v porovnání s přírodními enzymy perspektivní alternativa s některými výhodami ale i nevýhodami.

V literatuře je možné se setkat s různým rozdělením umělých enzymů, některé jsou ve svém principu vhodnější pro rozdělení přírodních enzymů. Vhodným rozdělením umělých enzymů je podle typu skeletu, ze kterých jsou umělé enzymy složeny. K popisu činnosti umělých enzymů (kinetiky enzymů) se nejčastěji používá aktivita enzymů, kterou je možno měřit různými instrumentálními metodami.

Měď je z důvodu dobré dostupnosti, ceny, vhodného koordinačního stavu a vysoké aktivity (oproti jiným kationtům) široce využívaná pro výrobu velice důležité skupiny umělých enzymů –supramolekulárních umělých metaloenzymů (komplexů). Existuje mnoho komplexů mědi, které vykazují katechol oxidázovou (katecholázovou) aktivitu a jsou významné i z hlediska širokého využití. Mechanismy a vlivy různých faktorů na aktivitu těchto komplexů jsou velice zkoumané téma.

Jedním z nejdůležitějších využití umělých enzymů je výroba biosenzorů. Biosenzory na bázi umělých enzymů je možné využít pro stanovení mnoha biologicky aktivních látek. Jako příklad lze uvést biosenzor využívající magnetické nanočástice Fe_3O_4 pro detekci cholinu nebo biosenzor využívající $\text{Ru}(\text{CN})_6$ ukotvené do škváry pro detekci H_2O_2 a glukózy.

V této práci je také zpracován experiment spektrofotometrického měření aktivity acetátový komplex mědi $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})(\text{EtOH})](\text{ClO}_4)_2$ na substrátech epinefrin (adrenalin), dopamin a noradrenalin (norepinefrin). Tento experiment může sloužit jako ukázka měření aktivity umělých enzymů (komplexů).

1. Umělé enzymy

1.1. Obecná charakteristika umělých enzymů

Umělé i přírodní enzymy analogicky s katalyzátory urychlují reakci skrze snížení aktivační energie a neovlivňují rovnovážnou směs. Tyto skutečnosti jsou důležité pro pochopení funkce enzymů, ale k popisu činnosti enzymů, je běžněji používaná aktivita enzymů, o které se píše v podkapitole 1.3 [1].

Využití a výzkum umělých enzymů je jedním z oborů biomimetické chemie. Tento obor chemie studuje napodobování katalytických procesů, ke kterým dochází v živých soustavách. K dosažení tohoto záměru je obzvláště důležitá dobře definovaná geometrie v komplexu enzym-substrát [2].

Všeobecně existují dva přístupy k navrhování umělých enzymů (komplexů). První přístup je funkční napodobování. Spočívá v napodobování enzymů s využitím kovových komplexů s podobnými aktivitami. Druhý přístup je strukturní napodobování, kde se napodobují struktury aktivních center enzymů pomocí funkčních skupin. Ve výsledku mají strukturně napodobované umělé enzymy podobnou strukturu jako přírodní enzymy, které se snaží napodobit [3,4]. Enzymová aktivita může být vytvořena pomocí skeletů složených z anorganických nanočástic [4,5,6], proteinů, [2,7], polymerů [4,8] a supramolekulárních látek [4,9].

Vytvořené umělé enzymy by měly splňovat určité podmínky. Jejich vazebná místa vážou požadované substráty. Konformace kolem katalytických center musí vést k projevu katalytické aktivity. Měly by být schopny ohnout substrát do vhodné reaktivní konformace. Žádanou vlastností je také, aby umělé enzymy měly schopnost uvolňovat z komplexu převedené substráty a tím regenerovat své katalytické funkce. [2,4,10]. V porovnání s napodobovanými přírodními enzymy by měly nově vytvořené umělé enzymy mít méně komplikovanou strukturu, menší molekulární hmotnost a lepší rozpustnost ve široké škále rozpouštědel. Pro přirozené enzymy je také typické že často vyžadují použití kosubstrátů a kofaktorů. Důsledkem je zvýšená cena produktu. U vývoje nových umělých enzymů se objevuje snaha tuto nevýhodu překonat [4].

Dalším důvodem vyšší ceny přírodních enzymů je, že jsou v přírodě zastoupeny v malém množství, nutnost je denaturovat, složitě zpracovávat a složitá recyklovatelnost. Tyto nevýhody často znemožňují využití přírodních enzymů ve velkém měřítku. Umělé enzymy (komplexy)

jsou oproti tomu často vyráběné z přechodných kovů, které jsou relativně levné a dostupné [11].

Dobré je také zdůraznit, že díky tomu že jsou takové komplexy syntetické, mohou být specificky upraveny pro různé využití. Tato vlastnost je velice užitečná například v oblasti biokatalytické organické syntézy. S využitím umělých enzymů došlo také k významnému vývoji ekologicky šetrných metod v laboratorním i průmyslovém měřítku [4,7].

Umělé i přírodní enzymy mají oproti umělým katalyzátorům o několik řádů větší účinnost, stereospecifitu, substrátovou i účinkovou specifitu. Enzymy bývají také netoxické [1]. Porovnáním aktivity přírodních a umělých enzymů se zabývá Podkapitola 1.4.

1.2. Rozdělení umělých enzymů

1.2.1. Představení různých způsobů rozdělení enzymů

V současné době bohužel neexistuje sjednocené rozdělení umělých enzymů. V literatuře se často enzymy dělí podle typu katalyzované reakce na oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, izomerázy a ligázy [1].

Toto rozdělení je ale více vhodné pro dělení přírodních enzymů. Rozdělení, které tato práce uvádí je založeno na různých typech skeletů, ze kterých jsou umělé enzymy složeny. Podle tohoto kritéria existují polymerní, supramolekulární, nanomolekulární a proteinové umělé enzymy [4].

1.2.2. Polymerní umělé enzymy

Vytváření těchto enzymů je dvoukrokové. Nejprve se na vhodném polymeru vytvoří vazebná místa. Poté se zavedou skupiny, které zajistí prostředí ze specifických funkčních postranních řetězců, které zajistí zformování přechodného stavu při katalýze [2]. V přírodních enzimech má sekvence a trojrozměrná konformace polymerů velký vliv na katalytické funkce [4]. K lepšímu napodobení přírodních enzymů a ke zvýšení účinnosti, selektivity se často využívají dendrimery (vysoce uspořádané, rozvětvené polymerní molekuly). Dendrimery funkcionalizují na polymerních periferiích [12,13]. Dále se využívají biopolymery [14,15], hyper rozvětvené polymery a komplexy hybridního polymer-kovu [16].

Jedním z prvních objevených polymerních umělých enzymů je syntetický derivát polyethyleniminu. Tento enzym byl získán připojením dodecylové a methylenimidazolové skupiny k polyethyleniminu. Derivát účinně hydrolyzuje 4-nitrofenylacetát a umí také

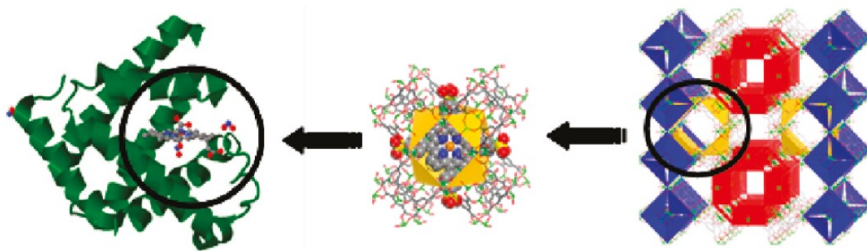
dekarboxylovat deriváty isoxazolu. Oproti jednoduchým katalyzátorům (například imidazolu) má tento derivát 250krát větší katalytickou účinnost [4,17].

1.2.3. Supramolekulární umělé enzymy

Tyto enzymy využívají principy studované v supramolekulární chemii, zejména vazbu kov-ligand (donor-akceptorová vazba) [18,19] a “host-guest“ chemii. “Host“ je obvykle velká molekula s dutinou (např. crowny, kryptandy) a “guest“ je menší molekula (např. kationt s K^+ nebo NH_4^+). Tyto dva typy molekul spolu vytváří komplex “host-guest“ [20].

Těmto enzymům se také často říká synzomy. Jedná se o početnou skupinu umělých enzymů, která má veliký potenciál pro další využití. Pro vyvolání jejich aktivity je nutná selektivní vazba na substrát a následná katalýza. Tyto enzymy jsou proto často konstruovány tak aby vážaly přechodné stavy, které jsou analogické s napodobovanými reakcemi. Tímto způsobem vykazují jak vazbu na substrát, tak katalytickou aktivitu [4].

Umělé supramolekuly oxygenázy [21], nitrogenázy, hydrogenázy, alkohol dehydrogenázy a laktázy mohou ve svých aktivních místech mít vázaný kovový prvek. Sloučeniny tímto způsobem mohou vykazovat katalytickou funkci a nazývají se metaloenzymy [22]. V supramolekulárních umělých metaloenzymech se komplexy kovu často navážou na vnitřní stěny anorganických pevných nosičů fungující jako molekulární síta, což z takového enzymu dělá heterogenní katalyzátor vysoké aktivity a selektivity. Mimo zeolitů je častým pevným nosičem tzv. metalicko-organická rámová struktura (MOFs) [4,23]. Příkladem supramolekulárního umělého enzymu je $Fe_4SP@HKUST-1(Cu)$. $HKUST-1(Cu)$ je vytvořen spojením benzen-1,3,5-trykarboxylátového aniontu a $Cu(II)$ kationtu. Do okteadrické struktury, která má vhodnou velikost a symetrii je poté začleněn způsobem “ship-in-a-bottle” Fe^{3+} tetrakis (4-sulfonatophenyl). Zbývající dutiny slouží jako molekulární síta, to znamená že dovolují molekulám vhodné velikosti být vpuštěny k aktivním místům pro katalýzu. Podobnou funkci mají kanály v hemovém proteinu. Strukturní podobnost mezi Heme proteinem a $Fe_4SP@HKUST-1(Cu)$ je vidět na Obrázku 1 [23,24].



Obrázek 1: Znárodnění podobnosti Heme proteinu a enzymu HKUST-1 Převezato a upraveno z [23]

Jako skelety supramolekulárních umělých enzymů jsou také využívány cyklodextriny [25], kalixareny polyamoniové makrocykly, makrocyklické (crown) ethery a cyklofany [26].

1.2.4. Nanomolekulární umělé enzymy

V současné době zaznamenal výzkum využití nanočástic (NP) v kontextu umělých enzymů zvýšenou pozornost. Využití nanočástic je perspektivní pro jejich jedinečné fyzikálně-chemické vlastnosti, malé rozměry, velké množství katalyticky aktivních míst na povrchu, vysoký poměr povrch/objem a v neposlední řadě přítomnost multifunkčních reaktivních skupin využitelných pro modifikaci a další funkcionalizace [4, 27-29]. Od těchto umělých enzymů se také díky vysokému poměru povrch/objem a velkému množství aktivních míst očekává vysoká katalytická účinnost [30,31]. Nanoenzymy dále vynikají výhodou nízké ceny, vynikající tolerancí vůči extrémním podmínkám (vysoké teplotě, kyselému pH a organickým rozpouštědlům), lze je snadno oddělit od reakčních směsí, mají vysokou funkční stabilitu, a i další funkční vlastnosti (například paramagnetismus) [4]. Je také dobré zdůraznit že výsledný enzymatický účinek je ovlivněný modifikací povrchu enzymu [4]. Například NP Pt má s dendrimerní modifikací hydrogenázové vlastnosti [32] a bez jakékoliv modifikace peroxidázové účinky [33].

V literatuře [4] je uvedeno celkem 31 různých nanoenzymů., které demonstrují rozmanitost složení, povrchových modifikací a využití nanoenzymů. Do Tabulky 1 byly vybrány pro ukázkou 4 nanoenzymy.

Tabulka 1: Ukázkové příklady nanoenzymů Převzato a upraveno z [4]

Složení	Povrchová modifikace	Enzymatický účinek	Využití	Molární aktivita enzymu (kcat)	Zdroj
Pt NPs	mezoporézní oxid křemičitý	peroxidázový	Kolorimetrický imunotest lidského choriového gonadotropinu	$2 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$,	[34]
Pt NPs	-	peroxidázový	kolorimetrický imunotest králičího IgG	$2,27 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$,	[35]
Co ₃ O ₄ NPs	-	katalázový	Amperometrický senzor na detekci H ₂ O ₂	$1,6 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$,	[36]
Au NPs	dipeptid	esterázový	Hydrolyza dinitrofenylbutanoátu	$1,5 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$,	[37]

1.2.5. Proteinové umělé enzymy

S moderním vývojem techniky biochemických experimentů a bioinformatiky bylo umožněno vytvoření umělých enzymů s proteinovými skelety. Všeobecně se dá říct, že se vytváření proteinových umělých enzymů se dělí na [7]:

1. Metody upravení přírodního a snadno dostupného přírodního enzymu pro zlepšení jeho původní funkce [7]
2. Přeměny neenzymatického proteinu na aktivní enzym [7]

Vytváření může zahrnovat přístupy genetické mutace, chemické modifikace a kombinaci těchto přístupů. Zvláště u proteinových umělých enzymů obsahující kov se pro vytvoření unikátních biokatalyzátorů s řadou katalytických funkcí oba přístupy kombinují. Na doladění struktur umělých enzymů je čteně využívána rentgenová krystalografická strukturní analýza a výpočetní predikce. Toto dovoluje účinně (oproti procesu pokus-omyl) přepracovávat a vylepšovat umělé enzymy na základě získaných znalostí o struktuře a mechanismu [7].

Z hlediska syntetické chemie jsou proteinové umělé enzymy schopny zprostředkovávat všechny základní reakce – oxidaci, redukci, vznik a štěpení C-C vazby. Důležitým objevem bylo že proteinové umělé enzymy jsou schopni katalyzovat typy reakcí, které s přirozenými enzymy neprobíhají. Zaznamenaným příkladem je metateze olefinů [7].

Příkladem proteinového umělého (semi syntetického) enzymu je střevní mastné kyseliny vázající protein – pyridoxamin60. (IFABP-PX60). Aktivita tohoto enzymu byla měřena na substrátu 2-oxoglutarát a tyrosinu reagující na kyselinu L-glutamovou a 4-hydroxyfenylpyruvát. Tento enzym zaznamenal téměř 364násobné zvýšení efektivity enzymu při 14 denní reakční době oproti volnému enzymu pyridoxamin měřenému při stejných podmínkách a substrátu [2].

1.3. Možnosti charakterizace aktivity umělých enzymů

Jak už bylo zmíněno předtím, nejdůležitější veličinou pro popis činnosti enzymů je aktivita enzymu. Aktivitu enzymů lze vyjádřit pomocí parametru číslo přeměny (TON) nebo frekvence přeměny (TOF) [38]. Nejčastěji používanými parametry je ale Michaelisova konstanta, mezní rychlost, molární aktivita a katalytická účinnost enzymu. O těchto parametrech se dále píše níže.

1.3.1. Enzymová kinetika a její grafické znázornění

Enzymová kinetika zkoumá reakční rychlost (aktivitu) enzymů při chemických reakcích. Saturační křivka (Obrázek 3 A) je grafické vyjádření závislosti rychlosti enzymatické reakce (aktivity) na koncentraci substrátu. Matematické vyjádření této křivky je rovnice Michaelise a Mentenové. Tato rovnice vychází ze zjednodušené představy, že jediným meziproduktem reakce je komplex enzym-substrát. Ve skutečnosti se ale jedná o vícestupňovou přeměnu s několika meziprodukty, kde je také možný zpětný rozpad produktu. V tomto spočívá nedostatek rovnice Michaelise a Mentenové [1]. Za předpokladu, že se koncentrace enzymu nemění, rovnice Michaelise a Mentenové má tvar znázorněný na Obrázku 2

$$v = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

K_MMichaelisova konstanta
 v_{max}maximální (mezní) rychlost reakce
 vrychlost reakce
 $[S]$aktualní koncentrace substrátu

Obrázek 2: Rovnice Michaelise a Mentenové

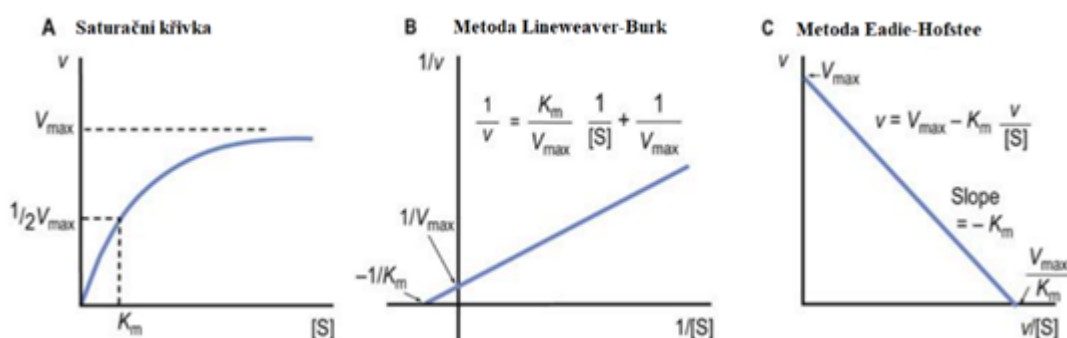
Parametr enzymu Michaelisova konstanta (M nebo mol/l) je definována jako koncentrace, při které enzymová reakce probíhá při polovině maximální rychlosti, Michaelisova konstanta je závislá na faktorech ovlivňujících aktivitu (pH, teplota, aktivátory/inhibitory) a udává afinitu ke substrátu. Dalším dobrým parametrem aktivity enzymů je limitní (mezní) rychlost v_{max} [M s⁻¹]. Při nasycení (saturaci) enzymu substrátem dosahuje reakční rychlost maximální hodnoty a limitní rychlost je jediným limitujícím faktorem enzymatické reakce. Při tomto stavu lze vyjádřit další užitečný parametr aktivity enzymů – k_{cat} [s⁻¹]. Tato konstanta udává molární aktivitu enzymu [1].

$$v = v_{max} = k_{cat} \cdot [E_o]$$

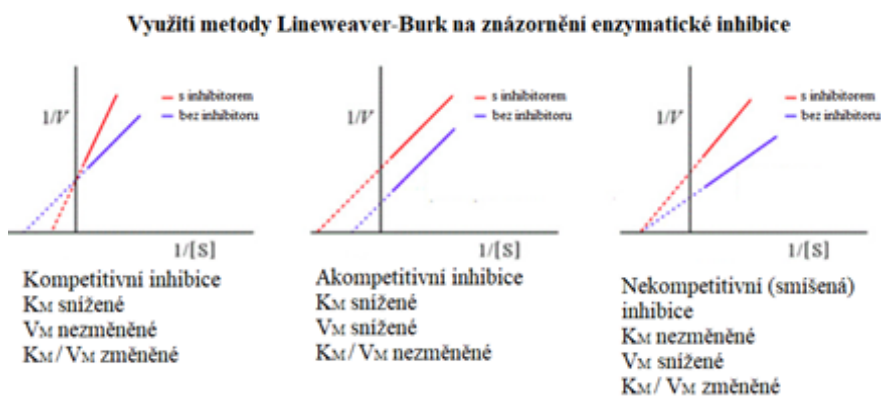
Experimentálně lze na základě této úvahy nepřímo stanovit koncentraci enzymu. Posledním důležitým parametrem aktivity enzymu je katalytická účinnost enzymu k_{cat}/K_M [s⁻¹ M⁻¹], která

díky tomu že zohledňuje dva parametry aktivity enzymu v jedné hodnotě se často používá na vzájemné srovnávání aktivity enzymů [39].

