Kinetičke značajke beta-elemena kao inhibitora acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze

Radanović, Antonija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:370755

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET

KINETIČKE ZNAČAJKE *β*-ELEMENA KAO INHIBITORA ACETILKOLINESTERAZE I BUTIRILKOLINESTERAZE

DIPLOMSKI RAD

ANTONIJA RADANOVIĆ

Matični broj: 53

Split, srpanj 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

KINETIČKE ZNAČAJKE *β*-ELEMENA KAO INHIBITORA ACETILKOLINESTERAZE I BUTIRILKOLINESTERAZE

DIPLOMSKI RAD

ANTONIJA RADANOVIĆ

Matični broj: 53

Split, srpanj 2017.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

KINETIC FEATURES OF ACETYLCHOLINESTERASE AND BUTYRYLCHOLINESTERASE INHIBITOR *β*-ELEMENE

DIPLOMA THESIS

ANTONIJA RADANOVIĆ

Parent number: 53

Split, July 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Franko Burčul
Pomoć pri izradi:

KINETIČKE ZNAČAJKE *β*-ELEMENA KAO INHIBITORA ACETILKOLINESTERAZE I BUTIRILKOLINESTERAZE

Antonija Radanović, 53

Sažetak: Alzheimerova bolest (AD) je najučestaliji oblik demencije prisutne u svijetu. Iako su se razvile mnoge hipoteze koje se odnose na primarni uzrok bolesti (kolinergična, hipoteza amiloidne kaskade i τ-hipoteza) liječenje još uvijek nije moguće, prvenstveno zbog toga što nije jasno određen glavni uzrok bolesti. U tretmanu osoba s dijagnosticiranom demencijom danas se najčešće rabe inhibitori kolinesteraza, koji ublažavaju simptome bolesti. Acetilkolinesteraza (AChE; E.C. 3.1.1.7, enzim važan kod prvih stadija Alzheimerove bolesti) i butirilkolinesteraza (BuChE; E.C. 3.1.1.8, enzim važan kod odmaklih stadija Alzheimerove bolesti) su strukturno homologni enzimi iz skupine hidrolaza. Zbog specifičnosti aktivnog mjesta njihova inhibicija istim spojem može se značajno razlikovati. Cilj ovoga rada je ispitati sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze korištenjem *β*-elemena kao inhibitora te odrediti vrstu inhibicije. Ispitivanje se vršilo spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu. Iz izračunatih postotaka inhibicije zaključeno je da *β*-elemen pokazuje inhibiciju prema oba enzima, iako je inhibicija BuChE bila nešto slabija u odnosu na AChE. Postotak inhibicije se smanjuje proporcionalno sa smanjenjem koncentracije inhibitora. Iz Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf i Eisenthal – Cornish-Bowden prikaza je utvrđeno da se radi o miješanom inhibitoru te su određeni kinetički parametri K_M, K_M^{app}, V_{max}, V_{max}^{app} enzima.

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, acetilkolinesteraza, butirilkolinesteraza, *β*-elemen, inhibicija, enzimska kinetika

Rad sadrži: 70 stranica, 50 slika, 11 tablica, 26 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Ivica Blažević,	- predsjednik
2. Dr. sc. Mario Nikola Mužek, znan.sur.	- član
3. Doc. dr. sc. Franko Burčul,	- član - mentor

Datum obrane: 14. srpnja 2017.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Graduate study of chemistry

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 21.

Mentor: assistant prof. Franko Burčul, PhD
Technical assistance:

KINETIC FEATURES OF ACETYLCHOLINESTERASE AND BUTYRYLCHOLINESTERASE INHIBITOR *β*-ELEMENE

Antonija Radanović, 53

Abstract: Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia present in the world. Although many hypotheses have been developed that relate to the primary cause of the disease (cholinergic, hypothesis of amyloid cascade and τ hypothesis) there is no proven medication to cure the disease because the major cause of the disease is not clearly defined. Cholinesterases inhibitors are used in the treatment of Alzheimer's but only to ameliorate the symptoms. Acetylcholinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7, important at early stages of AD) and butyrylcholinesterase (BuChE; E.C. 3.1.1.8, important at later stages of AD) are structurally homologous enzymes that belong to the group of hydrolases. Their inhibition with the same compound may vary significantly due to the specificity of their active site. The aim of this study was to examine the ability of *β*-elemene to inhibit AChE and BuChE as well as to determine the type of inhibition. Inhibitory activity was investigated using Ellman's spectrophotometric method. From the calculated percentages of inhibition, it was concluded that *β*-elemene inhibited both enzymes in concentration dependant manner, although the inhibitory activity of BuChE was weaker than inhibitory activity of AChE. After reviewing the results using Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf and Eisenthal – Cornish-Bowden plots it was concluded that *β*-elemene exhibits a mixed type inhibition and appropriate kinetic parameters were determined i.e. K_M, V_{max}, K_M^{app}, V_{max}^{app}.

Keywords: Alzheimer's disease, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, *β*-elemene, inhibition, enzymatic kinetics

Thesis contains: 70 pages, 50 pictures, 11 tables, 26 literary references
Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ivica Blažević, PhD, assistant prof.	- chair person
2. Mario Nikola Mužek, PhD	- member
3. Franko Burčul, PhD, assistant prof.	- supervisor

Defence date: July 14th, 2017.
Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Franka Burčula, u vremenskom razdoblju od svibnja do srpnja 2017. godine.

Rad je financiran od Hrvatske zaklade za znanost projektom IP-2014-09-6897.

Dragi Bože, hvala Ti za sve!

Zahvaljujem doc. dr. sc. Franku Burčulu, najboljem mentoru, na motivaciji, pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada te na korisnim sugestijama i stručnim savjetima tijekom pisanja diplomskog rada.