Existují dvě metody linearizace pro rovnici Michaelise a Mentenové – metoda Lineweaver-Burk a metoda Eadie-Hofstee. Tvary rovnic těchto metod a jejich grafické znázornění je na Obrázku 3. Obě tyto metody umí charakterizovat limitní rychlost (v_{lim}), Michaelisovu konstantu a jsou velice ceněné pro svou jednoduchost a schopnost prezentovat data graficky. Metoda Lineweaver-Burk nabízí navíc rychlé a názorné zobrazení různých metod enzymatické inhibice. Toto je dobře znázorněno na Obrázku 4 [40].



Obrázek 3: Porovnání různých metod znázornění kinetiky enzymů Převzato a upraveno z [41]



Obrázek 4: Známkování různých způsobů inhibice s využitím metody Lineweaver-Burk Převzato a Upraveno z [42]

Tyto metody linearizace mají i určité nevýhody, které zapříčiňují chybné určení parametrů enzymu. Objevily se snahy o zjišťování parametrů Michaelis-Menten skrze metody které nejsou založeny na linearizaci, například metoda nejmenších čtverců. Tyto techniky ale vyžadují dobrý počáteční odhad, nenabízejí žádnou záruku konvergence na globální minimum, jsou citlivé na přítomnost odlehlých hodnot a vlivného pozorování. To může mít za následek zjištění nepřesných hodnot parametrů enzymu. [43]. V literatuře [44] je popsána nová metoda zjištění parametrů enzymu, která také není založena na linearizaci rovnice Michaelise a Mentenové. Tato metoda je založená na modifikaci Tukeyovy funkce biweight. Tato metoda poskytla oproti

standardním modelům lineárních metod a metodě nejmenších čtverců přesné výsledky parametrů enzymu. Tato metoda si klade za cíl přizpůsobit model datům, takže výsledky jsou odolnější vůči extrémním hodnotám a jsou relativně konzistentní [44].

1.3.2. Metody stanovení aktivity umělých enzymů (komplexů)

Při stanovení aktivity enzymů se sleduje, kolik produktu se za danou dobu vytvořilo nebo kolik substrátu bylo spotřebováno. Metody měření umělých enzymů (komplexů) jsou obdobné jako metody měření přírodních enzymů. Důležitým požadavkem je aby metody fungovali za přítomnosti substrátu i produktu. Metody stanovení se dají dělit na diskontinuální a kontinuální eseje. Enzymatickou esejí se zde rozumí standardizovaný postup pro měření množství (a aktivity) konkrétního umělého enzymu ve vzorku. Při diskontinuálních esejích se po určitém čase zastaví reakce a změří se množství vytvořeného produktu. Často umí diskontinuální metoda rozlišovat mezi substrátem a produktem, takže není nutný žádný separační krok. Kontinuální esej sleduje průběh reakce v reálném čase. Kontinuální eseje mají výhodu v rychlejším získání výsledku a jakákoli odchylka je vidět ve vybočení z linearity. Kontinuální esej ale vyžaduje, aby umělé enzymy způsobily snadno zjištělnou změnu fyzikálního parametru v systému. To je uskutečnitelné u reakcí, které uvolňují barevný nebo fluorescenční produkt, ale u mnoha jiných reakcí nikoli. U některých reakcí lze toto řešit tím že se produkt převede na finální produkt, který je už fyzikálně pozorovatelný. Některé enzymy nedovolují ani jednu s těchto možností proto jejich esej nelze provádět kontinuálně. Mezi nejběžnější instrumentální metody pro měření aktivity enzymů patří spektroskopie, chromatografie a elektrochemie [45].

1.3.2.1. Chromatografická metoda

Jedna z nejčastěji využívaných instrumentálních metod pro stanovení enzymatické aktivity je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). HPLC je uspokojitelně selektivní metoda, umožňuje současně měřit změnu koncentrace substrátu i produktu a nabízí vykonání eseje v rozumné době. Další výhodou je rozmanitost režimů, které tato metoda nabízí. Mezi režimy patří chromatografie s iontovou výměnou, obrácenými a normálními fázemi. Tímto se umožňuje separace a měření i těch nejsložitějších vzorků [46]. HPLC také nabízí možnost zvýšit citlivost metody označením substrátu/produktu radioaktivní, fluorescenční látkou nebo zapojením ultra-vysokého tlaku [47].

Příkladem využití HPLC je stanovení fosforyl transferázové aktivity polyamoniových mikrocyklů při hydrolýze adenosintrifosfátu (ATP) [48].

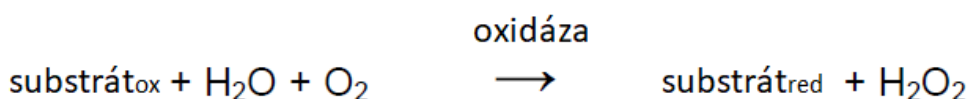
1.3.2.2. Spektroskopická metoda

Jedním z nejrozšířenějších typů spektroskopie využitelné pro stanovení aktivity enzymu je spektrofotometrie. Spektrofotometrie je založená na měření změny množství světla, kterou konkrétní testovací roztok absorbuje. Pokud měření probíhá ve viditelném spektru (VIS), je zároveň možné zaznamenat změnu barvy ve vzorku (kolorimetrie). Měření může také probíhat v UV spektru [49]. Příkladem spektrofotometrie je kolorimetrické měření peroxidázové aktivity Fe(II)-kordinačních polymerních nanohydrogelů na substrátu H₂O₂ [50]. Další příklad je v experimentální části této práce.

Dalšími druhy spektroskopických metod jsou například fluorimetrie, kterou je možné využít na stanovení aktivity nanokatalyzátoru Pd/C na reakci substrátu bis-allyloxykarbonyl rhodamin 110 na produkt rhodamin 110 [51]. Radiometrie, kterou je možné použít pro stanovení N-demethylázové aktivity aminofenazonu na substrátu methyl – aminopyrin označeným izotopem ¹⁴C [52]. A v neposlední řadě chemiluminiscence, která se může použít pro stanovení aktivity Cu(II) komplexu katalyzující reakci luminol chemiluminiscence [53].

1.3.2.3. Elektrochemická metoda

Tato metoda se často používá k měření oxidázových enzymů, které obvykle katalyzují reakci, která je znázorněna na Obrázku 5. Vnikající produkt této reakce (peroxid vodíku) je možno využít k elektrochemickému stanovení aktivity mnoha umělých enzymů které katalyzují oxidoreduktázové reakce [54].



Obrázek 5: Typická reakce katalyzovaná oxidázovými enzymy Převezato a upraveno z [54]

Na základě měřené veličiny a způsobu provedení existují různé varianty této metody. Elektrochemické stanovení má potencionální výhody oproti ostatním metodám v jednoduchosti, ekonomičnosti, rychlosti. Stanovení nevyžadují vedlejší enzymy, toxické kosubstráty ani velké množství vzorku [55,56].

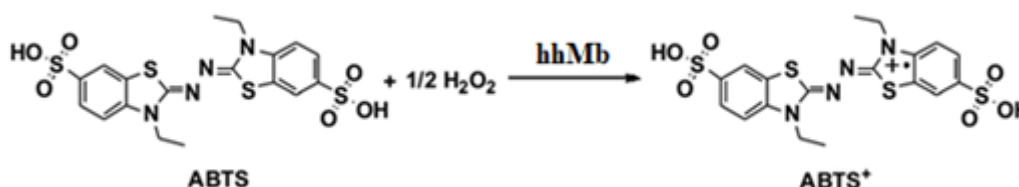
Příkladem využití elektrochemické metody je využití cyklické voltarimetrie na stanovení superoxid dismutázové (SOD) aktivity Mn (III) porfyrinů na substrátu xanthin [57].

1.4. Porovnání aktivity enzymů a umělých enzymů

Přírodní enzymy jsou aktivní pouze za biotických podmínek a často mají velice úzký katalytický účinek. U umělých enzymů je možné vytvářet struktury s konkrétními požadovanými vlastnostmi. Je možné vytvořit struktury odolné vůči určitému rozmezí teploty, tlaku a pH. Pro umělé enzymy je tedy všeobecně možné být aktivní v abiotických podmínkách a mít katalytické schopnosti i v extrémních podmínkách [11,58].

Přírodní enzymy, ale mají díky rafinovanosti přírody v některých chemických oblastech větší aktivitu. Například přírodní katechol oxidázový enzym izolovaný ze sladkých brambor (*Ipomoea batatas*) má molární aktivitu $k_{cat} = 8,25 \cdot 10^6 \text{ h}^{-1}$ [59]. To je téměř 255krát více než je molární aktivita umělého enzymu s největší molární aktivitou v literatuře [21], která nabízí přehled 127 různých katechol oxidázových (katecholázových) umělých enzymů. Všechny tyto uvedené aktivity byly měřeny na substrátu 3,5-di-tert-butylkatechol (3,5-DTBC).

Dalším příkladem porovnání aktivit přirozených a umělých enzymů je supramolekulární umělý enzym Fe4SP@HKUST-1(Cu). Tento enzym strukturně napodobuje hem a vykazuje tím peroxidázovou aktivitu. Peroxidázová aktivita se měří na substrátu kyselina 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonová) (ABTS). Substrát ABTS enzymaticky reaguje s H_2O_2 na ABTS^+ , tato reakce je znázorněna na Obrázku 6 [23].

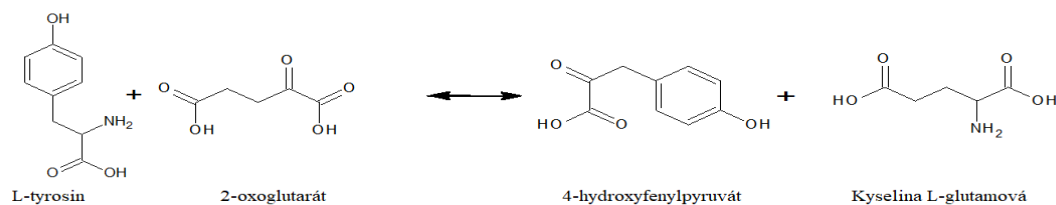


Obrázek 6: Reakce používaná pro stanovení peroxidázové aktivity Převzato a upraveno z [60]

Přirozený enzym vykazující peroxidázovou aktivitu a který se často používá k porovnání peroxidových aktivit je myoglobin z koňského srdce (hhMb). Myoglobin z koňského srdce má prostetickou složku hem. Při reakci byl sledován nárůst absorbance při 660 nm po přidání H_2O_2 k enzymu a ABTS. Bylo naměřeno že 6 mg Fe4SP@HKUST-1(Cu) v ethanolu měl rychlost rozkladu H_2O_2 $0.3 \mu\text{M}_{\text{ABTS}} \text{ s}^{-1} / \mu\text{M}_{\text{Hem}}$ a bylo zkonvertováno 50 % [ABTS] za mol hemu v porovnání s hhMb. Přirozený enzym hhMb (pH 6.5) měl rychlost rozkladu H_2O_2 $3.2 \mu\text{M}_{\text{ABTS}} \text{ s}^{-1} / \mu\text{M}_{\text{Hem}}$ [23].

Poslední příklad porovnání aktivit přirozených a umělých enzymů je proteinový umělý (semi syntetický) enzym IFABP-PX60, který má tyrosin aminotransferázovou (TAT) aktivitu [2]. U

přírodních enzymů existují různé hodnoty aktivit enzymů v závislosti na tom, z jakého organismu byl enzym získán. V této práci je uveden přirozený enzym TAT z *Mus musculus*. Reakce, na které byly aktivity měřeny je na Obrázku 7.



Obrázek 7: Reakce, kterou katalyzují aminotranferázové enzymy Nakresleno, zdroj informací:[2]

Parametry aktivity obou enzymů jsou vidět v Tabulce 2. Aktivita přirozeného enzymu je až na Michaelisovu konstatu ve všech ohledech vyšší. Je ale nutné poznamenat že zaznamenaná aktivita přírodního enzymu byla změřena při optimálních podmínkách ($\text{pH}_{\text{optimum}} = 7$, $T_{\text{optimum}} = 38^\circ\text{C}$) [61].

Tabulka 2: Porovnání aktivity umělého enzymu

Enzym	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_M ($\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	Zdroj
TAT z <i>Mus musculus</i>	1.8	25,66	14.16	[61]
IFABP-PX60	1.8	$8,06 \cdot 10^{-5}$	$4,48 \cdot 10^{-5}$	[2]

1.5. Přehled umělých enzymů (komplexů) mědi a jejich využití.

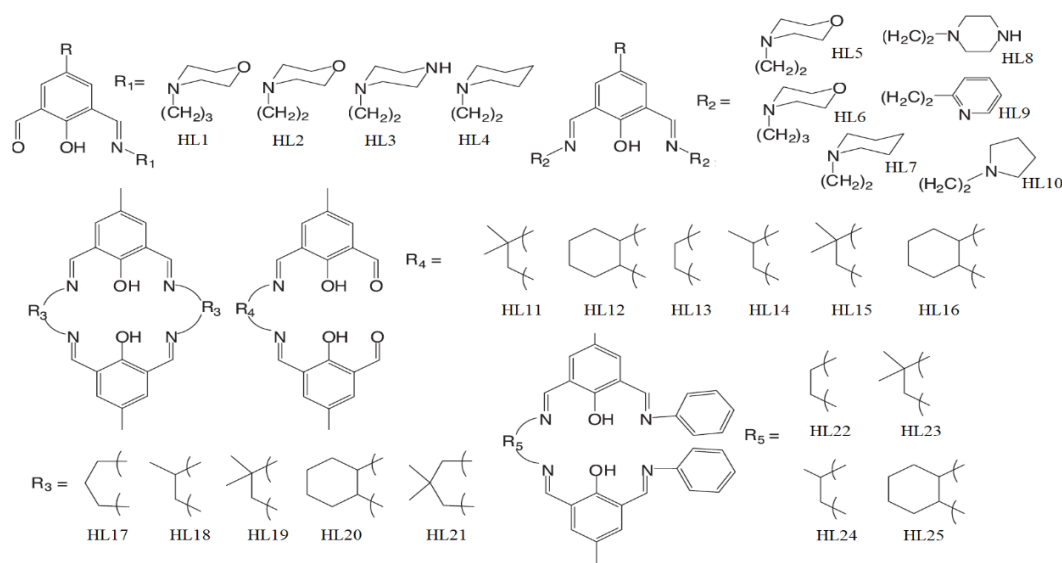
Existuje velké množství supramolekulárních umělých enzymů (komplexů) mědi vykazující různé aktivity – superoxid dismutázovou (SOD) [62], peroxidázovou [23, 63], nukleázovou [64], tyrozinázovou [58], proteázovou [64] a katalázovou [65].

Praktické použití umělých enzymů s těmito aktivitami zahrnuje například využití peroxidázového měď-kreatinového komplexu na oxidaci 3,3',5,5' -tetramethylbenzimidu (TMB), což je mezikrok jedné z možných metod detekce DNA [66]. Dále například využití katalázového NO_2 -MOFs, který je schopn katalyzovat barevnou oxidační reakci TMB s H_2O_2 na TMB_{ox} . Glutathion interaguje s TMB_{ox} tím, že inhibuje barevnou reakci. Této skutečnosti se využívá při NO_2 -MOFs kolorimetrické detekci glutathionu [67]. Další využitelnou vlastností těchto komplexů je že mnoho Cu(II) komplexů s různými ligandy projevují protibakteriální a protiplísňové účinky [68], což vedlo k výzkumu možného využití Cu(II) komplexů proti bakterii zlatý stafylokok (*Staphylococcus aureus*) [69].

Tato práce se ale bude nadále zabývat u komplexů mědi hlavně aktivitou katechol oxidázovou (katecholázovou), která se objevuje u mnoha komplexů mědi. Komplexy mědi s katecholázovou aktivitou jsou v současnosti velmi zkoumány a je jim dáвана velká pozornost [70-95].

Mechanismy katechol oxidázové aktivity mědi jsou probrány v Kapitole 2. Tyto enzymy je možné využít v průmyslovém měřítku na aktivaci molekulárního kyslíku, který se z ekonomických a environmentálních důvodů široce využívá jako oxidační činidlo. Zaktivovaný molekulární kyslík lze využít na organické syntézy a na vyvážení meziproductů s požadovanými vlastnostmi ve výrobě léčiv, agrochemikálií a dalších čistých chemikáliích [21]. Dalším příkladem využití je modifikace povrchu zlaté elektrody dvoujaderným komplexem mědi $[Cu^{II}_2(Ldtb)(\mu-OCH_3)](BPh_4)$ a chitosanovou vrstvou. Výsledný biosenzor poté umí přesně stanovit dopamin i v rušivém prostředí kyseliny askorbové a močové [96]. Dalším zajímavým využitím je začlenění $[Cu_2(HL)(\mu-CH_3COO)](ClO_4)$ do uhlíkové pastové elektrody na stanovení katechinu v čaji [97].

Tyto enzymy vznikají spojením ligandu (donor) a centrálního atomu mědi (akceptor). Pro popis jejich struktury se proto často používá popis struktury ligandu. Tyto ligandy jsou N- donorní. Těmto ligandům se často v rámci článku (práce) přiřazuje kód s číslem (např. HL23), aby Cu komplexy měly jednodušší chemický vzorec. Struktury některých těchto ligandů jsou vidět na Obrázku 8. V Tabulce 3 je zpracováno 9 umělých enzymů (komplexů) mědi, které mají nejvyšší molární rychlost ze 127 různých katechol oxidázně aktivních komplexů mědi v literatuře [21]. Všechny tyto uvedené aktivity byly měřeny na substrátu 3,5-DTBC [21].