Od srca HVALA mojim roditeljima na bezuvjetnoj ljubavi, podršci, razumijevanju i pomoći tijekom studiranja. Isto tako, zahvaljujem cijeloj mojoj obitelji na potpori. Hvala što ste vjerovali u mene!

I na kraju hvala najboljem dečku i prijateljicama na strpljenju, razumijevanju i na nesebičnoj pomoći kada god je bilo potrebno.

Od srca Antonija Radanović.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1) Ispitivanje inhibicijskih svojstava β-elemena na enzime acetilkolinesterazu i butirilkolinesterazu spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu (postotak inhibicije, vrsta inhibicije).

2) Određivanje kinetičkih parametara K_M, K_M^{app}, V_{max}, V_{max}^{app} enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze u prisustvu β-elemena kao inhibitora.

Sažetak

Alzheimerova bolest (AD) je najučestaliji oblik demencije prisutne u svijetu. Iako su se razvile mnoge hipoteze koje se odnose na primarni uzrok bolesti (kolinergična, hipoteza amiloidne kaskade i τ-hipoteza) liječenje još uvijek nije moguće, prvenstveno zbog toga što nije jasno određen glavni uzrok bolesti. U tretmanu osoba s dijagnosticiranom demencijom danas se najčešće rabe inhibitori kolinesteraza, koji ublažavaju simptome bolesti.

Acetilkolinesteraza (AChE; E.C. 3.1.1.7, enzim važan kod prvih stadija Alzheimerove bolesti) i butirilkolinesteraza (BuChE; E.C. 3.1.1.8, enzim važan kod odmaklih stadija Alzheimerove bolesti) su strukturno homologni enzimi iz skupine hidrolaza. Zbog specifičnosti aktivnog mjesta njihova inhibicija istim spojem može se značajno razlikovati.

Cilj ovoga rada je ispitati sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze korištenjem β-elemena kao inhibitora te odrediti vrstu inhibicije. Ispitivanje se vršilo spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu. Iz izračunatih postotaka inhibicije zaključeno je da β-elemen pokazuje inhibiciju prema oba enzima, iako je inhibicija BuChE bila nešto slabija u odnosu na AChE. Postotak inhibicije se smanjuje proporcionalno sa smanjenjem koncentracije inhibitora. Iz Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf i Eisenthal – Cornish-Bowden prikaza je utvrđeno da se radi o miješanom inhibitoru te su određeni kinetički parametri K_M, K_M^{app}, V_{max}, V_{max}^{app} enzima.

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, acetilkolinesteraza, butirilkolinesteraza, β-elemen, inhibicija, enzimska kinetika

Summary

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia present in the world. Although many hypotheses have been developed that relate to the primary cause of the disease (cholinergic, hypothesis of amyloid cascade and τ hypothesis) there is no proven medication to cure the disease because the major cause of the disease is not clearly defined. Cholinesterases inhibitors are used in the treatment of Alzheimer's but only to ameliorate the symptoms.

Acetylcholinesterase (AChE; E.C. 3.1.1.7, important at early stages of AD) and butyrylcholinesterase (BuChE; E.C. 3.1.1.8, important at later stages of AD) are structurally homologous enzymes that belong to the group of hydrolases. Their inhibition with the same compound may vary significantly due to the specificity of their active site.

The aim of this study was to examine the ability of β-elemene to inhibit AChE and BuChE as well as to determine the type of inhibition. Inhibitory activity was investigated using Ellman's spectrophotometric method. From the calculated percentages of inhibition, it was concluded that β-elemene inhibited both enzymes in concentration dependant manner, although the inhibitory activity of BuChE was weaker than inhibitory activity of AChE. After reviewing the results using Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf and Eisenthal – Cornish-Bowden plots it was concluded that β-elemene exhibits a mixed type inhibition and appropriate kinetic parameters were determined i.e. K_M, V_{max}, K_M^{app}, V_{max}^{app}.

Keywords: Alzheimer's disease, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, β-elemene, inhibition, enzymatic kinetics

Sadržaj

UVOD 1

1.OPĆI DIO 3

1.1. ŽIVČANI SUSTAV 4

1.1.1. Neuroprijenosnici 5

1.1.2. Acetilkolin 6

1.2. ALZHEIMEROVA BOLEST 8

1.2.1. Kolinergična hipoteza 10

1.2.2. Amiloidna hipoteza 10

1.2.3. τ – hipoteza 11

1.3. ENZIMI 12

1.3.1. Osnovna svojstva enzima 12

1.3.2. Princip djelovanja enzima 13

1.3.3. Nomenklatura i klasifikacija enzima 14

1.3.4. Michaelis-Menten model 15

1.3.5. Linearizacije Michaelis-Menten jednadžbe 17

1.3.6. Inhibicija enzimske aktivnosti 21

1.4. KOLINESTERAZE I INHIBICIJA 30

1.4.1. Struktura i mehanizam djelovanja acetilkolinesteraze 30

1.4.2. Struktura i mehanizam djelovanja butirilkolinesteraze 32

1.4.3. Usporedba acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze 33

1.4.4. Inhibitori kolinesteraza u liječenju Alzheimerove bolesti 33

1.5. (-)-β-ELEMEN 36

1.6. METODE ODREĐIVANJA INHIBICIJSKE SPOSOBNOSTI 40

1.6.1. Spektrofotometrija 40

1.6.1.1. Metoda po Ellmanu 42

2.EKSPERIMENTALNI DIO 44

2.1. KEMIKALIJE 45

2.1.1. Određivanje kinetičkih parametara i sposobnosti inhibicije AChE 47
2.1.2. Određivanje kinetičkih parametara i sposobnosti inhibicije BuChE ... 50