Obrázek 8: Příklady ligandů pro výrobu umělých katechol oxidázových enzymů mědi. Převezato a upraveno z [21]

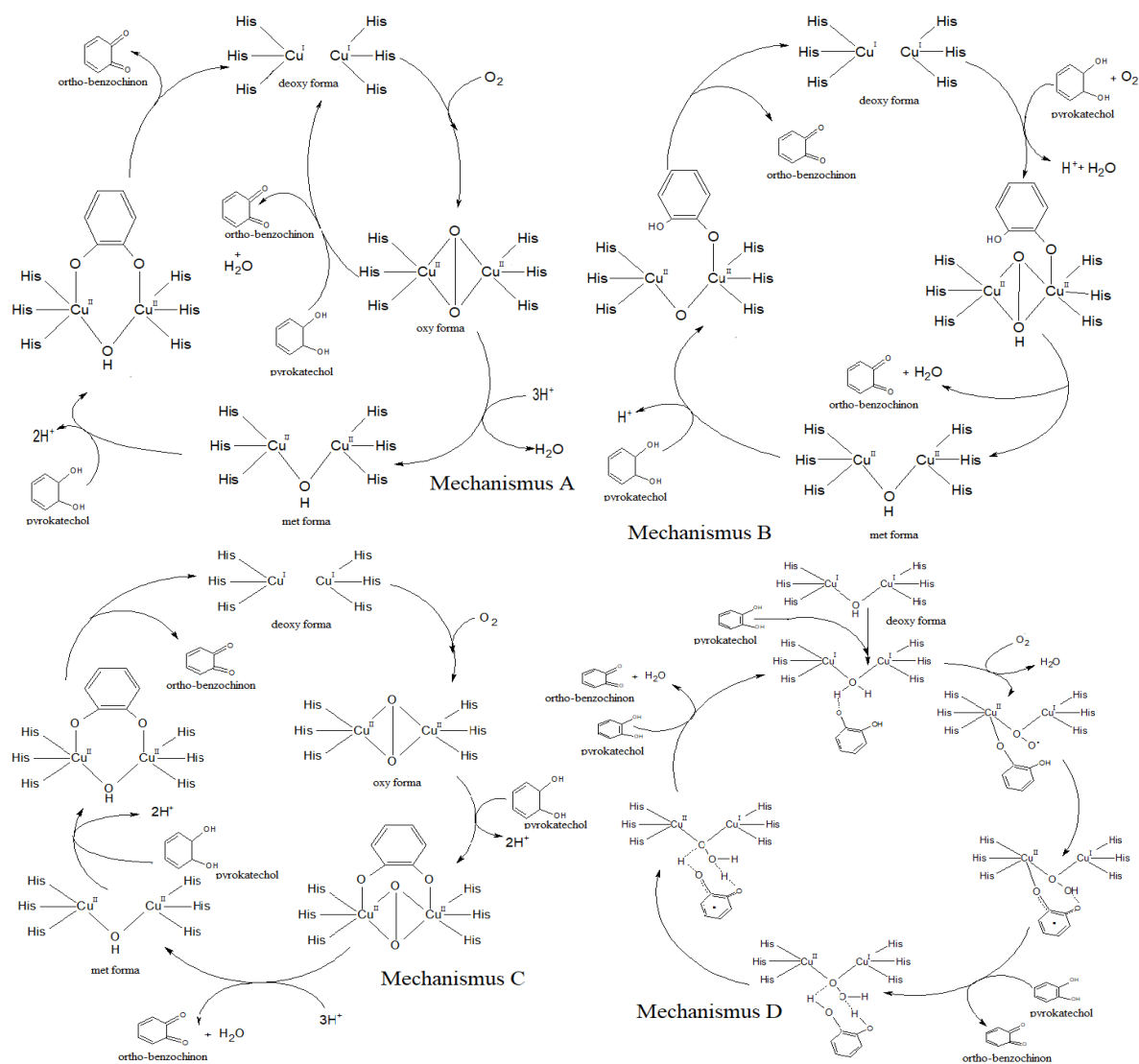
Tabulka 3: Přehled umělých katechol oxidázových enzymů, které mají vysokou aktivitu Převzato a upraveno z [21]

Vzorec	Rozpouštědlo	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	v_{max} ($mM \cdot s^{-1}$)	k_{cat}/K_M [$mM^{-1} \cdot s^{-1}$]	Zdroj
$[Cu_2(H_2L8)(OH)(H_2O)(NO_3)]^{3+}$	Methanol	9	2,3	$9 \cdot 10^{-1}$	3,91	[71]
$[Cu_2(L6)(N_3)_3]$	Methanol	8	0,7	$8 \cdot 10^{-1}$	11,43	[71]
$[Cu_2(L20)(N_3)_2 \cdot 2H_2O]$	Acetonitril	6	3,7	$6 \cdot 10^{-1}$	1,62	[74]
$[Cu_2(L17)(N_3)_2 \cdot 2H_2O]$	Acetonitril	6	9,7	$6 \cdot 10^{-1}$	0,62	[74]
$[Cu_2(L19)(N_3)_2 \cdot 2H_2O]$	Acetonitril	5	3,4	$5 \cdot 10^{-1}$	1,47	[74]
$[Cu_2(L17)(N_3)_2 \cdot 2H_2O]$	Methanol	5	2,3	$5 \cdot 10^{-1}$	2,17	[74]
$[Cu_2(L6)(OH)(H_2O)_2]^{2+}$	Methanol	4	7,6	$4 \cdot 10^{-1}$	0,53	[71]
$[Cu(L1)(H_2O)(NO_3)_2]^{2+}$	Methanol	4	4,9	$4 \cdot 10^{-1}$	0,82	[71]
$[Cu(L5)(H_2O)(NO_3)_2]$	Methanol	3	2,1	$3 \cdot 10^{-1}$	1,43	[71]

2. Mechanismy katecholázové aktivity komplexů mědi

2.1. Popis mechanistických drah katecholázové aktivity komplexů mědi

Katechol oxidázové (katecholázové) enzymy mají schopnost oxidovat katecholy (např. pyrokatechol) na ortho-chinony (např. ortho-benzochinon). Všeobecně existují dva typy mechanistických drah katechol oxidace. Při prvním se vytváří dvě molekuly ortho-chinonu a vody. V Obrázku 9 je to mechanismus B, C, D [21]. Existuje několik komplexů mědi, které reagují podle těchto mechanismů [75,76]. Také ale existuje velké množství komplexů mědi [77-81], které provádí oxidaci 3,5-di-tert-butylkatecholu (3,5-DTBC) na 3,5-di-tert-butyl-ortho-benzochinon (3,5-DTBQ) s vedlejším produktem H_2O_2 pomocí mechanismu A (Obrázek 9) [21].



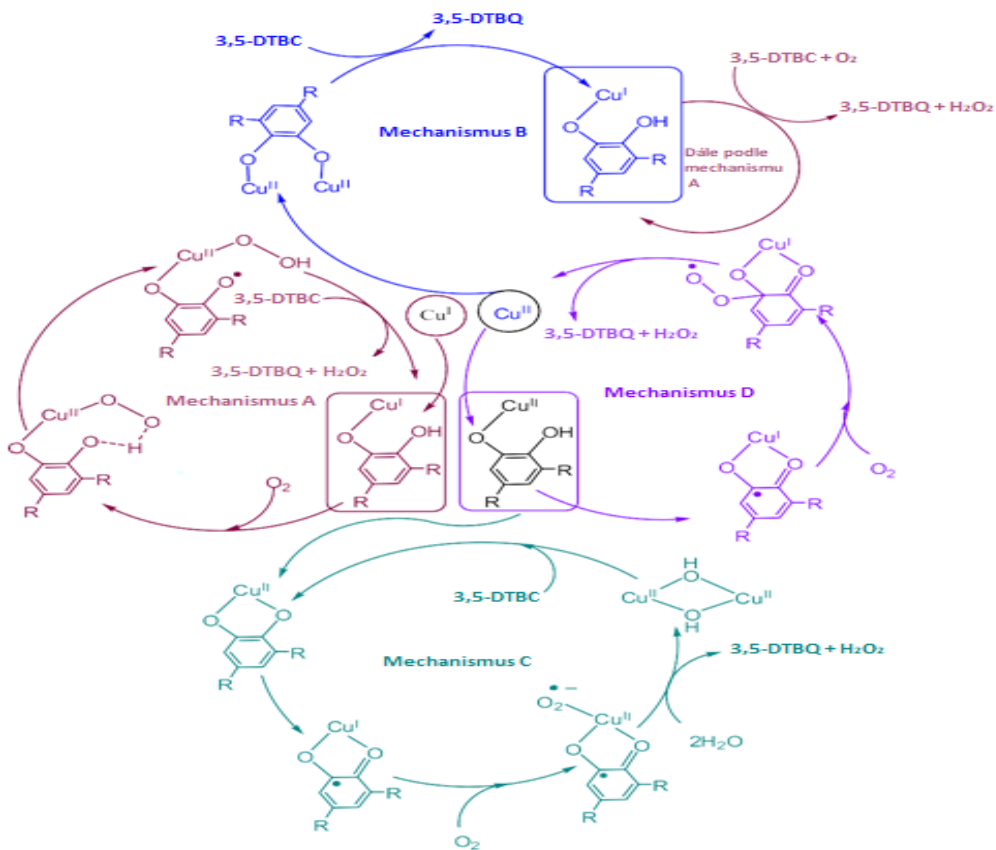
Obrázek 9: Popis mechanistických drah katecholázové aktivity na příkladu oxidace pyrokatecholu na ortho-benzochinonu. Nakresleno Zdroj informací: [21]

Nejčastěji používanou reakcí pro měření katecholázové aktivity je oxidace 3,5-DTBC na 3,5-DTBQ. Přesný popis mechanistických drah této reakce, při využití komplexů mědi byl zkoumán mnohými vědeckými skupinami. Výzkum zjistil, že ačkoliv u přírodních katecholázové enzymů Cu(II) se vytváří jako vedlejší produkt čtyřelektronové redukce kyslík a vodu, u komplexů mědi probíhá reakce často jinak. U komplexů mědi reakce O_2 s katalyzátorem při reakci katecholu na ortho-chinon zřídka vytvoří vodu, ale většinou provede dvouelektronovou redukci kyslíku a vytvoří H_2O_2 [21].

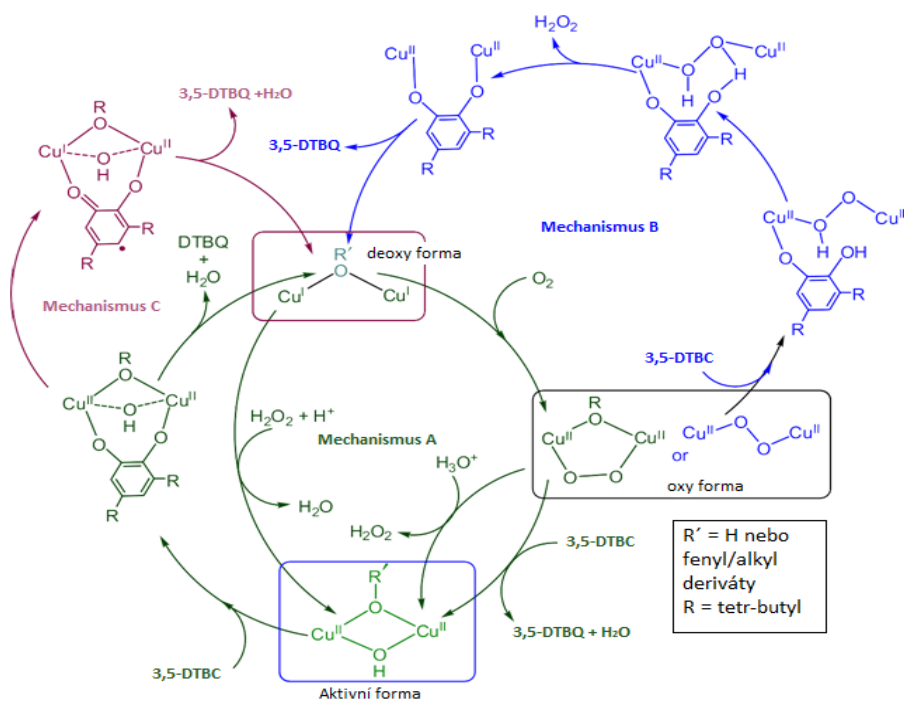
U většiny provedených mechanistických studií vytvářely Cu(I) a Cu(II) komplexy spíše H_2O_2 než vodu. [70,79-83]. Oproti tomu u mechanismů některých komplexů se vytváří jako vedlejší produkt voda [76,85]. Bohužel ale tyto mechanismy nemají podrobné studie, které by je potvrdily. [21].

Výzkum dále ukázal že se komplexy liší z hlediska vazby a oxidace substrátu v závislosti na tom, zda se jedná o jedno nebo dvoujaderný komplex. Popsané mechanismy pro jednojaderné komplexy jsou znázorněny na Obrázku 10 [21]. V tomto obrázku je mechanismus A zpracovaný podle literatury [73], mechanismus B je zpracovaný podle literatury [86], mechanismus C je zpracovaný podle literatury [87], mechanismus D je zpracovaný podle literatury [88].

Popsané mechanismy pro dvoujaderné komplexy jsou znázorněny na Obrázku 11. V tomto obrázku je mechanismus A zpracovaný podle literatur [82,89] mechanismus B je zpracovaný podle literatury [90], mechanismus C je zpracovaný podle literatury [91].



Obrázek 10: Katecholázové mechanistické dráhy jednojaderných komplexů mědi při oxidaci 3,5DTBC Převzato a Upraveno z [21]



Obrázek 11: Katecholázové mechanistické dráhy dvoujaderných komplexů mědi při oxidaci 3,5-DTBC Převzato a Upraveno z [21]

2.2. Vliv nejdůležitějších faktorů na katecholázovou aktivitu komplexů mědi

Studium katecholázové aktivity komplexů kovů ukázal, že tato aktivita je řízená mnohými různými faktory. Obecný vztah struktura – aktivita je všeobecně obtížný stanovit. Nejdůležitější faktory katecholázové aktivity pro komplexy mědi jsou popsány v textu níže. Mimo nich výzkum také naznačuje že synergismus ligandu a kovu silně ovlivňuje afinitu komplexu k substrátu a změna náboje kovu mění afinitu ke kyslíku [21].

Prvním faktorem pro katecholázovou aktivitu umělých enzymů (komplexů) mědi je počet Cu center [11]. V literatuře [11] jsou zaznamenány změřené mono-, di-, tri- a tetranukleární komplexy a největší aktivitu mají dinukleární komplexy. Mechanismus změny katecholu na o-chinon totiž vyžaduje, aby byly dva ionty mědi v aktivním centru blízko sebe [70,92].

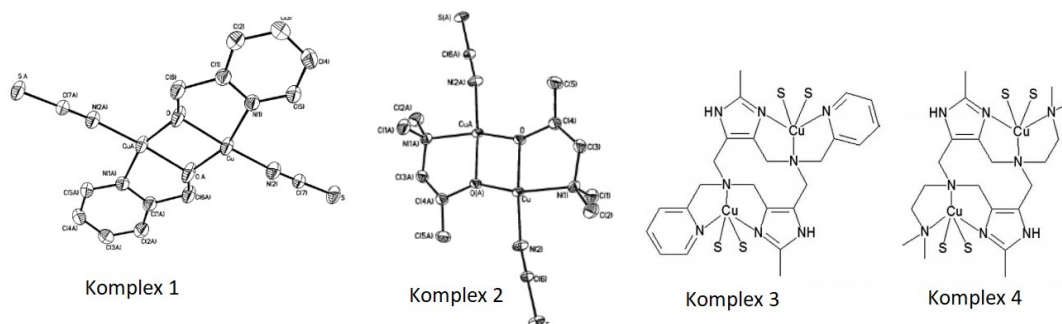
Druhým faktorem je vzdálenost Cu center. Všeobecným pravidlem je, že nejvyšší aktivita u dvoujádrových enzymů se projevuje v rozpětí vzdálenosti Cu center 2.90 Å–2.99 Å. Příkladem jsou komplexy 1,2, které mají optimální vzdáleností Cu center. Komplex 1 má vzdálenost Cu center 2,9930 Å a komplex 2 2,9866 Å [11,93].

Třetím faktorem je hydrofobnost prostředí, která je vytvořena správným typem ligandu navázaným na Cu jádro [11]. Toto je například vidět na komplexech 3 a 4, které byly měřené ve stejném pufru (methanolu) za pH 7,5. Tyto dva komplexy se liší v jedné donorní skupině. V komplexu 3 je na Cu navázaný N atom z pyridinu a v komplexu 4 je na Cu navázaný N atom z alifatického aminu. Měření aktivit těchto komplexů ukázalo, že více hydrofobní ligand v komplexu 3 vytvořil větší katecholázovou katalytickou efektivitu než méně hydrofobní ligand v komplexu 4. Další důvodem vyšší aktivity komplexu 3 je nižší hodnota pKa, která vytváří hydrolyzované aktivní formy komplexu a tím navyšuje aktivitu [94,95].

Struktura všech zmíněných komplexů je znázorněna na Obrázku 12 a kinetické parametry se vzorcem těchto enzymů jsou v Tabulce 4. Všechny tyto uvedené aktivity byly měřeny na substrátu 3,5-DTBC.

Tabulka 4: Kinetické parametry komplexů mědi demonstrující vliv různých faktorů na katecholázovou aktivitu Převzato z:[11]

Číslo komplexu	Vzorec	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	v_{max} ($mM \cdot s^{-1}$)	k_{cat}/K_M [$mM^{-1} \cdot s^{-1}$]	Zdroj
1	$[Cu_2(L26)_2(NCS)_2]$ L26= 2-(hydroxymethyl)-pyridin	$11,4 \cdot 10^{-3}$	$5,1 \cdot 10^{-1}$	$5,7 \cdot 10^{-4}$	$2,24 \cdot 10^{-2}$	[93]
2	$[Cu_2(L27)_2(NCS)_2]$ L27= 1-dimethylamino-2-propanol	$13,2 \cdot 10^{-3}$	$6,3 \cdot 10^{-1}$	$6,6 \cdot 10^{-4}$	$2,09 \cdot 10^{-2}$	[93]
3	$[Cu_2C_{24}H_{48}C_{14}N_8O_{26}]$	$79,0 \cdot 10^{-3}$	$5,2 \cdot 10^{-1}$	$2,4 \cdot 10^{-3}$	$1,52 \cdot 10^{-1}$	[94]
4	$[Cu_2C_{20}H_{44}C_{14}N_8O_{20}]$	$10,2 \cdot 10^{-2}$	2,0	$3,1 \cdot 10^{-3}$	$5,19 \cdot 10^{-2}$	[95]



Obrázek 12: Struktura komplexů mědi demonstrující vliv různých faktorů na katecholázovou aktivitu Převzato z [93,94]

Čtvrtým faktorem je správná geometrie aktivního místa, která usnadňuje přístupnost pro substrát [74]. Aktivní místa Cu katecholázy mají mít takovou geometrii, aby se minimalizovala změna geometrie při přeměně $Cu^{II} \leftrightarrow Cu^I$. Díky tomu bude aktivní místo stabilní a efektivní. Nejvíce aktivní komplexy literatury [21] jsou přemostěné fenoxidem a jsou málo pružné a většinou jsou rovinné do tvaru čtverce. Dinukleární Cu komplexy z literatury [71] s ligandem L1–L10 (Obrázek 8) mají vždy s fenoxidovým můstkem na jedné straně další, fenoxidový hydroxidový nebo azidový můstek na straně druhé. Geometrie kolem středů kovů je u těchto komplexů zkřivený oktaedr nebo čtvercová pyramida nebo rovinná do tvaru čtverce s dostupnými koordinačními místy pro vazbu substrátu nebo kyslíku. Tyto komplexy mají vysokou katalytickou účinnost [21].