3.REZULTATI 51

3.1. KINETIČKI PARAMETRI I SPOSOBNOST INHIBICIJE AChE 52

3.2. KINETIČKI PARAMETRI I SPOSOBNOST INHIBICIJE BuChE 58

4.RASPRAVA 63

5.ZAKLJUČAK 66

6.LITERATURA 68

UVOD

Bez enzima bi život kakav danas poznajemo bio nemoguć. Enzimi su snažni i vrlo specifični biokatalizatori koji djeluju tako da smanjuju energiju aktivacije kemijskih reakcija, odnosno pronalaze "put" s nižom energijom aktivacije. Ne mijenjaju tijek reakcije, niti utječu na njezin doseg ili produkt, već ubrzavaju reakcije nekoliko stotina, tisuća ili milijuna puta. Ne troše se u reakciji te iz nje izlaze nepromijenjeni. Prema reakcijama koje kataliziraju razlikujemo šest klasa enzima: oksidoreduktaze, hidrolaze, ligaze, transferaze, izomeraze i liaze. Kinetički parametri K_M i V_{max} važne su karakteristike enzima. K_M je koncentracija supstrata pri kojoj je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne, a V_{max} je brzina pri potpunoj zasićenosti enzima supstratom.

Acetilkolinesteraza (AChE) i butirilkolinesteraza (BuChE) su enzimi koji se zbog svoje uloge u organizmu intenzivno istražuju unutar područja biomedicine i toksikologije. AChE i BuChE, svrstane u skupinu hidrolaza, važne su ciljane mete kod tretmana jedne od najčešćih neurodegenerativnih bolesti modernog društva - Alzheimerove bolesti (AD). U razvijenim zemljama svijeta, odnosno svim zemljama "starog stanovništva" (u koje se ubraja i Hrvatska), oko 50 % starijih od 85 godina boluje od Alzheimera[1]. U mozgu pacijenata dolazi do gubitka kolinergičnih neurona te smanjenja koncentracije acetilkolina (ACh) i aktivnosti AChE, dok je ekspresija BuChE pojačana. Obzirom da bolest nije izlječiva, najuspješniji pristup ublažavanju simptoma, barem za sada, predstavljaju inhibitori kolinesteraza od kojih su neki dostupni komercijalno kao lijekovi. Sve se češće koriste spojevi izolirani iz biljaka za liječenje raznih bolesti, tako i ove demencije, zbog relativno lake dostupnosti, niske cijene kao i manjeg broja nuspojava. U ovom radu je kao inhibitor acetil- i butirilkolinesteraze korišten β-elemen.

Elemen je monociklički seskviterpen koji je sastavni dio mnogih eteričnih ulja. Kako se radi o spoju male molekulske mase, vjerojatno je da lako prolazi kroz krvno-moždanu barijeru te stoga predstavlja potencijal za tretiranje neurodegenerativnih bolesti kao što je AD.

1.OPĆI DIO

1.1. ŽIVČANI SUSTAV

Živčani sustav (lat. *systema nervosum*, ŽS) građom je i ustrojstvom prilagođen primanju i raščlanjivanju živčanih podražaja (impulsa) iz tijela i okoliša te stvaranju najboljeg odgovora i njegovu prenošenju izvršnim organima[2].

Iako svojim ustrojem i djelatnošću čini jednu sustavnu nerazdvojivu cjelinu, morfološki se dijeli na:

- središnji živčani sustav i
- periferni živčani sustav,

a funkcionalno je podijeljen na:

- somatski i
- autonomni živčani sustav[3].

Središnji se sastoji od mozga koji je zaštićen u lubanjskoj šupljini i leđne moždine zaštićene u kralježničnom kanalu, a izgrađuju ga živčane stanice (neuroni) i mijelinizirana živčana vlakna. Glavni dijelovi neurona su soma ili tijelo iz kojeg polaze izdanci, zvani akson i dendriti. Periferni živčani sustav sastoji se od živaca koji izlaze iz mozga i leđne moždine, granaju se po tijelu te spajaju središnji živčani sustav sa svim dijelovima tijela. Somatski ŽS je pod utjecajem ljudske volje i svijesti. Čine ga dijelovi mozga, leđne moždine i živaca koji primaju vanjske podražaje, a čovjek ih obrađuje i reagira govorom, kretanjem, pamćenjem i sl. Suprotno, autonomni živčani sustav regulira sve životne funkcije i nije pod utjecajem ljudske volje ni svijesti. On u sebi ujedinjuje dva velika, međusobno proturječna sustava, simpatikus i parasimpatikus[2].

1.1.1. Neuroprijenosnici

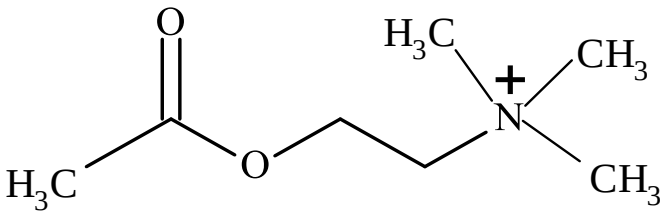
Dodirna mjesta između živčanih stanica ili između aksonskih završetaka i površine izvršnog organa nazvana su sinapsama. Na tim se mjestima iz završetka aksona na površinu susjedne stanice izlučuju neuroprijenosnici s pomoću kojih se podražaji s jednog neurona šire na sljedeći neuron ili na stanice izvršnog organa. Sinapse omogućuju, dakle, usklađeno djelovanje živčanog sustava. Dva neurona koji čine sinapsu ne dodiruju se izravno, jer se između završetka presinaptičkog neurona i tijela postsinaptičkog neurona nalazi sinaptička pukotina. Za svaku vrstu neurotransmitera postoji odgovarajući receptor na membrani drugog neurona u sinapsi. Receptor veže samo točno određenu kemijsku tvar. Primjerice, dopaminski receptor veže samo dopamin, ne i druge neuroprijenosnike kao što je serotonin. Kemijskim vezivanjem neuroprijenosnika i receptora započinju promjene u postsinaptičkom neuronu koje mogu izazvati akcijski potencijal, odnosno signal za daljnji prijenos. Međutim, neke prijenosne tvari ne pobuđuju postsinaptičke neurone, nego smanjuju njihovu podražljivost. Prema tome, razlikuju se pobuđujući i inhibicijski neuroprijenosnici[2]. U tablici 1.1. se nalaze primjeri nekih neuroprijenosnika i njihova uloga u tijelu[4].