Pátým faktorem je povaha rozpouštědla. Povaha rozpouštědla je důležitý faktor pro posuzování enzymatické aktivity, protože stejný komplex má jinou aktivitu v různých rozpouštědlech. Příkladem je již dříve zmíněný (Obrázek 8, Tabulka 3) komplex $[Cu_2(L17)(N_3)_2 \cdot 2H_2O]$, který byl měřen na substrátu 3,5-DTBC.v acetonitrilu a methanolu. Naměřené kinetické parametry jsou uvedené v Tabulce 5 [74].

Tabulka 5: Kinetické parametry komplexu $[\text{Cu}_2(\text{L17})(\text{N}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ měřeného v acetonitrilu a methanolu Převzato z:[11]

Vzorec	Rozpouštědlo	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	v_{max} ($\text{mM} \cdot \text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_M [$\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]	Zdroj
$[\text{Cu}_2(\text{L17})(\text{N}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$	Acetonitril	6	3,7	$6 \cdot 10^{-1}$	1,62	[74]
	Methanol	2	1,7	$2 \cdot 10^{-1}$	1,18	[74]

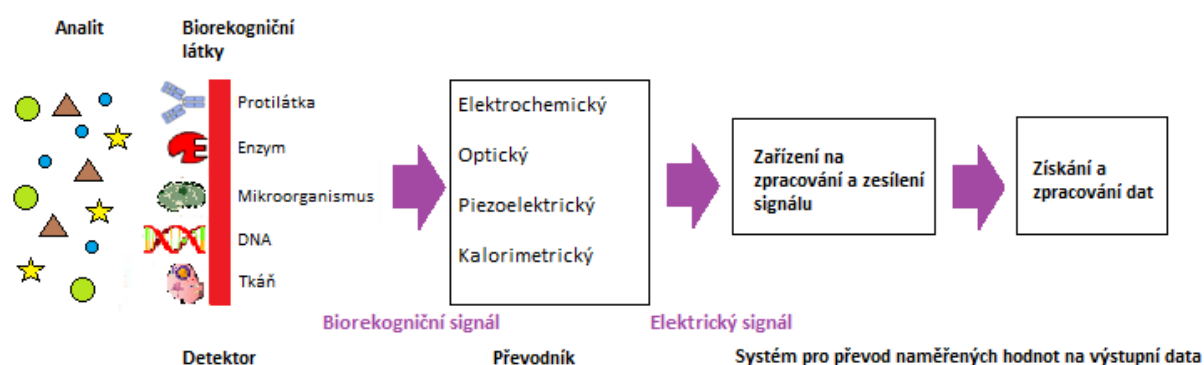
Šestým faktorem, jehož studium je možné najít například v literatuře [65], je vliv typu imobilizace komplexu (enzymu) nebo jejího neprovedení na katecholázovou aktivitu.

3. Možnosti konstrukce biosenzorů na bázi umělých enzymů pro elektroanalýzu

3.1. Představení biosenzorů a jejich klasifikace

Biosenzory jsou chemické senzory, obsahující citlivou biorekogniční složku (BRS) biologické povahy. BRS interaguje s analytem buďto biokatalytickým (katalytickým) nebo bioafinitním (nekatalytickým) mechanismem a výsledkem této interakce je biorekogniční signál. Biokatalytický mechanismus je přeměna analytu pomocí enzymatické reakce katalyzované BRS. Měření pomocí tohoto mechanismu je vhodné pro sledování koncentrací v řádech mM – μM a mohou být použity pro kontinuální měření. K biokatalytickým BRS patří enzymy, mikroorganismy a tkáně. Bioafinitní mechanismus je tvoření komplexu BRS-analyt. Měření pomocí tohoto mechanismu je dobře využitelné v měření hladiny hormonů, steroidů, léků nebo rakovinných markerů v řádech koncentrací μM – pM. K bioafinitním BRS patří protilátky, nukleové kyseliny (např. DNA), lektiny a receptory [98,99].

BRS může být součástí nebo je v těsném kontaktu s fyzikálně-chemickým převodníkem. Převodník převádí biorekogniční signál na lépe měřitelný (nejčastěji elektrický) signál, který je přímo úměrný koncentraci jedné nebo několika (skupin) chemických látek ve vzorku [98]. Tento signál se poté dále převádí na výstupní data (Obrázek 13). Biosenzory je možné rozdělit na základě využitého převodníku na elektrochemický optický hmotnostní (piezoelektrický) a kalorimetrický biosenzor [100].



Obrázek 13: Obecné schéma biosenzoru Převzato a upraveno z [101]

3.2. Elektrochemické biosenzory na bázi umělých enzymů

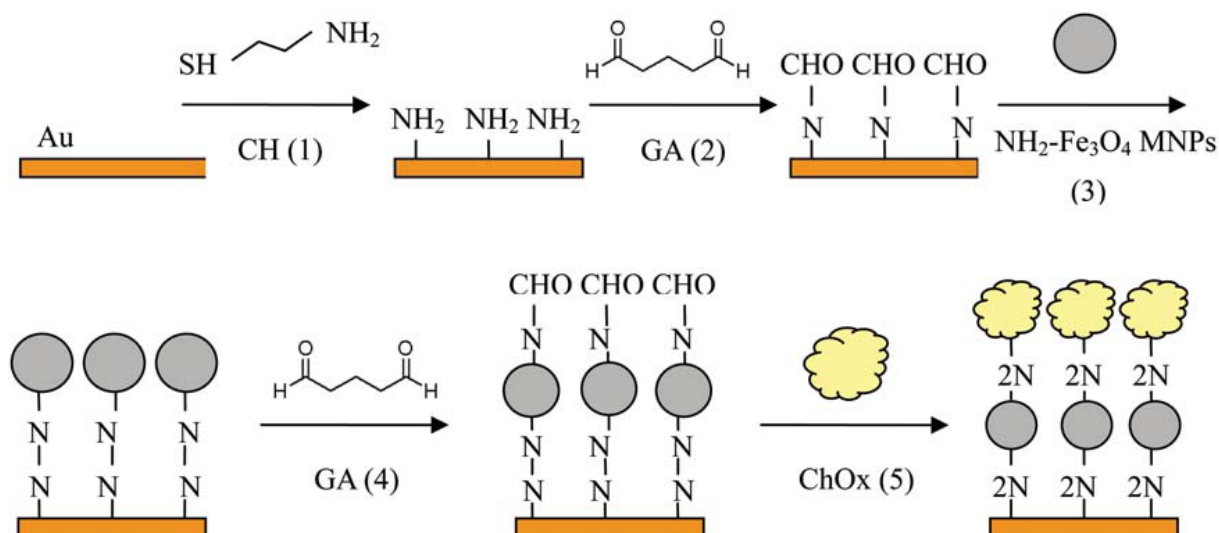
Podle rozdělení uvedeného v předchozí podkapitole se jedná biokatalytické elektrochemické biosenzory. BRS je látka napodobující činnost přírodního enzymu tzn. umělý enzym. Existuje

více typů elektrochemických převodníků (konduktometrický, amperometrický, potenciometrický a voltarimetrický), které se liší v měření elektrickém parametru [100].

3.2.1. Biosenzor využívající magnetické nanočástice Fe₃O₄ pro detekci cholinu

Zlatá elektroda byla modifikována cholin oxidázou a magnetickými peroxidázovými nanočástici (nanoenzymu) Fe₃O₄, čímž vznikl citlivý biosenzor pro detekci cholinu.

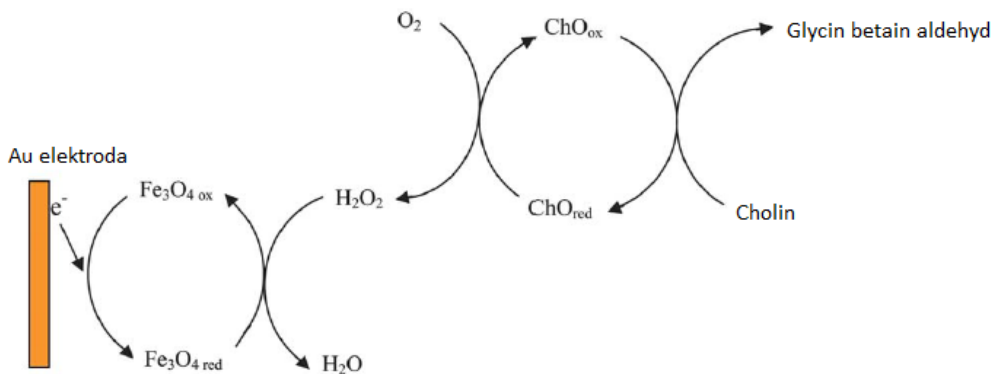
Schéma výroby tohoto biosenzoru je na Obrázku 14. Nejprve byla zlatá elektroda namáčena po 8 hodin v 10 nM cysteamin hydrochloridu. Po promytí nenávaného cysteamin hydrochloridu byla upravená elektroda namáčena v 5% glutaraldehydu po dobu 4 hodin. Dále byla tato glutaraldehydem upravená elektroda po 6 hodin vystavena působení 2 mg ml⁻¹ nanoenzymu Fe₃O₄ modifikovaným chitosanem. Poté byla upravená elektroda opět ponořena do 5% glutaraldehydu po dobu 4 hodin. Na závěr byla sestavená elektroda spojena s 2 mg ml⁻¹ cholinoxidázy (ChOx) z *Alcaligenes faecalis* po dobu 6 hodin při 25°C. Sestavovací rozpouštědlo byl vždy 0,02 M fosfátový pufr (pH = 7,0), tento roztok se také používal po každém jednotlivém kroku k oplachování. Elektroda, která byla takto připravená byla označena jako Au / CH / GA / Fe₃O₄-MNP / GA / ChOx a byla uchovávaná v fosfátový pufru při 4 °C dokud nebyla použita [102].



Obrázek 14: Schéma výroby biosenzoru Au / CH / GA / Fe₃O₄-MNP / GA / ChOx Převzato z [102]

S využitím biosenzoru Au / CH / GA / Fe₃O₄-MNP / GA / ChOx se důkaz cholinu ve vodném roztoku řídí podle schématu na Obrázku 15. Aktivita Fe₃O₄ v tomto biosenzoru je peroxidázová. Důkaz cholinu byl proveden pomocí square-wave voltametrie [102].

Pokud se v této metodě použije redukční elektrický proud jako detekční signál je možné v biosenzoru Au / CH / GA / Fe₃O₄-MNP / GA / ChOx efektivně snížit interferenci kyseliny askorbové a močové. Detekční limit je přibližně 0,1nM (S/N = 3) [102].



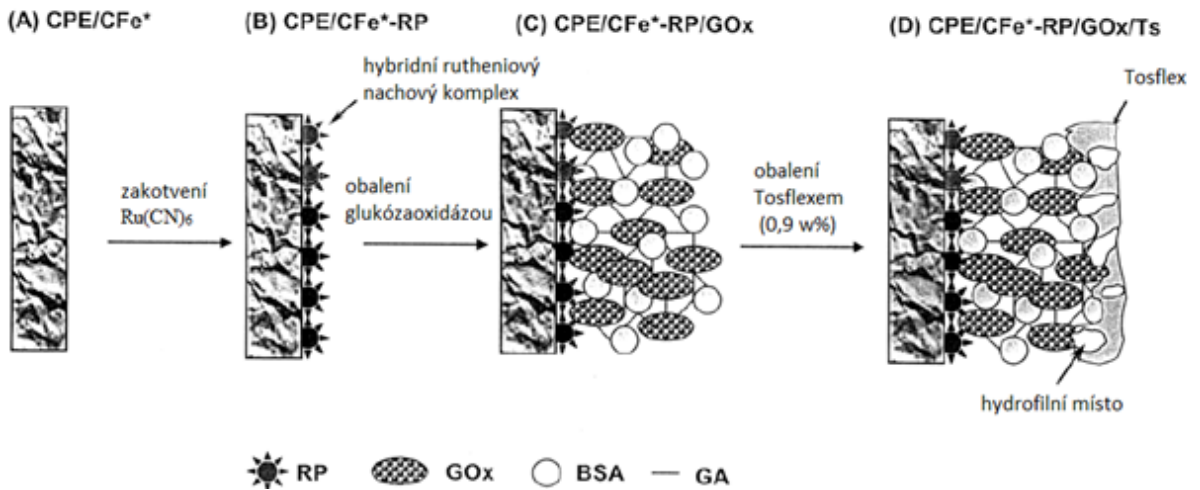
Obrázek 15: Schéma reakce důkazu cholinu ve vodném roztoku Převzato z [102]

Elektroda, která má modifikaci s nanoenzymem Fe₃O₄ má oproti elektrodě, která tuto modifikaci nemá lepší citlivost při důkazu cholin chloridu. Dále má využití Au / CH / GA / Fe₃O₄ -MNP / GA / ChOx na katalýzu redukce H₂O₂ výhodu oproti přírodním peroxidázám (např. myoglobinu z koňského srdce) ve vyšší stabilitě, lehké přípravě, magnetické separaci a obohacení. Tento biosenzor celkově vykazoval dobrou citlivost, selektivitu a stabilitu při detekci cholin chloridu, proto slouží jako dobrý příklad možného budoucího využití nanomateriálů s dobrými analytickými vlastnostmi v biosenzorech [102].

3.2.2. Biosenzor využívající Ru(CN)₆ ukotvené do škváry pro detekci H₂O₂ a glukózy

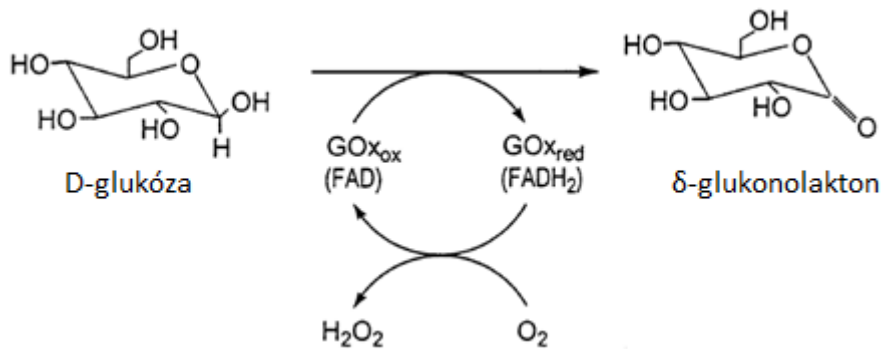
Výroba tohoto biosenzoru začíná tím, že byla uhlíková pastová elektroda (CPE) modifikována průmyslovou odpadní škvárou obohacená železem (CFe*). Do této škváry bylo poté stabilně ukotveno Ru(CN)₆, čímž se na elektrodě vytvořil hybridní rutheniový nachový komplex (RP) a elektroda se může poté souhrnně označit jako CPE/CFe*-RP. CPE/CFe*-RP byl využit pro hydrodynamickou analýzu (v rotaci) H₂O₂ v malém detekčním potenciálu 0,0 V proti referenční elektrodě Ag/AgCl v amoniovém pufru (pH = 7). Výhoda nízkého detekčního potenciálu v systému je v tom že lze jednodušeji zabránit interferenci vzniklé z elektrochemické oxidace jednoduše oxidovatelných substrátů. Tato vysoce aktivní, selektivní a stabilní elektroda je funkcí podobná peroxidázovému enzymu, chová se jako umělý peroxidázový enzym. Při měření elektroda vykazuje kalibrační křivku až do 0,8mM H₂O₂ při rotaci ($\omega = 3600$ rpm) se směrnici (0,11 μ A/ μ M) a detekčním limitem 33 nM koncentrace H₂O₂ (S/N = 3) [103].

CPE/CFe*-RP. CPE/CFe*-RP elektroda byla poté obalena glukózaoxidázou (GOx) z *Aspergillus niger* a Tosflexem (Ts). Tento biosenzor je poté možné souhrnně označit jako CPE/CFe*-RP. CPE/CFe*-RP/GOx/Ts. Souhrnné schéma celé výroby je na Obrázku 16 [103].



Obrázek 16: Schéma výroby biosenzoru CPE/CFe*-RP/GOx/Ts Převzato a upraveno z [103]

V biosenzoru CPE/CFe*-RP/GOx/Ts probíhá smíšený reakční mechanismus, kde obě reakce – rozpad H_2O_2 (peroxidázová aktivita umělého enzymu) a oxidace glukózy (oxidázová aktivita glukózaoxidázy) probíhají současně. Schéma oxidace glukózy je na Obrázku 17 [103].



Obrázek 17: Reakční schéma oxidace glukózy Převzato a upraveno z [103]

Optimální podmínky pro měření glukózy pomocí biosenzoru CPE/CFe*-RP/GOx/Ts jsou $pH = 7$ a $\omega = 3600$ rpm, což je podobné jako optimální podmínky u detekci H_2O_2 , což dále dokazuje že se tento biosenzor hodí pro sledování glukózy. Tento biosenzor také měří při malém potenciálu. Kalibrační křivka používající jednoduchou hydrodynamickou i-t křivku ukázala při $\omega = 3600$ rpm, sklonu $5,4\mu A/\mu M$ a $E = 0,0$ V lineární závislost až do 2mM koncentrace glukózy. Za optimálních podmínek byla také zhodnocena reprodukovatelnost systému a relativní směrodatná odchylka (RSD) byla 3,6% pro 12 úspěšných analýz $50\mu M$ roztoků glukózy. Detekční limit biosenzoru CPE/CFe*-RP/GOx/Ts je $0,35\mu M$ [103].

CPE/CFe*-RP/GOx/Ts je tedy citlivější než podobný biosenzor založený na hlíně//RP/GOx elektodě. [104].

CPE/CFe*-RP/GOx/Ts má dvě vrstvy – enzymovou a ochranou, vykazuje dobrou dobu odezvy, linearitu, stabilitu a detekční limit, a to i při silném hydrodynamickém zatížení. Bylo také zaznamenáno že biosenzor CPE/CFe*-RP/GOx/Ts proměřil s uspokojivými výsledky také některé léky, které obsahují glukózu. CPE/CFe*-RP/GOx/Ts má také potenciál být do budoucna upraven na jednorázové a kontinuální biosenzory, což může napomoci jeho širšímu využití.[103].

4. Experimentální část

4.1. Pomůcky a chemikálie

4.1.1. Chemikálie

Methanol

Acetátový komplex mědi $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$

(syntetizovaný na Katedře obecné a anorganické chemie Univerzity Pardubice)

Epinefrin (adrenalin)

Dopamin

Noradrenalin (norepinefrin)

4.1.2. Pomůcky

4 x Plastová zkumavka 15ml

4 x Odměrná baňka 10ml

1 x Mikropipeta 0,5 μ l – 10 μ l

1 x Mikropipeta 10 μ l – 100 μ l

1 x Mikropipeta 100 μ l – 1000 μ l

2 x Kádinka

2 x kyveta

1 x Lžička

1 x Ultrazvuková lázeň

1 x Analytické váhy

1 x Spektrofotometr: Shimadzu UV-2450 UV-Vis Spectrophotometer (Obrázek 18)



Obrázek 18: Měřicí přístroj Shimadzu UV-2450 UV-Vis Spektrofotometr

4.2. Příprava a uchování zásobních roztoků

4.2.1. Příprava 0,01 M roztoku $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$

Na analytických vahách bylo naváženo 69,22mg acetátového komplexu mědi a poté kvantitativně převedeno do 10ml odměrné baňky. Do baňky byl poté nalit methanol, baňka byla důkladně promíchána a pro lepší rozpuštění komplexu byla baňka dána na minutu do ultrazvukové lázně. Následně byla baňka doplněna po rysku methanolem a znovu důkladně promíchána.

4.2.2. Příprava 0,1 M roztoku epinefrinu

Na analytických vahách bylo naváženo 219,67mg epinefrinu a poté kvantitativně převedeno do 10ml odměrné baňky. Do baňky byl poté nalit methanol, baňka byla důkladně promíchána a pro lepší rozpuštění epinefrinu byla baňka dána na minutu do ultrazvukové lázně. Následně byla baňka doplněna po rysku methanolem a znovu důkladně promíchána.

4.2.3. Příprava 0,1 M roztoku dopaminu

Na analytických vahách bylo naváženo 189,64mg dopaminu a poté kvantitativně převedeno do 10ml odměrné baňky. Do baňky byl poté nalit methanol a baňka byla důkladně promíchána. Dopamin se v methanolu obtížněji rozpouští proto byla tato baňka v ultrazvukové lázni delší dobu. Baňka byla poté doplněna po rysku methanolem a znovu důkladně promíchána.

4.2.4. Příprava 0,1 M roztoku noradrenalinu

Na analytických vahách bylo naváženo 205,64mg noradrenalinu a poté kvantitativně převedeno do 10ml odměrné baňky. Do baňky byl poté nalit methanol, baňka byla důkladně promíchána a pro lepší rozpuštění noradrenalinu byla baňka dána na minutu do ultrazvukové lázně. Následně byla baňka doplněna po rysku methanolem a znovu důkladně promíchána.

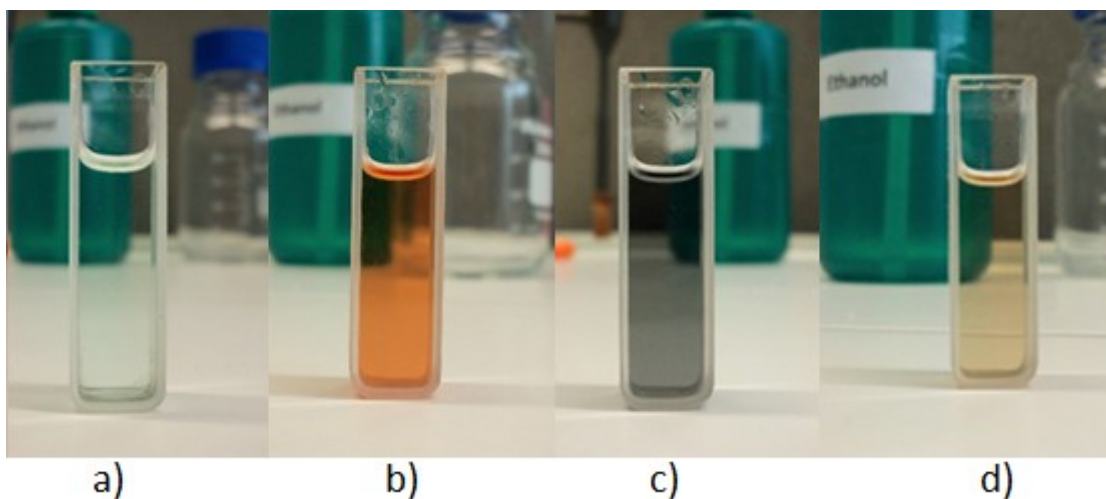
4.2.5. Uchovávání zásobních roztoků

Všechny zásobní roztoky byly po jejich přípravě za účelem snadnějšího pipetování a ochrany před rozbitím a následnou ztrátou roztoku přelity do označeních 15ml plastových zkumavek. Zásobní roztoky v plastových zkumavkách byly v době kdy se s nimi neměřilo uchovávány v lednici, aby se zamezilo degradaci (hlavně u dopaminu) chemikálie.

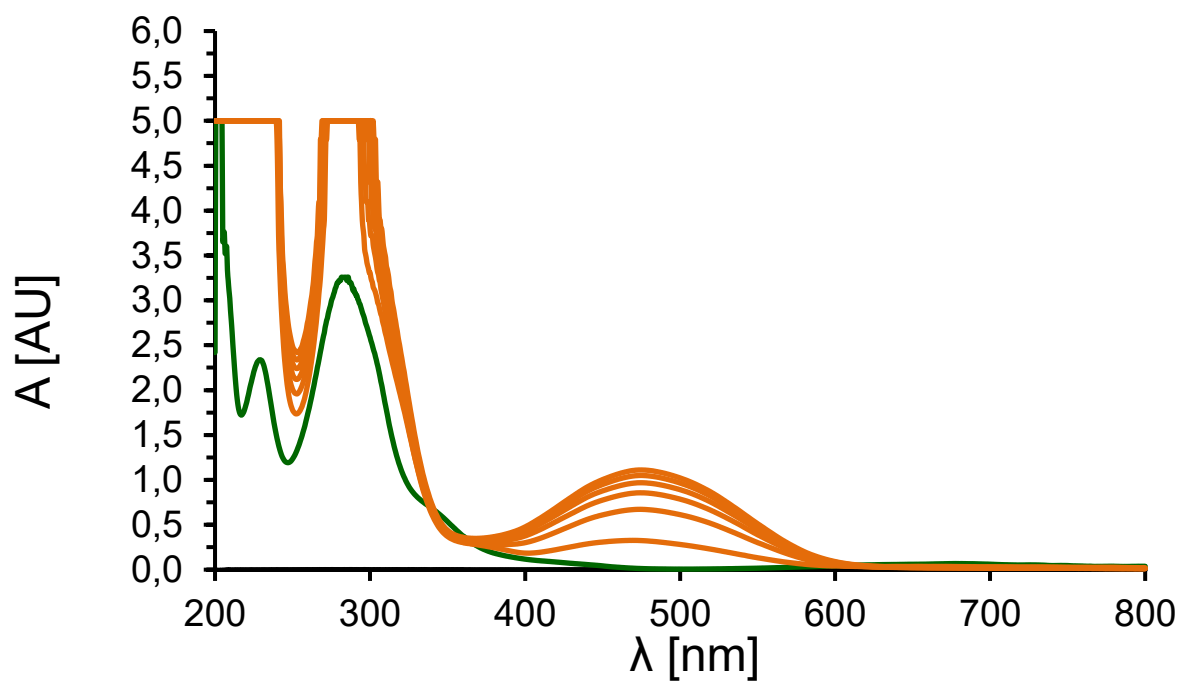
5. Výsledky a diskuse

5.1. Měření UV-VIS spekter při oxidaci vybraných neurotransmiterů s využitím acetátového komplexu mědi

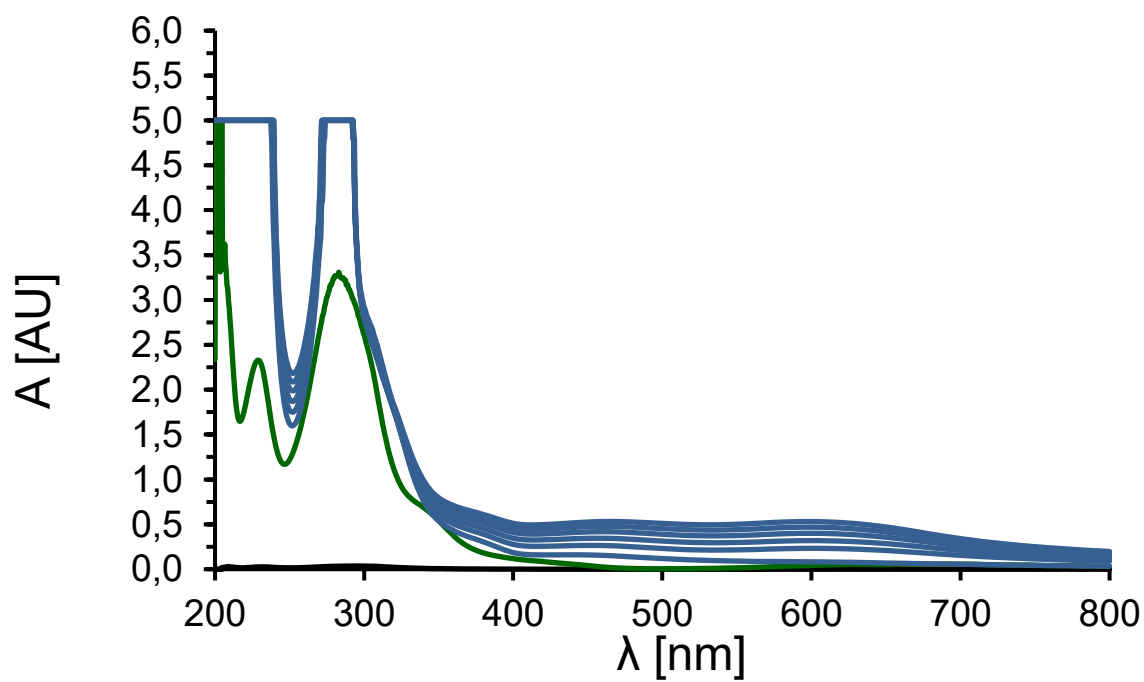
Měření probíhalo ve spektrometru Shimadzu UV-2450 UV-Vis Spectrophotometer v rozmezí vlnové délky 200nm – 800nm. Měřenou reakcí byla oxidace neurotransmiterů katalyzovaná acetátovým komplexem mědi. Tato reakce je doprovázená změnou absorbance (a barvy), kterou je možné vidět na Obrázku 19. Naměřené hodnoty pro epinefrin v Obrázku 20 pro dopamin v Obrázku 21 a pro noradrenalin v Obrázku 22. U každého měření se nejprve proměřil samotný 3 μ l methanolu (v obrázcích znázorňující graf černá čára). Poté bylo k methanolu přidáno 45 μ l 0,01M $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$ a tento roztok byl poté proměřen (v obrázcích znázorňující graf zelená čára). Poté bylo přidáno 30 μ l 0,1M roztoku neurotransmiteru a roztok byl v intervalech 5 minut celkem šestkrát proměřen.



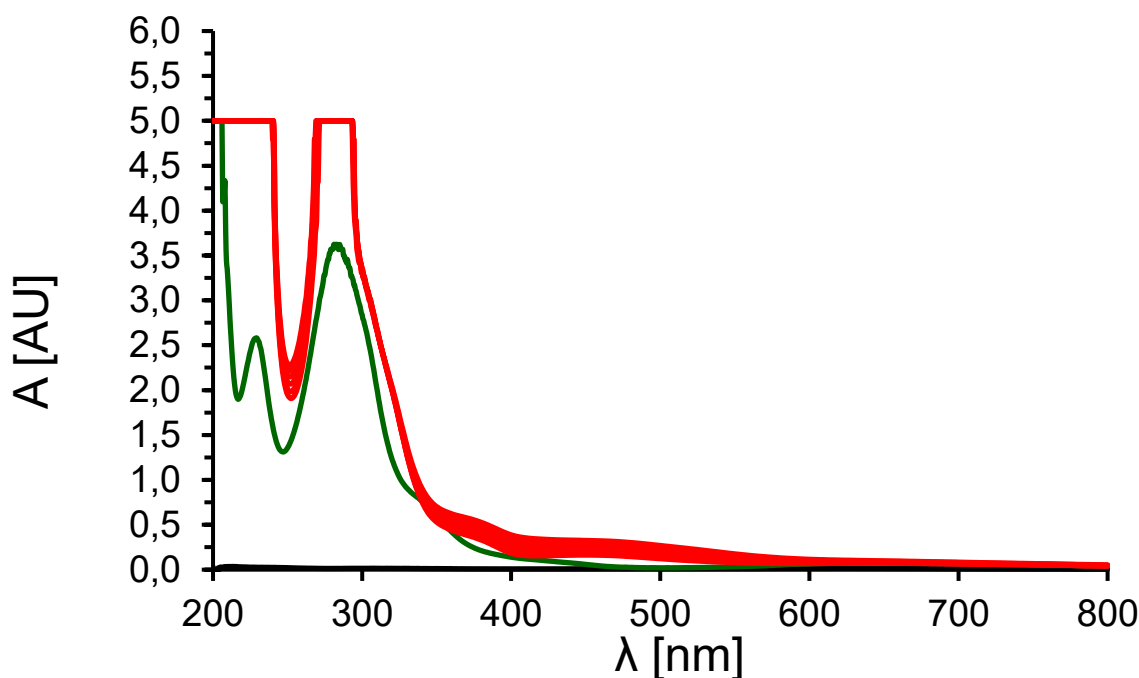
Obrázek 19: a) Měrná kyveta s $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$ + methanol připravená k měření b) Měrná kyveta se zreagováním epinefrinem c) Měrná kyveta se zreagováním dopaminem d) Měrná kyveta se zreagováním noradrenalinem



Obrázek 20: Naměřené spektrum epinefrinu



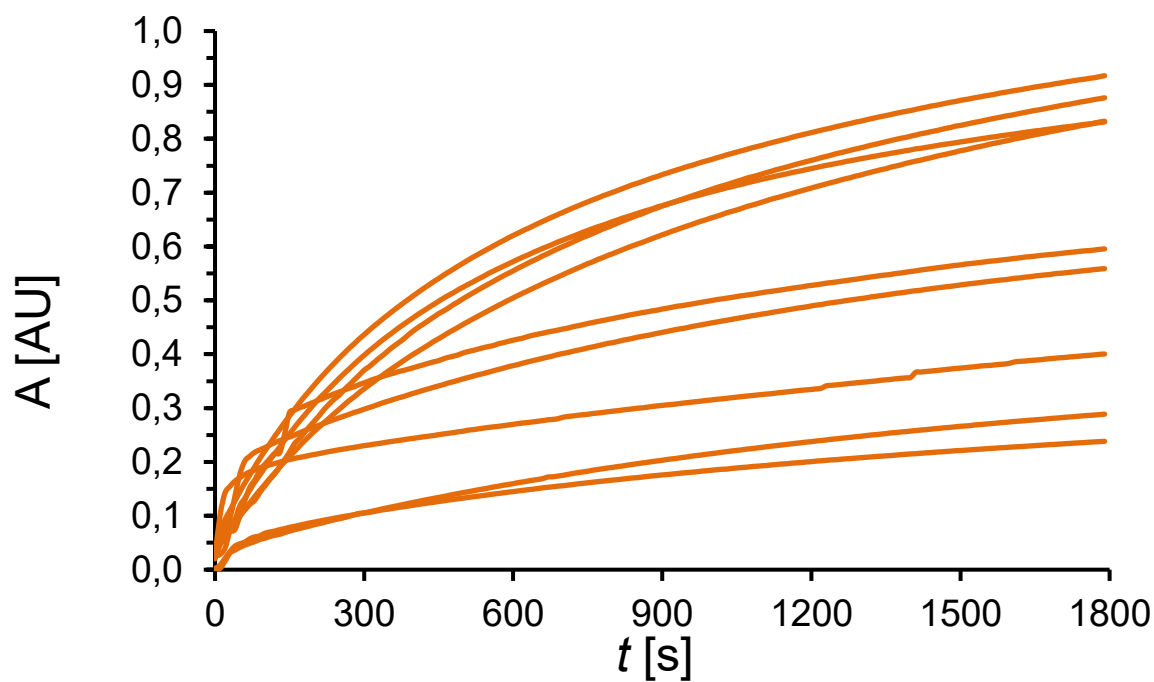
Obrázek 21: Naměřené spektrum dopaminu



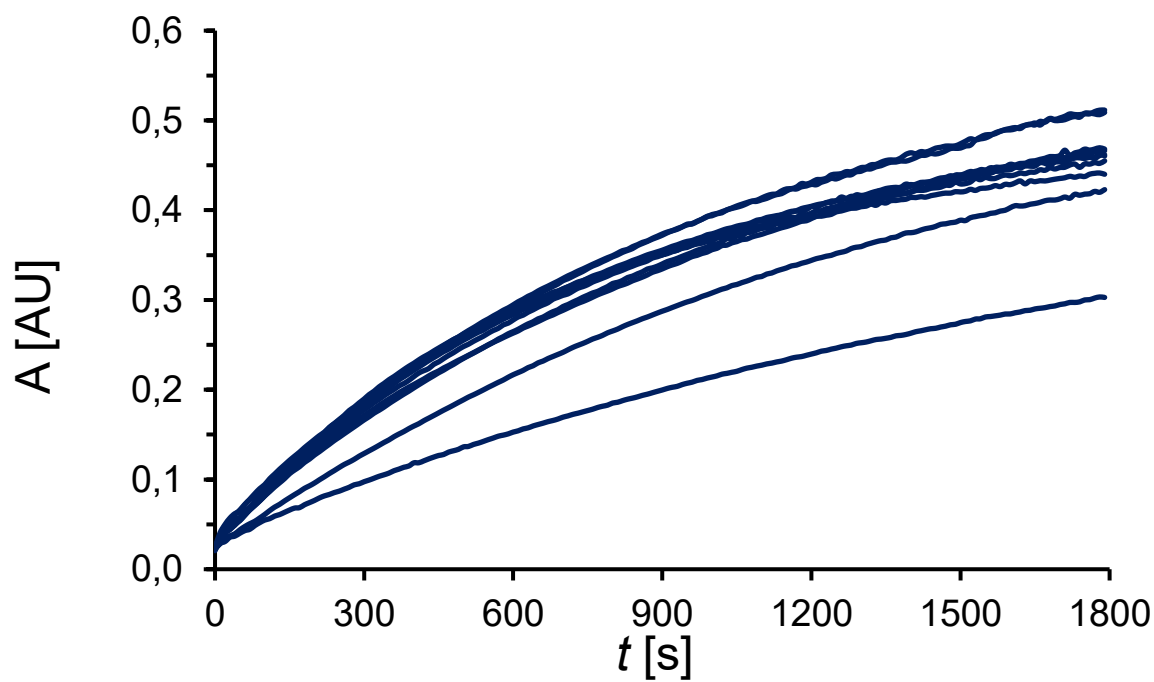
Obrázek 22: Naměřené spektrum noradrenalinu