Tablica 1.1. Popis nekih neuroprijenosnika i njihovih funkcija.

Neuroprijenosnik	Uloga u tijelu
Acetilkolin	Služi za kontrolu mišića u neuronima leđne moždine i za regulaciju pamćenja i drugih viših funkcija u neuronima mozga. Acetilkolin je pobuđujući neuroprijenosnik.
Dopamin	Odgovoran je za osjećaje zadovoljstva, ali isto tako ima više funkcija koje ovise o mjestu djelovanja u mozgu. Obično ima inhibicijsku ulogu.
Serotonin	Uključen je u regulaciju mnogih funkcija, kao što su raspoloženje, apetit i osjetilna percepcija u leđnoj moždini. Serotonin je inhibicijski neuroprijenosnik u reakciji na bol.

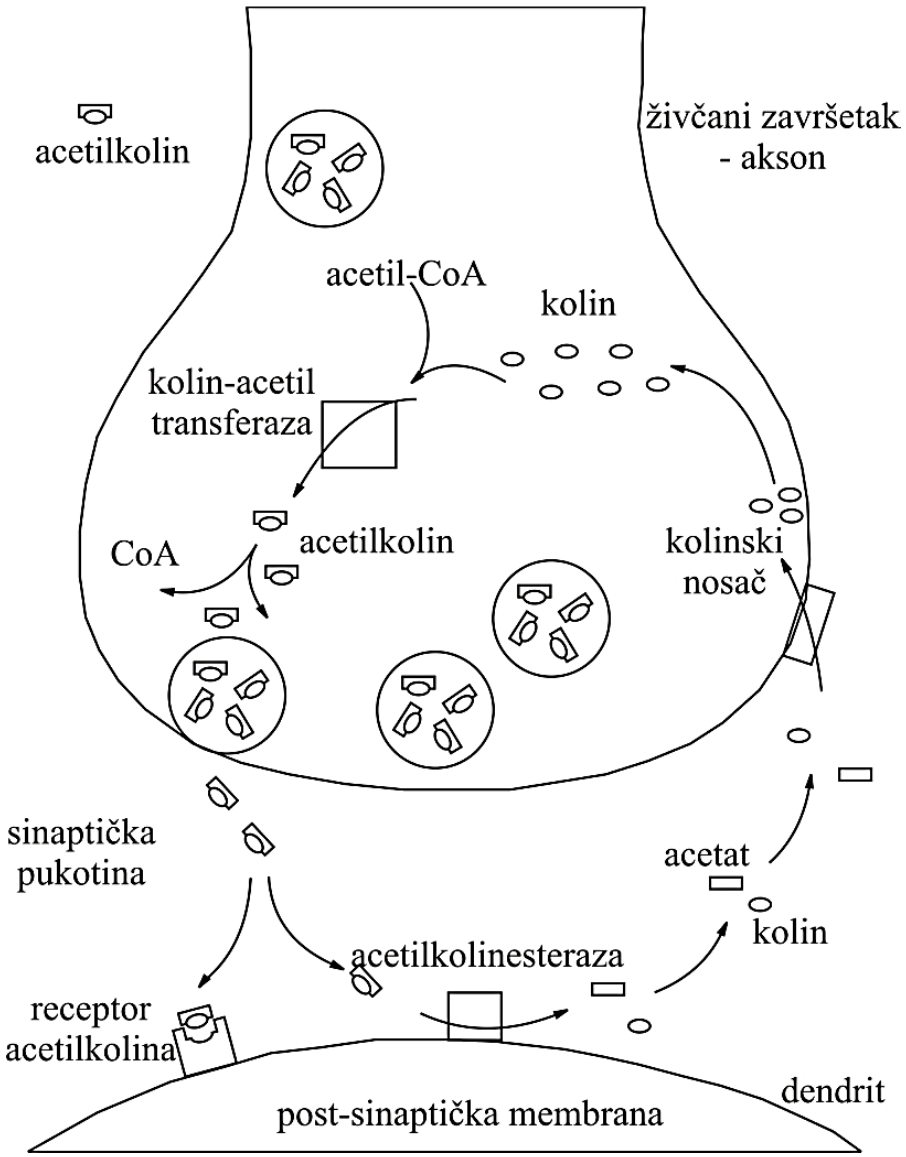
1.1.2. Acetilkolin

Acetilkolin (engl. *acetylcholine,* ACh) čija je strukturna formula prikazana na slici 1.1., je prvi otkriveni neuroprijenosnik. Izlučuje se u autonomnom živčanom sustavu, u neuromišićnoj spojnici i brojnim sinapsama središnjeg živčanog sustava. ACh se sintetizira iz kolina i acetil-koenzima A (acetil-CoA) uz prisustvo enzima kolin-acetil-transferaze.



Slika 1.1. Strukturna formula acetilkolina.