5.2. Měření kinetiky oxidace vybraných neurotransmiterů s využitím acetátového komplexu mědi

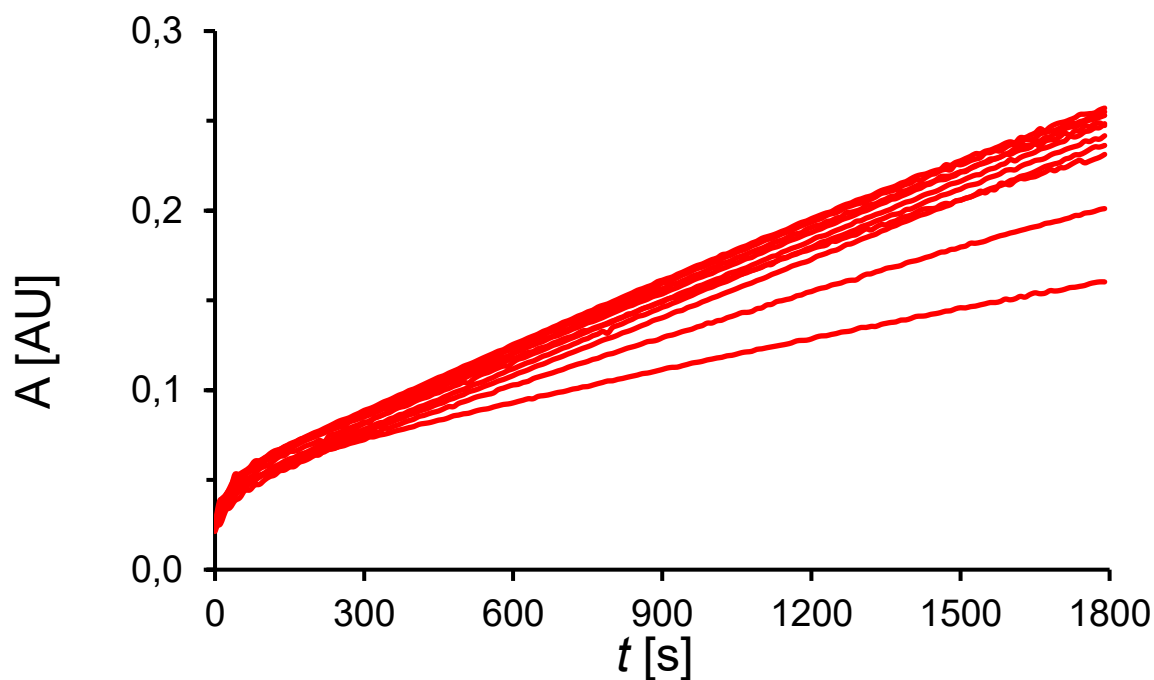
Z Obrázku 20, 21, 22 je vidět že nejlepší vlnová délka pro měření kinetiky oxidace epinefrinu je 775nm a dopaminu i noradrenalinu 750nm. Grafy také naznačují, že nejlepší kinetické parametry bude mít komplex $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$ pro epinefrin, druhé nejlepší pro dopamin a nejhorší pro noradrenalin. Měření opět probíhalo ve spektrometru Shimadzu UV-2450 UV-Vis Spektrograf a opět se jednalo o oxidaci neurotransmiterů za katalýzy $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$. U každého neurotransmiteru se měřilo 10 roztoků, které měly 10 různých koncentrací neurotransmiteru. Koncentrace těchto roztoků a objemy zásobních roztoků, které byly pro ně odpipetovány jsou vidět v Tabulce 6. Objem odpipetovaného zásobního roztoku $0,01M [Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$ bylo pro každé měření stejný a to $45\mu l$ ($c_{[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2} = 150\mu M$). Stejně tak bylo při každém měření přidáno $2950\mu l$ methanolu. V referentní kyvetě bylo $3000\mu l$ methanolu. Naměřené hodnoty pro epinefrin v Obrázku 23 pro dopamin v Obrázku 24 a pro noradrenalin v Obrázku 25. Tyto obrázky znázorňující grafy opět naznačují že nejlepší kinetické parametry bude mít komplex $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$ pro epinefrin, druhé nejlepší pro dopamin a nejhorší pro noradrenalin.



Obrázek 23: Naměřená kinetika oxidace epinefrinu s využitím acetátového komplexu mědi



Obrázek 24: Naměřená kinetika oxidace dopaminu s využitím acetátového komplexu mědi



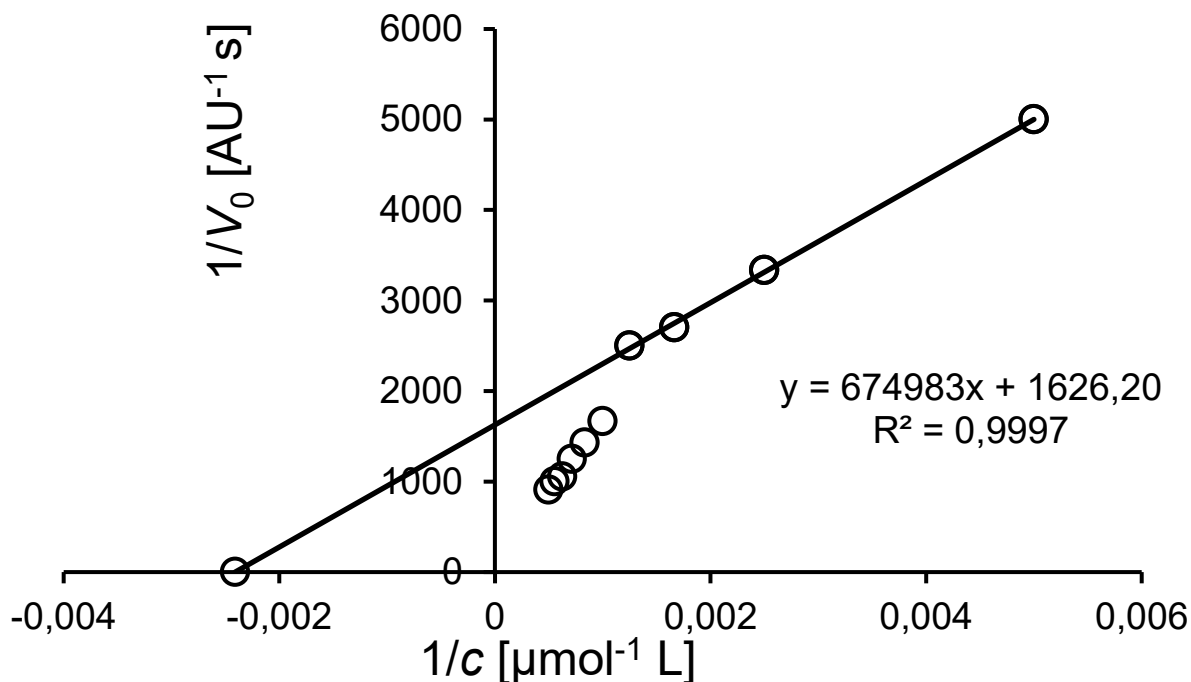
Obrázek 25: Naměřená kinetika oxidace noradrenalinu s využitím acetátového komplexu mědi

Tabulka 6: Měřené roztoky neurotransmiterů

Roztok č.	V [μ l]	c [μ M]
1	6	200
2	12	400
3	18	600
4	24	800
5	30	1000
6	36	1200
7	42	1400
8	48	1600
9	54	1800
10	60	2000

5.2.1. Kinetické parametry $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$ pro epinefrin

Naměřené hodnoty v Obrázku 23 byly proloženy rovnicí regrese polynom 3. stupně, dbalo se na to, aby byla hodnota spolehlivosti R větší než 0,995. Směrnice grafu $k(V_0)$ byla zapsána do excel tabulky. Do excel tabulky byla také zapsána převrácená hodnota koncentrace roztoků epinefrinu a převrácená hodnota příslušných V_0 . Obě převrácené hodnoty by použity pro graf v Obrázku 26. V tomto grafu byly hodnoty, které měly vhodnou přímou závislost proloženy lineální rovnicí regrese a také byla přidána hodnota, která má souřadnice $y = 0$, $x = -q/k$.



Obrázek 26: Metoda Lineweaver-Burk pro výpočet kinetických parametrů $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$ pro epinefrin

Tento graf využívá metodu Lineweaver-Burk (Obrázek 3) pro výpočet kinetických parametrů $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$ pro epinefrin:

$$y = kx + q$$

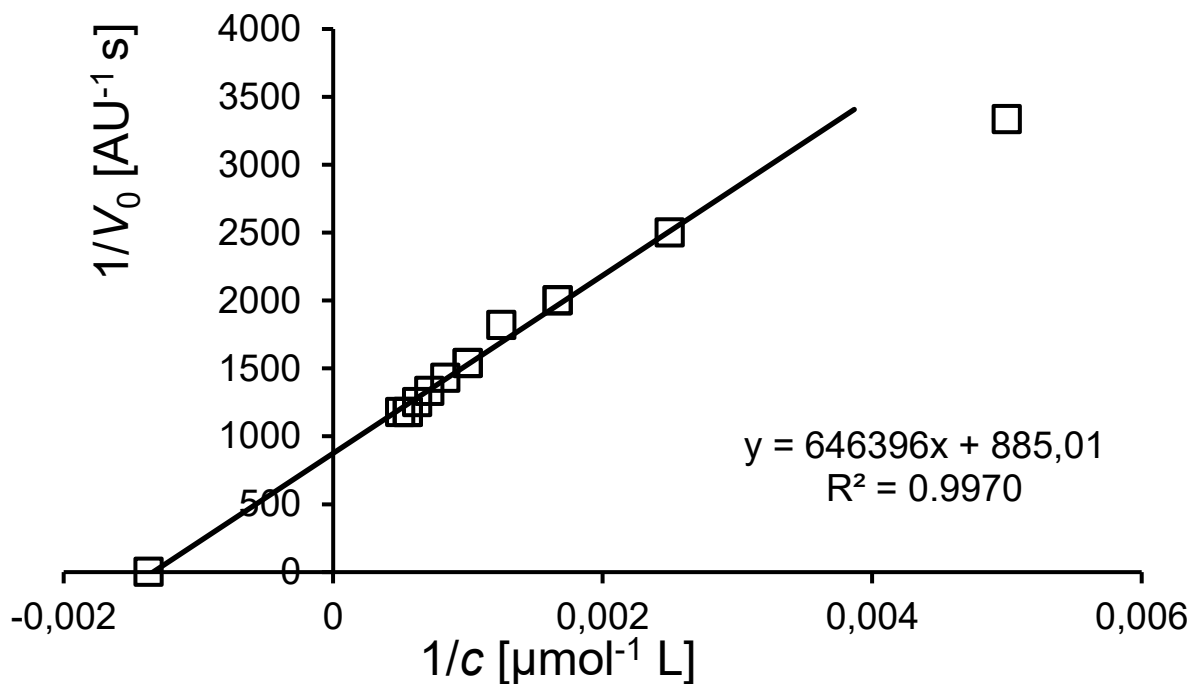
$$y = 674983x + 1626,20$$

$$K_M = \frac{-1}{-\frac{q}{k}} = \frac{-1}{-\frac{1626,02}{674983}} = 415,07 \mu M$$

$$v_{max} = \frac{1}{q} = \frac{1}{1626,02} = 6,15 \cdot 10^{-4} AU s^{-1}$$

5.2.2. Kinetika oxidace dopaminu

Naměřené hodnoty v Obrázku 24 byly proloženy rovnicí regrese polynom 3. stupně, dbalo se na to, aby byla hodnota spolehlivosti R větší než 0,995. Směrnice grafu $k(V_0)$ byla zapsána do excel tabulky. Do excel tabulky byla také zapsána převrácená hodnota koncentrace roztoků dopaminu a převrácená hodnota příslušných V_0 . Obě převrácené hodnoty by použity pro graf v Obrázku 27. V tomto grafu byly hodnoty, které měly vhodnou přímou závislost proloženy lineární rovnicí regrese a také byla přidána hodnota, která má souřadnice $y = 0$, $x = -q/k$.



Obrázek 27: Metoda Lineweaver-Burk pro výpočet kinetických parametrů $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$ pro dopamin

Tento graf využívá metodu Lineweaver-Burk (Obrázek 3) pro výpočet kinetických parametrů $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$ pro dopamin:

$$y = kx + q$$

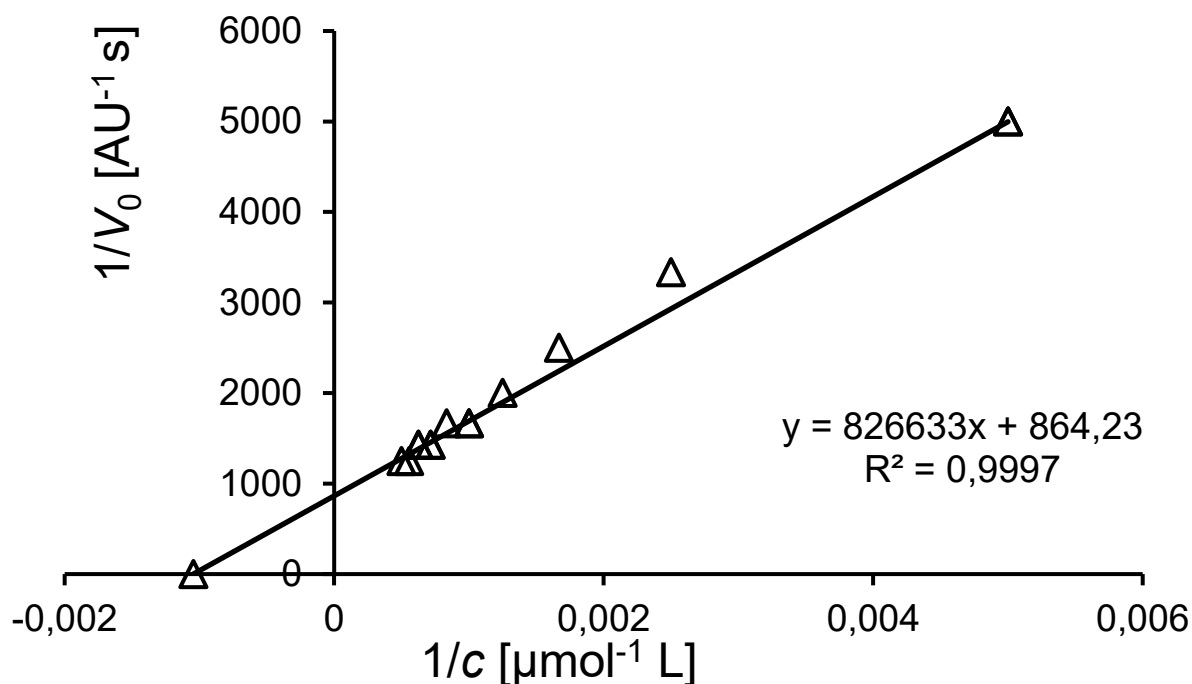
$$y = 646396x + 885,01$$

$$K_M = \frac{-1}{-\frac{q}{k}} = \frac{-1}{-\frac{885,01}{646396}} = 730,38 \mu M$$

$$v_{max} = \frac{1}{q} = \frac{1}{885,01} = 11,29 \cdot 10^{-4} AU s^{-1}$$

5.2.3. Kinetika oxidace noradrenalinu

Naměřené hodnoty v Obrázku 25 byly proloženy rovnicí regrese polynom 3. stupně, dbalo se na to, aby byla hodnota spolehlivosti R větší než 0,995. Směrnice grafu $k(V_0)$ byla zapsána do excel tabulky. Do excel tabulky byla také zapsána převrácená hodnota koncentrace roztoků noradrenalinu a převrácená hodnota příslušných V_0 . Obě převrácené hodnoty by použity pro graf v Obrázku 28. V tomto grafu byly hodnoty, které měly vhodnou přímou závislost proloženy lineární rovnicí regrese a také byla přidána hodnota, která má souřadnice $y = 0$, $x = -q/k$.



Obrázek 28: Metoda Lineweaver-Burk pro výpočet kinetických parametrů $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$ pro noradrenalin

Tento graf využívá metodu Lineweaver-Burk (Obrázek 3) pro výpočet kinetických parametrů $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$ pro noradrenalin:

$$y = kx + q$$

$$y = 826633x + 864,23$$

$$K_M = \frac{-1}{-\frac{q}{k}} = \frac{-1}{-\frac{864,23}{826633}} = 956,50 \mu M$$

$$v_{max} = \frac{1}{q} = \frac{1}{864,23} = 11,57 \cdot 10^{-4} AU s^{-1}$$

5.2.4. Shrnutí zjištěných kinetických parametrů umělého enzymu $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$

Michaelisova konstanta $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$ byla největší u substrátu epinefrin, druhá největší byla u dopaminu a nejmenší byla naměřena u noradrenalinu. Mezní rychlost byla naopak nejmenší u epinefrinu a u noradrenalinu byla mírně větší než u dopaminu.

Tabulka 7: Shrnutí výsledných hodnot kinetických parametrů $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$ pro vybrané neurotransmitery

Substrát	K_M [µM]	v_{max} [AU s ⁻¹]
Epinefrin	415,07	$6,15 \cdot 10^{-4}$
Dopamin	730,38	$11,29 \cdot 10^{-4}$
Noradrenalin	956,50	$11,57 \cdot 10^{-4}$

6. Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá popisem, studiem a problematikou využití umělých enzymů. Prvním cílem bakalářské práce bylo vytvořit rešerši rozdělení umělých enzymů; popisu jejich katalytické aktivity (aktivity enzymů) a srovnat je s přírodními enzymy. Dále bylo cílem popsat mechanismus katalytického působení u vybrané skupiny umělých enzymů, a představit možnosti konstrukcí biosenzorů využívající umělé enzymy. Druhým cílem bakalářské práce bylo provedení charakterizace katalytické aktivity vybraného komplexu mědi pomocí dostupných metod a výsledky kriticky zhodnotit.

Umělé enzymy mohou být složené z různých skeletů. V této práci jsou uvedeny skelety z polymerů, nanomolekul, proteinů a supramolekulárních látek. K jednotlivým skupinám umělých enzymů jsou uvedeny vhodné příklady s popisem katalytického působení. Tato práce také popsala různé způsoby charakterizace a instrumentální metody stanovení aktivity enzymů (komplexů). Ke každé instrumentální metodě byl uveden konkrétní příklad stanovení aktivity umělého enzymu (komplexu).

Poté bylo uvedeno porovnání aktivity přírodních enzymů a umělých enzymů. Důležitým poznatkem je že pro umělé enzymy je všeobecně možné být aktivní v abiotických podmínkách a mít katalytické schopnosti i v extrémních podmínkách. Přírodní enzymy mají ale díky rafinovanosti přírody u některých reakcích větší aktivitu. K tomuto tématu jsou uvedeny tři příklady porovnání umělých a přírodních enzymů. U všech porovnání byl přírodní enzym mnohonásobně aktivnější.