Acetilkolin se uklanja razgradnjom iz sinaptičke pukotine i njegovom hidrolizom acetilkolinesteraza (engl. *acetylcholinesterase*, AChE) kontrolira prijenos živčanih impulsa u kolinergičnoj sinapsi centralnog i perifernog živčanog sustava. Naime, u presinaptičkim završetcima nalazi se veliki broj mjehurića s prijenosnom tvari. Kada depolarizacijski val, nastao podraživanjem neurona, dospije do presinaptičkog završetaka ACh, privuče mjehuriće do opne završetka pa oni svoj sadržaj izbace u sinaptičku pukotinu. Oslobođena tvar difundira kroz pukotinu i dolazi do postsinaptičkog neurona na kojemu su brojne receptorske bjelančevine s kojima tvar reagira. Dva su tipa receptora za acetilkolin, nikotinski i muskarinski. Nikotinski su smješteni u neuromuskularnim čvorovima i središnjem živčanom sustavu (SŽS), a muskarinski u mišićima miokarda, glatkim mišićima te dijelovima SŽS. Nakon njegova reagiranja s receptorima opna postsinaptičkog neurona postaje propusna za natrijeve ione, oni ulaze u neuron jer ih izvan neurona ima mnogo više nego unutar. Stoga u neuronu nastaje akcijski potencijal koji se širi dalje i aktivira sljedeće neurone u nizu. Dakle, vezanjem ACh na receptor, dolazi do depolarizacije postsinaptičkog područja. No, brzom razgradnjom ACh u sinaptičkoj pukotini djelovanjem AChE, ponovno se uspostavlja polarizacija postsinaptičke membrane i prijenos impulsa prestaje[2].

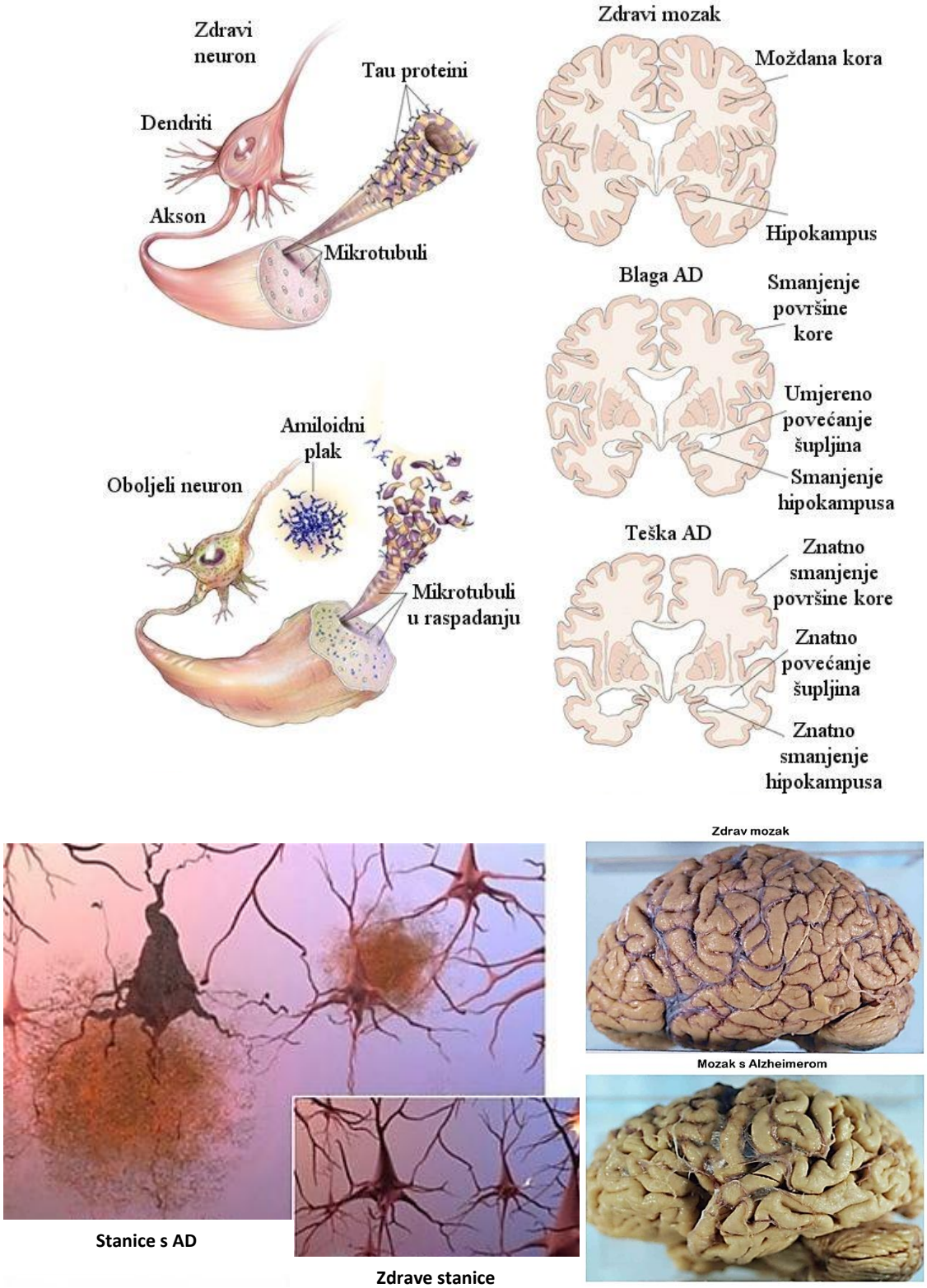


Slika 1.2. Shematski prikaz kolinergične sinapse i kružnog ciklusa acetilkolina[4].

1.2. ALZHEIMEROVA BOLEST

Alzheimerova bolest (engl. *Alzhimer's disease*, AD) je najučestaliji oblik demencije prisutne u modernom društvu. Očekuje se da će jedna od 85 osoba oboljeti od ove bolesti do 2050. godine[5]. Demencija je klinički sindrom uzrokovan bolešću mozga, obično kroničnog ili progresivnog tijeka sa stečenim višestrukim oštećenjem viših kortikalnih funkcija uključujući pamćenje, razmišljanje, shvaćanje, rasuđivanje, orijentaciju, sposobnost učenja, govor i računanje. Kod oboljelih od AD svijest nije pomućena. Kognitivna su oštećenja obično praćena gubitkom emotivne kontrole, socijalnog ponašanja i motivacije, što katkada može i prethoditi samoj bolesti. Da bi se postavila pouzdana dijagnoza demencije, navedeni simptomi i oštećenja moraju biti prisutni najmanje šest mjeseci. Najčešće se javlja u starijoj životnoj dobi; učestalost je oko 1 % u dobi od 60 godina i raste dvostruko svakih pet godina, tako da u dobi od 85 godina učestalost iznosi između 30 i 40 %.

Epidemiološke studije su pokazale da su starenje, nasljeđivanje specifičnih gena te postojanje specifičnog lipoproteina ApoE4 usko povezani s povećanim rizikom od nastanka AD. Dakle, AD je bolest stanica moždane kore i okolnih struktura, a karakterizira je brza progresivnost i ireverzibilnost te oštećenje živčanih stanica. Okarakterizirana je i gubitkom neurona te nastankom senilnih plakova i neurofibrilarnih petlji. Do degeneracije dolazi u različitim neuroprijenosnim sustavima uključujući kolinergični, noradrenergični i serotoninergični. Rezultati istraživanja upućuju na poremećaj u kolinergičnoj transmisiji. Enzimi potrebni za sintezu i razgradnju acetilkolina sniženi su za 30 % u pacijenata s AD u odnosu na kontrolnu populaciju. Također, pokazalo se da je u AD smanjen broj nikotinskih receptora, kao i presinaptičkih muskarinskih receptora, dok je serotoninergični sustav značajno oštećen[6]. Na slici 1.3. je prikazan usporedni prikaz zdravih i oboljelih neurona te zdravog i oboljelog mozga.



Slika 1.3. Usporedba zdravog neurona i zdravog mozga s oboljelima od Alzheimerove bolesti[4,7,8].

1.2.1. Kolinergična hipoteza

Kolinergična skupina neurona je glavni neurotransmiterski sustav uključen u AD. Ovi neuroni održavaju kortikalnu aktivnost, protok cerebralne krvi, razvoj cerebralnog korteksa, moduliraju spoznaju, učenje, zadaće i memoriju te reguliraju ciklus spavanja i budnosti. Poremećaj kolinergičnog sustava u AD se javlja u različitim razinama, uključujući smanjenje aktivnosti kolin-acetil-transferaze, unosa kolina i sinteze acetilkolina.

Kolinergična hipoteza se temelji na pretpostavci da je AD uzrokovana poremećajem metabolizma neuroprijenosnika acetilkolina koji utječe na učenje i pamćenje. Smatra se da dolazi do deficita kolin-acetil-transferaze, enzima odgovornog za sintezu acetilkolina te da se povećanjem njegove koncentracije može utjecati na ublažavanje simptoma AD. Povišenje kolinergične neurotransmisije može se postići na više načina, uključujući povećanje sinteze acetilkolina, smanjenje hidrolize, povećanje oslobađanja iz presinaptičkih završetaka i izravna stimulacija postsinaptičkih kolinergičnih receptora. Većina današnjih lijekova su rezultat ove hipoteze[5].

1.2.2. Amiloidna hipoteza

Izvanstanični amiloidni plakovi koji se sastoje od amorfnih nakupina β-amiloid proteina i neurofibrilarni čvorovi unutar neurona koji sadrže filamente fosforiliranih oblika mikrotubularnih τ-proteina karakteriziraju AD. Navedeno se pojavljuje i u ostalim neurodegenerativnim poremećajima kao i u normalnom, zdravom mozgu, premda u manjem opsegu.

Prva karakteristika bolesti je akumulacija plakova abnormalnih β-amiloida u mozgu. Plakovi se sastoje od malih peptida, građenih od 39-43 aminokiselina nazvanih β-amiloidnim plakovima. β-amiloid je fragment većeg proteina – amiloid prekursor proteina (APP). APP je značajan u rastu neurona, preživljavanju i mehanizmima popravka nakon ozljeda. U Alzheimerovoj bolesti, nepoznati proces uzrokuje proteolizu APP-a na manje fragmente i jedan od novonastalih fragmenata formira vanstanične fibrilarne nakupine poznate i kao senilni plakovi.

Amiloidna hipoteza se temelji na pretpostavci da Aβ-peptid odnosno njegove nakupine i plakovi koji su pronađeni na mozgu oboljelih od AD utječu na zdrave neurone i uzrokuju njihovo odumiranje. Aβ-peptid nastaje cijepanjem APP-a pomoću β- i γ-sekretaza (β-sekretazni put)[9].