Také byl uveden přehled umělých enzymů (komplexů) mědi a jejich využití. Komplexy mědi mohou mít mnoho různých aktivit. U těchto komplexů je nejdůležitější a taky nejvíce popsána aktivita katecholázová. Katecholázové komplexy mědi nalézají využití v oblasti průmyslové aktivace molekulárního kyslíku v organické syntéze, výrobě léčiv, agrochemikálií a dalších čistých chemikáliích. Byly uvedeny i některé příklady využití katecholázových komplexů mědi v biosenzorech. I z těchto důvodů jsou v této práci popsány mechanismy katecholázové aktivity těchto komplexů. Schémata těchto mechanismů byla v této práci též uvedena. Byl také uveden souhrn nejdůležitějších faktorů pro katecholázovou aktivitu. Tyto faktory jsou počet a vzdálenost Cu center, hydrofobnost prostředí vytvořena správným typem ligandu, struktura komplexu, geometrie aktivního místa, povaha rozpouštědla a typ imobilizace komplexu (umělého enzymu).

Poté byly představeny biosenzory, byla k nim uvedena jejich klasifikace a obecné schéma biosenzoru. K elektrochemickým biosenzorům byly uvedeny dva konkrétní příklady konstrukcí biosenzorů na bázi umělých enzymů (komplexů). Oba tyto biosenzory ukázali v mnoha ohledech své výhody v analýze biologicky aktivních látek, což demonstruje perspektivní využití biosenzorů na bázi umělých enzymů v praxi.

V experimentální části byla spektrofotometricky měřena aktivita acetátového komplexu mědi $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$ na substrátech epinefrinu, dopaminu a noradrenalinu. Nejprve bylo změřeno UV-VIS spektrum při oxidaci epinefrinu, dopaminu a noradrenalinu s využitím acetátového komplexu mědi. Bylo zjištěno že nejlepší vlnová délka pro měření kinetiky oxidace epinefrinu je 775nm a dopaminu i noradrenalinu 750nm. Poté byla změřena kinetika těchto reakcí. Spektra i grafy kinetiky reakcí znázorněné v obrázcích ukazovaly že nejlepší kinetické parametry bude mít komplex $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$ pro epinefrin, druhé nejlepší pro dopamin a nejhorší pro noradrenalin. Bylo zjištěno že Michaelisova konstanta $[Cu_2L(OH)(H_2O)(EtOH)](ClO_4)_2$ byla největší u substrátu epinefrinu, druhá největší byla u dopaminu a nejmenší byla naměřena u noradrenalinu. Mezní rychlost byla naopak nejmenší u epinefrinu a u noradrenalinu byla mírně větší než u dopaminu.

7. Použitá literatura

- [1] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996, s. 120-169. ISBN 80-200-0600-1.
- [2] BRESLOW, Ronald. *Artificial enzymes*. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. ISBN 978-352-7606-641. Dostupné z: doi:10.1002/3527606645
- [3] LABÁDI, Imre, Mária BENKŐ, Kata MARKÓ a István SZILÁGYI. Mimicking a Superoxide Dismutase (SOD) Enzyme by copper(II) and zinc(II)-complexes. *Reaction Kinetics and Catalysis Letters*. 2009, **96**(2), 327–333. ISSN 1878-5190. Dostupné z: doi: 10.1007/s11144-009-5526-4
- [4] KUAH, Evelyn, Seraphina TOH, Jessica YEE, Qian MA a Zhiqiang GAO. Enzyme Mimics: Advances and Applications. *Chemistry - A European Journal*. 2016, **22**(25), 8404-8430. ISSN 0947-6539. Dostupné z: doi:10.1002/chem .201504394
- [5] WEI, Hui a Erkang WANG. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes. *Chemical Society Reviews*. 2013, **42**(14), 5981–6202. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/c3cs35486e
- [6] WU, Jiangjiexing, Xiaoyu WANG, Quan WANG, Zhangping LOU, Sirong LI, Yunyao ZHU, Li QIN a Hui WEI. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes (II). *Chemical Society Reviews*. 2019, **48**(4), 1004-1076. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/C8CS00457A
- [7] MATSUO, Takashi a Shun HIROTA. Artificial enzymes with protein scaffolds: Structural design and modification. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2014, **22**(20), 5638-5656. ISSN 09680896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2014.06.021
- [8] CHEN, Junfeng, Edzna S. GARCIA a Steven C. ZIMMERMAN. Intramolecularly Cross-Linked Polymers: From Structure to Function with Applications as Artificial Antibodies and Artificial Enzymes. *Accounts of Chemical Research*. 2020, **53**(6), 1244-1256. ISSN 0001-4842. Dostupné z: doi:10.1021/acs.accounts.0c00178
- [9] DONG, Zeyuan, Quan LUO a Junqiu LIU. Artificial enzymes based on supramolecular scaffolds. *Chemical Society Reviews*. 2012, **41**(23), 7890-7908. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/c2cs35207a

- [10] YIN, Yanzhen, Zeyuan DONG, Quan LUO a Junqiu LIU. Biomimetic catalysts designed on macromolecular scaffolds. *Progress in Polymer Science*. 2012, **37**(11), 1476-1509. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2012.04.001
- [11] SILAVI, Reza, Adeleh DIVSALAR a Ali A. SABOURY. A short review on the structure–function relationship of artificial catecholase/tyrosinase and nuclease activities of Cu-complexes. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2012, **30**(6), 752-772. ISSN 0739-1102. Dostupné z: doi:10.1080/07391102.2012.689704
- [12] BREINBAUER, Rolf a Eric N. JACOBSEN. Cooperative Asymmetric Catalysis with Dendrimeric [Co(salen)] Complexes. *Angewandte Chemie International Edition*. 2000, **39**(20), 3604-3607. ISSN 1433-7851. Dostupné z: doi:10.1002/1521-3773(20001016)39:20<3604::AID-ANIE3604>3.0.CO;2-9
- [13] FRANCAVILLA, Charles, Michael D. DRAKE, Frank V. BRIGHT a Michael R. DETTY. Dendrimeric Organochalcogen Catalysts for the Activation of Hydrogen Peroxide: Improved Catalytic Activity through Statistical Effects and Cooperativity in Successive Generations. *Journal of the American Chemical Society*. 2001, **123**(1), 57–67. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja002649+
- [14] VITALE, Rosa, Liliana LISTA, Corinne CERRONE, et al. An artificial heme-enzyme with enhanced catalytic activity: evolution, functional screening and structural characterization. *Organic & biomolecular chemistry*. 2015, **13**(17), 4859-4868. ISSN 1477-0520. Dostupné z: doi:10.1039/C5OB00257E
- [15] TAKAHASHI, Tsukasa, Bao C. VO NGO, Leyang XIAO, Gaurav ARYA a Michael J. HELLER. Molecular mechanical properties of short-sequence peptide enzyme mimics. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2015, **34**(3), 463-474. ISSN 0739-1102. Dostupné z: doi:10.1080/07391102.2015.1039586
- [16] WANG, Longgang, Qinghua YANG, Guanglong MA, Weifeng LIN, Zhen WANG, Mei HUANG a Shengfu CHEN. Development of biocompatible PAMAM ‘dendrzyme’ to maintain catalytic activity in biological complex medium. *Journal of Materials Chemistry B*. 2013, **1**(34), 4259-4266. ISSN 2050-750X. Dostupné z: doi:10.1039/c3tb20628a
- [17] KLOTZ, Myron I., Garfield P. ROYER a Ioannis S. SCARPA. Synthetic Derivatives of Polyethyleneimine with Enzyme-Like Catalytic Activity (Synzymes). *Proceedings of the*

National Academy of Sciences. 1971, **68**(2), 263-264. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.68.2.263

[18] BAZZICALUPI, Carla, Antonio BIANCHI, Enrique GARCÍA-ESPAÑA a Estefanía DELGADO-PINAR. Metals in supramolecular chemistry. *Inorganica Chimica Acta*. 2014, **417**, 3-26. ISSN 00201693. Dostupné z: doi:10.1016/j.ica.2014.03.001

[19] TAMBARA, Koujiro a Dan G. PANTOŞ. Supramolecular chemistry of donor–acceptor interactions. *Annual Reports Section "B" (Organic Chemistry)*. 2012, **108**, 186-201. ISSN 0069-3030. Dostupné z: doi:10.1039/c2oc90016e

[20] MUGRIDGE, Jeffrey S. *Supramolecular Host-Guest Interactions, Dynamics and Structure*. University of California, Berkeley, 2010. Dostupné také z: <https://escholarship.org/uc/item/03z205p1>. Disertační práce. University of California, Berkeley, College of Chemistry.

[21] DEY, Suman K. a Arindam MUKHERJEE. Catechol oxidase and phenoxazinone synthase: Biomimetic functional models and mechanistic studies. *Coordination Chemistry Reviews*. 2016, **310**, 80-115. ISSN 00108545. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccr.2015.11.002

[22] BERTINI, Ivano a Astrid SIGEL. *Handbook on Metalloproteins*. Boca Raton (Florida): CRC Press, 2001. ISBN 9780824705206.

[23] LARSEN, Randy W., Lukasz WOJTAS, Jason PERMAN, Ronald L. MUSSELMAN, Michael J. ZAWOROTKO a Carissa M. VETROMILE. Mimicking Heme Enzymes in the Solid State: Metal–Organic Materials with Selectively Encapsulated Heme. *Journal of the American Chemical Society*. 2011, **133**(27), 10356-10359. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja203068u

[24] CHUI Stephen S. Y., Samuel M. F. LO, Jonathan P. H. Charmant, Guy A. Orpen, Ian D. Williams. Chemically Functionalizable Nanoporous Material $[\text{Cu}_3(\text{TMA})_2(\text{H}_2\text{O})_3]_n$. *Science*. 1998, **283**(5405), 1148-1150. ISSN 00368075. Dostupné z: doi:10.1126/science.283.5405.1148

[25] D'SOUZA, Valerian T. Modification of Cyclodextrins for Use as Artificial Enzymes. *Supramolecular Chemistry*. 2003, **15**(3), 221-229. ISSN 1061-0278. Dostupné z: doi:10.1080/1061027031000078220

- [26] STEED, Jonathan W. a Philip A. GALE. *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials, 8 Volume Set*. Weinheim: Wiley, 2012. ISBN 9780470746400.
- [27] GAO, Zhiqiang a Zichao YANG. Detection of MicroRNAs Using Electrocatalytic Nanoparticle Tags. *Analytical Chemistry*. 2006, **78**(5), 1470-1477. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac051726m
- [28] PASQUATO, Lucia, Fiorenza RANCAN, Paolo SCRIMIN, Fabrizio MANCIN a Cesare FRIGERI. N-Methylimidazole-functionalized gold nanoparticles as catalysts for cleavage of a carboxylic acid ester. *Chemical Communications*. 2000, (22), 2253-2254. ISSN 13597345. Dostupné z: doi:10.1039/b005244m
- [29] WANG, Xiaoyu, Yihui HU a Hui WEI. Nanozymes in bionanotechnology: from sensing to therapeutics and beyond. *Inorganic Chemistry Frontiers*. 2016, **3**(1), 41-60. ISSN 2052-1553. Dostupné z: doi:10.1039/C5QI00240K
- [30] WANG, Liang, Huixin ZOU, Zeyuan DONG, et al. Temperature-Driven Switching of the Catalytic Activity of Artificial Glutathione Peroxidase by the Shape Transition between the Nanotubes and Vesicle-like Structures. *Langmuir*. 2014, **30**(14), 4013-4018. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la5008236
- [31] DENG, Huimin, Wei SHEN, Yanfen PENG, Xiaojun CHEN, Guangshun YI a Zhiqiang GAO. Nanoparticulate Peroxidase/Catalase Mimetic and Its Application. *Chemistry - A European Journal*. 2012, **18**(29), 8906-8911. ISSN 09476539. Dostupné z: doi:10.1002/chem.201200643
- [32] YU, Tianjun, Wen WANG, Jinping CHEN, Yi ZENG, Yingying LI, Guoqiang YANG a Yi LI. Dendrimer-Encapsulated Pt Nanoparticles: An Artificial Enzyme for Hydrogen Production. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2012, **116**(19), 10516-10521. ISSN 1932-7447. Dostupné z: doi:10.1021/jp3021672
- [33] GAO, Zhuangqiang, Mingdi XU, Li HOU, Guonan CHEN a Dianping TANG. Irregular-shaped platinum nanoparticles as peroxidase mimics for highly efficient colorimetric immunoassay. *Analytica Chimica Acta*. 2013, **776**, 79-86. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2013.03.034
- [34] WANG, Zhifei, Xia YANG, Jingjing YANG, Yanyun JIANG a Nongyue HE. Peroxidase-like activity of mesoporous silica encapsulated Pt nanoparticle and its application in

colorimetric immunoassay. *Analytica Chimica Acta*. 2015, **862**, 53-63. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2014.12.046

[35] GAO, Zhuangqiang, Mingdi XU, Li HOU, Guonan CHEN a Dianping TANG. Irregular-shaped platinum nanoparticles as peroxidase mimics for highly efficient colorimetric immunoassay. *Analytica Chimica Acta*. 2013, **776**, 79-86. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2013.03.034

[36] MU, Jianshuai, Li ZHANG, Min ZHAO a Yan WANG. Co₃O₄ nanoparticles as an efficient catalase mimic: Properties, mechanism and its electrocatalytic sensing application for hydrogen peroxide. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 2013, **378**, 30-37. ISSN 13811169. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcata.2013.05.016

[37] PENGO, Paolo, Stefano POLIZZI, Lucia PASQUATO a Paolo SCRIMIN. Carboxylate–Imidazole Cooperativity in Dipeptide-Functionalized Gold Nanoparticles with Esterase-like Activity. *Journal of the American Chemical Society*. 2005, **127**(6), 1616-1617. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja043547c

[38] KOZUCH, Sebastian a Jan M. L. MARTIN. “Turning Over” Definitions in Catalytic Cycles. *ACS Catalysis*. 2012, **2**(12), 2787-2794. ISSN 2155-5435. Dostupné z: doi:10.1021/cs3005264

[39] VOET, Donald, Judith G. VOET a Charlotte W. PRATT. *Principles of biochemistry*. 3rd ed. Hoboken: Wiley, 2008, s. 366–372. International student version. ISBN 978-0470233962.

[40] HAMES, David a Nigel HOOPER. *Instant Notes Biochemistry*. 3rd ed. New York: Taylor & Francis Group, 2005. ISBN 0-4153-6778-6. Dostupné také z: <http://ndl.ethernet.edu.et/bitstream/123456789/2909/1/325.pdf.pdf>

[41] BAYNES, John W. a Marek H. DOMINICZAK. *Medical Biochemistry*. 5th Edition. London: Elsevier, 2018. ISBN 9780702072994.

[42] DELAUNE, Keith, ALSAYOURI, Khalid, ed. Physiology, Noncompetitive Inhibitor. *StatPearls* [online]. Treasure Island (FLorida): StatPearls Publishing, 2020 [cit. 2021-6-10]. PMID 31424826. Dostupné z: <https://www.statpearls.com/ArticleLibrary/viewarticle/25953>

[43] LIM, Changwon, Pranab K. SEN a Shyamal D. PEDDADA. Robust nonlinear regression in applications. *Journal of the Indian Society of Agricultural Statistics*. 2013, **67**(2), 215–234.

ISSN 0019-6363. PMID 25580021. Dostupné také z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4286339/>

[44] MARASOVIĆ, Maja, Tea MARASOVIĆ a Mladen MILOŠ. Robust Nonlinear Regression in Enzyme Kinetic Parameters Estimation. *Journal of Chemistry*. 2017, **2017**, 1-12. ISSN 2090-9063. Article ID 6560983. Dostupné z: doi:10.1155/2017/6560983

[45] SCOPES, Robert K. Enzyme Activity and Assays. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2002, 2001-05-30. Dostupné z: doi:10.1038/npg.els.0000712

[46] PIETTA, Piergiorgio, Pierluigi MAURI a Michael PACE. HPLC assay of enzymatic activities. *Chromatographia*. 1987, **24**(1), 439-441. ISSN 0009-5893. Dostupné z: doi:10.1007/BF02688523

[47] CHURCHWELL, Mona, Nathan TWADDLE, Larry MEEKER a Daniel DOERGE. Improving LC–MS sensitivity through increases in chromatographic performance: Comparisons of UPLC–ES/MS/MS to HPLC–ES/MS/MS. *Journal of Chromatography B*. 2005, **825**(2), 134-143. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2005.05.037

[48] HOSSEINI, Mir W., Jean M. LEHN, Kenneth C. JONES, Kathleen E. PLUTE, Kristin B. MERTES a Mathias P. MERTES. Supramolecular catalysis: polyammonium macrocycles as enzyme mimics for phosphoryl transfer in ATP hydrolysis. *Journal of the American Chemical Society*. 1989, **111**(16), 6330-6335. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja00198a051

[49] CROCKER, John a Paul G. MURRAY, ed. *Molecular Biology in Cellular Pathology*. 2nd ed. Chichester (England): Wiley, 2003. ISBN 0-470-84475-2. Dostupné také z: <http://www.bionica.info/biblioteca/Crocker2003MolecularBiologyCellular.pdf>

[50] WANG, Yang, Wei WANG, Zhun GU, Xiangyang MIAO, Qiuyan HUANG a Baisong CHANG. Temperature-responsive iron nanozymes based on poly(N -vinylcaprolactam) with multi-enzyme activity. *RSC Advances*. 2020, **10**(65), 39954-39966. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/D0RA07226E

[51] WANG, Zhifei, Shuang ZHENG, Jin CAI, et al. Fluorescent Artificial Enzyme-Linked Immunoassay System Based on Pd/C Nanocatalyst and Fluorescent Chemodosimeter. *Analytical Chemistry*. 2013, **85**(23), 11602-11609. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac403001y

- [52] POLAND, ALAN P. a DANIEL W. NEBERT. A sensitive radiometric assay of aminopyrine N-demethylation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1973, **184**(1), 269-277. ISSN 0022-3565. PMID 4405549.
- [53] KHAJVAND, Tahereh, Reza AKHOONDI, Mohammad J. CHAICHI, Ehsan REZAAEE a Hamid GOLCHOUBIAN. Two new dinuclear copper(II) complexes as efficient catalysts of luminol chemiluminescence. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2014, **282**, 9-15. ISSN 10106030. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotochem.2014.02.011
- [54] ŽILÍČ, Selma. *Purification of recombinant proteins from yeast expression system*. Palacký university in Olomouc, 2010. Dostupné také z: <https://theses.cz/id/1bnysc/94266-812699137.pdf>. Diplomová práce. Palacký university in Olomouc, Faculty of Science, Department of Biochemistry.
- [55] KROGER, Silke, Steven J. SETFORD a Anthony P. F. TURNER. Electrochemical Assay Method for the Rapid Determination of Oxidase Enzyme Activities. *Biotechnology Techniques*. 1998, **12**(2), 123-127. ISSN 0951-208X. Dostupné z: doi:10.1023/A:1008836416656
- [56] TAJIK, Somayeh, Hadi BEITOLLAHI, Sayed Z. MOHAMMADI, et al. Recent developments in electrochemical sensors for detecting hydrazine with different modified electrodes. *RSC Advances*. 2020, **10**(51), 30481-30498. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/D0RA03288C
- [57] FAULKNER, Kevin M., Stefan I. LIOCHEV a Irwin FRIDOVICH. Stable Mn(III) porphyrins mimic superoxide dismutase in vitro and substitute for it in vivo. *Journal of Biological Chemistry*. 1994, **269**(38), 23471-23476. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(17)31540-5
- [58] ALVES, Wendel A., Saulo A. de ALMEIDA-FILHO, Mauro V. de ALMEIDA, Armando PADUAN-FILHO, Carlos C. BECERRA a Ana M. DA COSTA FERREIRA. Comparative kinetic studies on tyrosinase-like catalytic activity of dinuclear imidazole-containing copper(II) complexes. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 2003, **198**(1-2), 63-75. ISSN 13811169. Dostupné z: doi:10.1016/S1381-1169(03)00003-7
- [59] EICKEN, Christoph, Frank ZIPPEL, Klaudia BÜLDT-KARENTZOPOULOS a Bernt KREBS. Biochemical and spectroscopic characterization of catechol oxidase from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) containing a type-3 dicopper center 1. *FEBS Letters*. 1998, **436**(2), 293-299. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/S0014-5793(98)01113-2