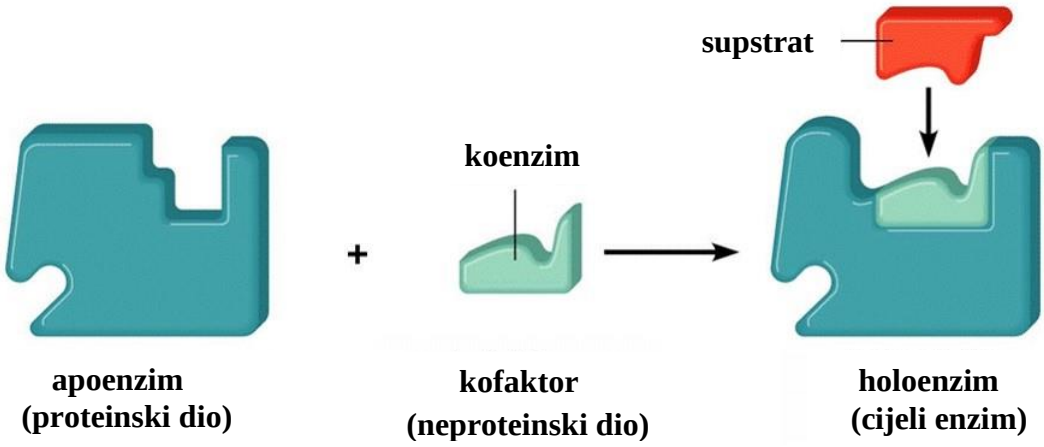
1.2.3. τ – hipoteza

Tau protein (τ-protein) obično eksprimiraju neuroni, gdje je njegova svrha stabilizacija mikrotubula. Fosforilirani protein veže mikrotubule s manjim afinitetom, što dovodi do njihove nestabilnosti. τ-hipoteza se temelji na pretpostavci da dolazi do poremećaja odnosno hiperfosforilacije τ-proteina koji se odvaja od mikrotubula i na taj način direktno dovodi do degradacije citoskeleta. Nakon toga se spaja s drugim τ-proteinima pri čemu nastaju neurofibrilarne petlje (NFP)[5].

1.3. ENZIMI

1.3.1. Osnovna svojstva enzima

Enzimi, katalizatori u živim organizmima, važni su molekularni "uređaji" koji usmjeruju kemijske pretvorbe. Također posreduju i u pretvaranju jednog oblika energije u drugi, na primjer u fotosintezi. S izuzetkom male skupine katalitičkih ribonukleinskih (RNA) molekula svi su enzimi po sastavu proteini i imaju sposobnost specifičnog vezanja različitih molekula. Posjeduju veliku katalitičku snagu, mogu povećati brzine reakcije za faktore 10^6 i više. Ubrzavaju reakcije tako da olakšaju nastanak prijelaznog stanja, ne mijenjajući ravnotežu kemijske reakcije. Zapravo, mnoge se reakcije bioloških sustava bez enzima i ne događaju zamjetnom brzinom. Katalitička aktivnost mnogih enzima ovisi o prisutnosti malih molekula nazvanih kofaktori. Enzim bez svojeg kofaktora naziva se apoenzim; dok se potpuni katalitički aktivan enzim naziva holoenzim (slika 1.4.)[10].



Slika 1.4. Prikaz strukture enzima.

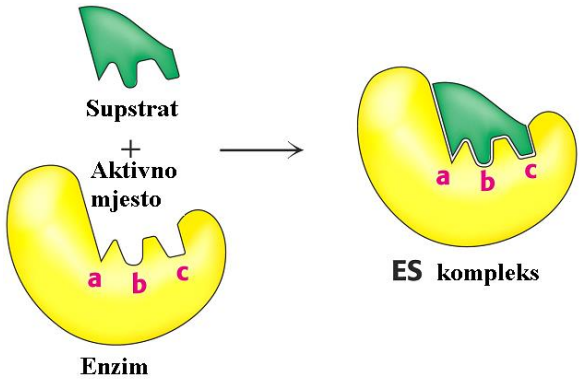
Kofaktori se mogu podijeliti na:

- metale i
- male organske molekule (koenzimi).

Kako su koenzimi često potekli od vitamina, mogu na enzim biti vezani čvrsto ili slabo. Čvrsto vezani koenzimi se zovu prostetičke skupine[10].

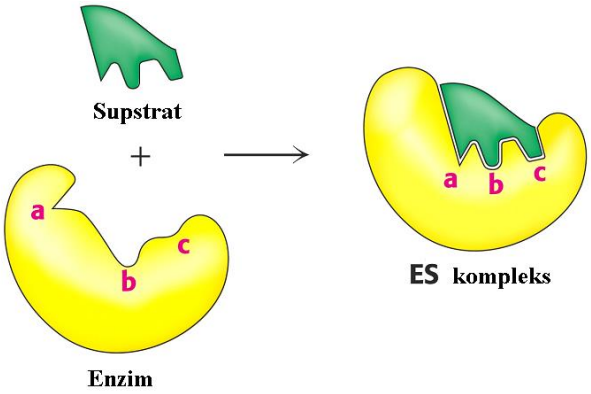
1.3.2. Princip djelovanja enzima

Prvi korak enzimske katalize je nastanak kompleksa enzim-supstrat (ES). Supstrati se vežu na specifični dio enzima nazvan aktivnim mjestom koje je definirano određenim aminokiselinama čiji bočni ogranci (nazvani ostatci od engl. *residues*) izravno sudjeluju u kidanju ili nastanku veza. Ti se ostatci nazivaju katalitičkim skupinama. Upravo je aktivno mjesto ono područje enzima koje najizravnije smanjuje energiju aktivacije, što enzimu daje svojstvo ubrzanja reakcije. Supstrati se na enzime vežu slabim interakcijama, a specifičnost vezanja ovisi o strogo definiranom rasporedu ostatka u aktivnome mjestu. Vrlo je korisna analogija ključa i brave, prikazana na slici 1.5., koju je 1890. predložio Emil Fischer. U tom je modelu aktivno mjesto nevezanog enzima komplementarno obliku supstrata[10].



Slika 1.5. Model ključa i brave za vezanje enzima i supstrata.

Aktivna mjesta nekih enzima poprimaju strukturu komplementarnu supstratu tek nakon što se supstrat veže. Taj proces dinamičkog prepoznavanja se naziva inducirano pristajanje, a model je prikazan na slici 1.6.



Slika 1.6. Model induciranog pristajanja za vezanje enzima i supstrata.