- [60] COSTANTINI, Francesca, Roald TIGGELAAR, Simona SENNATO, Francesco MURA, Stefan SCHLAUTMANN, Federico BORDI, Han GARDENIERS a Cesare MANETTI. Glucose level determination with a multi-enzymatic cascade reaction in a functionalized glass chip. *The Analyst*. 2013, **138**(17), 5019-5024. ISSN 0003-2654. Dostupné z: doi:10.1039/c3an00806a
- [61] MEHERE, Prajwalini, Qian HAN, Justin A. LEMKUL, Christopher J. VAVRICKA, Howard ROBINSON, David R. BEVAN a Jianyong LI. Tyrosine aminotransferase: biochemical and structural properties and molecular dynamics simulations. *Protein & Cell*. 2010, **1**(11), 1023-1032. ISSN 1674-800X. Dostupné z: doi:10.1007/s13238-010-0128-5
- [62] BARIK, Atanu, Beena MISHRA, Liang SHEN, Hari MOHAN, R. M. KADAM, Sabari DUTTA, Hong-Yu ZHANG a K. Indira PRIYADARSINI. Evaluation of a new copper(II)–curcumin complex as superoxide dismutase mimic and its free radical reactions. *Free Radical Biology and Medicine*. 2005, **39**(6), 811-822. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.05.005
- [63] NGUYEN, Le T., Wing F. HO a Kun-Lin YANG. Copper–tripeptides (cuzymes) with peroxidase-mimetic activity. *RSC Advances*. 2020, **10**(30), 17408-17415. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/D0RA02472D
- [64] DAS, Mriganka, Bidyut KUMAR KUNDU, Ritudhwaj TIWARI, Poulami MANDAL, Debasis NAYAK, Rakesh GANGULY a Suman MUKHOPADHYAY. Investigation on chemical protease, nuclease and catecholase activity of two copper complexes with flexidentate Schiff base ligands. *Inorganica Chimica Acta*. 2018, **469**, 111-122. ISSN 00201693. Dostupné z: doi:10.1016/j.ica.2017.09.013
- [65] SZILÁGYI, István, László. HORVÁTH, Imre LABÁDI, Klara HERNADI, István PÁLINKÓ a Tamás KISS. Mimicking catalase and catecholase enzymes by copper(II)-containing complexes. *Open Chemistry*. 2006, **4**(1), 118-134. ISSN 2391-5420. Dostupné z: doi:10.1007/s11532-005-0009-6
- [66] SINGH, Amardeep, Srikanta PATRA, Jeong-Ah LEE, Kang H. PARK a Haesik YANG. An artificial enzyme-based assay: DNA detection using a peroxidase-like copper–creatinine complex. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011, **26**(12), 4798-4803. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2011.06.009

- [67] WANG, Jiayan, Wenying LI a Yue-Qing ZHENG. Nitro-functionalized metal–organic frameworks with catalase mimic properties for glutathione detection. *The Analyst*. 2019, **144**(20), 6041-6047. ISSN 0003-2654. Dostupné z: doi:10.1039/C9AN00813F
- [68] SZYMAŃSKI, Paweł, Tomasz FRĄCZEK, Magdalena MARKOWICZ a Elżbieta MIKICIUK-OLASIK. Development of copper based drugs, radiopharmaceuticals and medical materials. *BioMetals*. 2012, **25**(6), 1089-1112. ISSN 0966-0844. Dostupné z: doi:10.1007/s10534-012-9578-y
- [69] RAJALAKSHMI, Subramaniam, Aafreen FATHIMA, Jonnalagadda R. RAO a Balachandran U. NAIR. Antibacterial activity of copper(ii) complexes against *Staphylococcus aureus*. *RSC Adv*. 2014, **4**(60), 32004-32012. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C4RA03241A
- [70] NEVES, Ademir, Liane M. ROSSI, Adailton J. BORTOLUZZI, Bruno SZPOGANICZ, Clayton WIEZBICKI, Erineu SCHWINGEL, Wolfgang HAASE a Sergei OSTROVSKY. Catecholase Activity of a Series of Dicopper(II) Complexes with Variable Cu–OH(phenol) Moieties. *Inorganic Chemistry*. 2002, **41**(7), 1788-1794. ISSN 0020-1669. Dostupné z: doi:10.1021/ic010708u
- [71] BANU, Kazi S., Tanmay CHATTOPADHYAY, Arpita BANERJEE, Santanu BHATTACHARYA, Eringathodi SURESH, Munirathinam NETHAJI, Ennio ZANGRANDO a Debasis DAS. Catechol Oxidase Activity of a Series of New Dinuclear Copper(II) Complexes with 3,5-DTBC and TCC as Substrates: Syntheses, X-ray Crystal Structures, Spectroscopic Characterization of the Adducts and Kinetic Studies. *Inorganic Chemistry*. 2008, **47**(16), 7083-7093. ISSN 0020-1669. Dostupné z: doi:10.1021/ic701332w
- [72] BACCHELLA, Chiara, Simone DELL'ACQUA, Stefania NICOLIS, Enrico MONZANI a Luigi CASELLA. A Cu-bis(imidazole) Substrate Intermediate Is the Catalytically Competent Center for Catechol Oxidase Activity of Copper Amyloid- β . *Inorganic Chemistry*. 2021, **60**(2), 606-613. ISSN 0020-1669. Dostupné z: doi:10.1021/acs.inorgchem.0c02243
- [73] KUPÁN, Ádám, József KAIZER, Gábor SPEIER, Michel GIORGI, Marius RÉGLIER a Ferenc POLLREISZ. Molecular structure and catechol oxidase activity of a new copper(I) complex with sterically crowded monodentate N-donor ligand. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2009, **103**(3), 389-395. ISSN 01620134. Dostupné z: doi:10.1016/j.jinorgbio.2008.11.015

- [74] BANU, Kazi S., Tanmay CHATTOPADHYAY, Arpita BANERJEE, Santanu BHATTACHARYA, Ennio ZANGRANDO a Debasis DAS. Catechol oxidase activity of dinuclear copper(II) complexes of Robson type macrocyclic ligands: Syntheses, X-ray crystal structure, spectroscopic characterization of the adducts and kinetic studies. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 2009, **310**(1-2), 34-41. ISSN 13811169. Dostupné z: doi:10.1016/j.molcata.2009.05.016
- [75] KOVAL, Iryna A., Patrick GAMEZ, Catherine BELLE, Katalin SELMECZI a Jan REEDIJK. Synthetic models of the active site of catechol oxidase: mechanistic studies. *Chemical Society Reviews*. 2006, **35**(9), 814-840. ISSN 0306-0012. Dostupné z: doi:10.1039/b516250p
- [76] KOVAL, Iryna A., Catherine BELLE, Katalin SELMECZI, et al. Catecholase activity of a μ -hydroxidocopper(II) macrocyclic complex: structures, intermediates and reaction mechanism. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. 2005, **10**(7), 739-750. ISSN 0949-8257. Dostupné z: doi:10.1007/s00775-005-0016-2
- [77] KODERA, Masahito, Tomohisa KAWATA, Koji KANO, Yoshimitsu TACHI, Shinobu ITOH a Shosuke KOJO. Mechanism for Aerobic Oxidation of 3,5-Di- tert -butylcatechol to 3,5-Di- tert -butyl- o -benzoquinone Catalyzed by Di- μ -hydroxo-dicopper(II) Complexes of Peralkylated Ethylenediamine Ligands. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 2003, **76**(10), 1957-1964. ISSN 0009-2673. Dostupné z: doi:10.1246/bcsj.76.1957
- [78] KAIZER, József, József PAP, Gábor SPEIER, László PÁRKÁNYI, László KORECZ a Antal ROCKENBAUER. Synthesis, structure and catecholase activity of dinuclear copper and zinc complexes with an N₃-ligand. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2002, **91**(1), 190-198. ISSN 01620134. Dostupné z: doi:10.1016/S0162-0134(02)00459-2
- [79] OSÓRIO, Renata E. H. M. B., Rosely A. PERALTA, Adailton J. BORTOLUZZI, et al. Synthesis, Magnetostructural Correlation, and Catalytic Promiscuity of Unsymmetric Dinuclear Copper(II) Complexes: Models for Catechol Oxidases and Hydrolases. *Inorganic Chemistry*. 2012, **51**(3), 1569-1589. ISSN 0020-1669. Dostupné z: doi:10.1021/ic201876k
- [80] KOVAL, Iryna A., Katalin SELMECZI, Catherine BELLE, et al. Catecholase Activity of a Copper(II) Complex with a Macrocyclic Ligand: Unraveling Catalytic Mechanisms. *Chemistry - A European Journal*. 2006, **12**(23), 6138-6150. ISSN 0947-6539. Dostupné z: doi:10.1002/chem.200501600

- [81] ACKERMANN, Jens, Franc MEYER, Elisabeth KAIFER a Hans PRITZKOW. Tuning the Activity of Catechol Oxidase Model Complexes by Geometric Changes of the Dicopper Core. *Chemistry - A European Journal*. 2002, **8**(1), 247-258. ISSN 0947-6539. Dostupné z: doi:10.1002/1521-3765(20020104)8:1<247::AID-CHEM247>3.0.CO;2-P
- [82] MONZANI, Enrico, Luisa QUINTI, Angelo PEROTTI, et al. Tyrosinase Models. Synthesis, Structure, Catechol Oxidase Activity, and Phenol Monooxygenase Activity of a Dinuclear Copper Complex Derived from a Triamino Pentabenzimidazole Ligand. *Inorganic Chemistry*. 1998, **37**(3), 553-562. ISSN 0020-1669. Dostupné z: doi:10.1021/ic970996n
- [83] MANDAL, Sukanta, Jhumpa MUKHERJEE, Francesc LLORET a Rabindranath MUKHERJEE. Modeling Tyrosinase and Catecholase Activity Using New m-Xylyl-Based Ligands with Bidentate Alkylamine Terminal Coordination. *Inorganic Chemistry*. 2012, **51**(24), 13148-13161. ISSN 0020-1669. Dostupné z: doi:10.1021/ic3013848
- [84] SELMECZI, Katalin, Marius RÉGLIER, Michel GIORGI a Gábor SPEIER. Catechol oxidase activity of dicopper complexes with N-donor ligands☆. *Coordination Chemistry Reviews*. 2003, **245**(1-2), 191-201. ISSN 00108545. Dostupné z: doi:10.1016/j.cct.2003.08.002
- [85] WEGNER, Rainer, Michael GOTTSCHALDT, Helmar GÖRLS, Ernst-Gottfried JÄGER a Dieter KLEMM. Copper(II) Complexes of Aminocarbohydrate β -Ketoenaminic Ligands: Efficient Catalysts in Catechol Oxidation. *Chemistry - A European Journal*. 2001, **7**(10), 2143-2157. ISSN 0947-6539. Dostupné z: doi:10.1002/1521-3765(20010518)7:10<2143::aid-chem2143>3.0.co;2-d
- [86] SHYAMAL, Milan, Tarun K. MANDAL, Anangamohan PANJA a Amrita SAHA. Influence of anionic co-ligands on the structural diversity and catecholase activity of copper(ii) complexes with 2-methoxy-6-(8-iminoquinolinylmethyl)phenol. *RSC Adv.* 2014, **4**(96), 53520-53530. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/C4RA08025D
- [87] PANDA, Manas K., Mobin M. SHAIKH, Ray J. BUTCHER a Prasenjit GHOSH. Functional mimics of catechol oxidase by mononuclear copper complexes of sterically demanding [NNO] ligands. *Inorganica Chimica Acta*. 2011, **372**(1), 145-151. ISSN 00201693. Dostupné z: doi:10.1016/j.ica.2011.01.081
- [88] MARION, Ronan, Nidal M. SALEH, Nicolas LE POUL, Didier FLONER, Olivier LAVASTRE a Florence GENESTE. Rate enhancement of the catechol oxidase activity of a series of biomimetic monocopper(ii) complexes by introduction of non-coordinating groups in

N-tripodal ligands. *New Journal of Chemistry*. 2012, **36**(9), 1828-1835. ISSN 1144-0546. Dostupné z: doi:10.1039/c2nj40265c

[89] MONZANI, Enrico, Giuseppe BATTAINI, Angelo PEROTTI, et al. Mechanistic, Structural, and Spectroscopic Studies on the Catecholase Activity of a Dinuclear Copper Complex by Dioxygen. *Inorganic Chemistry*. 1999, **38**(23), 5359-5369. ISSN 0020-1669. Dostupné z: doi:10.1021/ic990397b

[90] CHAKRABORTY, Prateeti, Jaydeep ADHIKARY, Bipinbihari GHOSH, et al. Relation between the Catalytic Efficiency of the Synthetic Analogues of Catechol Oxidase with Their Electrochemical Property in the Free State and Substrate-Bound State. *Inorganic Chemistry*. 2014, **53**(16), 8257-8269. ISSN 0020-1669. Dostupné z: doi:10.1021/ic5005177

[91] COMBA, Peter, Bodo MARTIN, Amsaveni MURUGANANTHAM a Johannes STRAUB. Structure, Bonding, and Catecholase Mechanism of Copper Bispidine Complexes. *Inorganic Chemistry*. 2012, **51**(17), 9214-9225. ISSN 0020-1669. Dostupné z: doi:10.1021/ic3004917

[92] BHARATHI, Shanmuga K., Kalilur A. RAHIMAN, Kanna RAJESH, Sreekanth SREEDARAN, Paduthapillai G. ARAVINDAN, Devadasan VELMURUGAN a Vengidusamy NARAYANAN. Synthesis of new 'end-off' μ -phenoxo and bis- μ -acetato tri-bridged copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes: Spectral, magnetic, electrochemical and catalytic studies. *Polyhedron*. 2006, **25**(15), 2859-2868. ISSN 02775387. Dostupné z: doi:10.1016/j.poly.2006.04.022

[93] CHENG, Sheng-Chuan a Ho-Hsiang WEI. Structure, magnetic properties and catecholase activity study of oxo-bridged dinuclear copper(II) complexes. *Inorganica Chimica Acta*. 2002, **340**, 105-113. ISSN 00201693. Dostupné z: doi:10.1016/S0020-1693(02)01059-9

[94] GONZÁLEZ-SEBASTIÁN, Lucero, Víctor M. UGALDE-SALDÍVAR, Edgar MIJANGOS, María R. MENDOZA-QUIJANO, Luis ORTIZ-FRADE a Laura GASQUE. Solvent and pH effects on the redox behavior and catecholase activity of a dicopper complex with distant metal centers. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2010, **104**(10), 1112-1118. ISSN 01620134. Dostupné z: doi:10.1016/j.jinorgbio.2010.06.010

[95] GASQUE, Laura, Víctor M. UGALDE-SALDÍVAR, Ingrid MEMBRILLO, Juan OLGUÍN, Edgar MIJANGOS, Sylvain BERNÈS a Ignacio GONZÁLEZ. A dicopper complex with distant metal centers. Structure, magnetic properties, electrochemistry and catecholase

activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2008, **102**(5-6), 1227-1235. ISSN 01620134. Dostupné z: doi:10.1016/j.jinorgbio.2007.12.032

[96] FERNANDES, Suellen C., Iolanda C. VIEIRA, Rosely A. PERALTA a Ademir NEVES. Development of a biomimetic chitosan film-coated gold electrode for determination of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid. *Electrochimica Acta*. 2010, **55**(23), 7152-7157. ISSN 00134686. Dostupné z: doi:10.1016/j.electacta.2010.06.062

[97] FERNANDES, Suellen C., Renata E.-H. M. de BAROSS OSÓRIO, Ademir dos ANJOS, Ademir NEVES, Gustavo A. MICKE a Iolanda C. VIEIRA. Determination of catechin in green tea using a catechol oxidase biomimetic sensor. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2008, **19**(6), 1215-1223. ISSN 0103-5053. Dostupné z: doi:10.1590/S0103-50532008000600024

[98] THEVENOT, Daniel R., Krisztian TÓTH, Richard A. DURST a George S. WILSON. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. *Pure and Applied Chemistry*. 1999, **71**(12), 2333-2348. ISSN 1365-3075. Dostupné z: doi:10.1351/pac199971122333

[99] PADDLE, Brian M. Biosensors for chemical and biological agents of defence interest. *Biosensors and Bioelectronics*. 1996, **11**(11), 1079-1113. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/0956-5663(96)82333-5

[100] POLAN, Vojtěch. *Elektrochemické biosenzory*. Univerzita Pardubice, 2015. Dostupné také z: <https://dk.upce.cz/handle/10195/64085>. Disertační práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra analytické chemie.

[101] SAID, Nur A. M. *Electrochemical biosensor based on microfabricated electrode arrays for life sciences applications*. University College Cork, 2014. Dostupné také z: <https://cora.ucc.ie/handle/10468/1759>. Disertační práce. University College Cork – National University of Ireland, Department of Chemistry.

[102] ZHANG, Zhanxia, Xiaolei WANG a Xiurong YANG. A sensitive choline biosensor using Fe₃O₄ magnetic nanoparticles as peroxidase mimics. *The Analyst*. 2011, **136**(23), 4960-4965. ISSN 0003-2654. Dostupné z: doi:10.1039/c1an15602k

[103] ZEN, Jyh-Myng, Annamalai S. KUMAR a Ching-Rue CHUNG. A Glucose Biosensor Employing a Stable Artificial Peroxidase Based on Ruthenium Purple Anchored

Cinder. *Analytical Chemistry*. 2003, **75**(11), 2703-2709. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac020542u

[104] SHYU, Suh-Ching a Chong M. WANG. Characterizations of Iron-Containing Clay Modified Electrodes and Their Applications for Glucose Sensing. *Journal of The Electrochemical Society*. 1998, **145**(1), 154-158. ISSN 0013-4651. Dostupné z: doi:10.1149/1.1838228