1.3.3. Nomenklatura i klasifikacija enzima

Do danas je poznato i klasificirano oko 4000 enzima. Jedan dio enzima dobio je nazive tako da im se na korijen latinskog naziva supstrata doda nastavak *–aza.* Veći dio enzima je imenovan prema vrsti reakcije koju kataliziraju, dok neki u nazivu nose i korijen supstrata i reakcije koju kataliziraju. Obzirom na veliki broj enzima bila je potrebna jedinstvena klasifikacija pa je Međunarodna unija za biokemiju 1961. godine preporučila novu nomenklaturu i klasifikaciju enzima. Po toj klasifikaciji enzimi se dijele u šest klasa (obitelji) i to prema reakcijama koje kataliziraju. Svaka klasa se dijeli na više podklasa, a svaka podklasa na više skupina i na kraju svaka skupina na više podskupina. U tablici 1.2. je prikazana podjela enzima u šest klasa.

Tablica 1.2. Klasifikacija enzima.

KLASA	NAZIV	VRSTA REAKCIJE	PRIMJERI
1	OKSIDOREDUKTAZE	oksidacija-redukcija	dehidrogenaze oksidaze
2	TRANSFERAZE	prijenos funkcionalnih skupina (metil-, acil-, amino-, fosfat-)	transaminaze kinaze
3	HIDROLAZE	hidroliza supstrata	kolinesteraze, lipaze, peptidaze
4	LIAZE	cijepanje C-C, C-O, C-N i drugih veza eliminacijom atoma uz stvaranje dvostruke veze	dekarboksilaze aldolaze
5	IZOMERAZE	unutarmolekulska preraspodjela	izomeraze mutaze
6	LIGAZE	nastajanje veza C-C, C-O, C-N, C-S uz hidrolizu ATP-a	sintetaze karboksilaze

1.3.4. Michaelis-Menten model

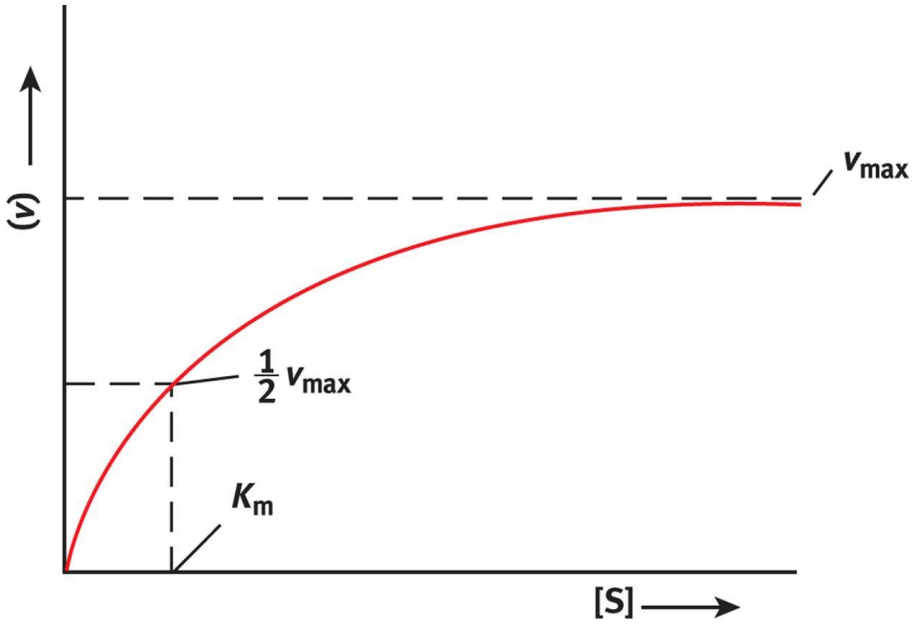
Proučavanje brzina enzimskih reakcija se naziva enzimskom kinetikom. Godine 1913. Leonor Michaelis i Maud Menten predložili su jednostavan model koji objašnjava kinetička svojstva mnogih enzima.

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\leftrightarrow}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad (1.1.)$$

Enzim E povezuje se sa supstratom S u kompleksu ES, uz konstantu brzine k_1. Kompleks ES ima dvije moguće sudbine; može se disocirati na E i S uz konstantu brzine k_{-1} ili može dati produkt P uz konstantu brzine k_2. Brzine nastanka i razgradnje ES jesu:

brzina nastanka kompleksa $ES=k_1[E][S]$, (1.2.)

brzina razgradnje kompleksa $ES=(k_{-1} + k_2)[ES]$[10,11]. (1.3.)



Slika 1.7. Kinetika tipa Michaelis-Menten[11].

Kod enzima koji podliježu kinetici Michaelis-Menten brzina se reakcije (*v)* povećanjem koncentracije supstrata [S] asimptotski približava maksimalnoj brzini (V_{max}), kao što je prikazano na slici 1.7. Maksimalna brzina reakcije postiže se kad su sva katalitička mjesta na enzimu zasićena supstratom, to jest kada je $[ES]=[E]_T$.

V_{max} otkriva obrtni broj enzima, to jest broj molekula supstrata koji molekula enzima pretvori u produkt u jedinici vremena, kad je enzim potpuno zasićen supstratom. Taj je broj jednak konstanti brzine k_2, koja se naziva i katalitičkom konstantom, $k_{cat.}$

$$V_{max} = k_2[E]_T \qquad (1.4.)$$

Sljedeći izraz predstavlja Michaelis-Menten jednadžbu:

$$\mathrm{v} = V_{max} * \frac{[S]}{[S]+K_M} \qquad (1.5.)$$

Koncentracija supstrata pri kojoj je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne brzine reakcije zove se Michaelisova konstanta (K_M). K_M nekog enzima ovisi o pojedinom supstratu te o vanjskim utjecajima kao što su pH-vrijednost, temperatura i ionska jakost[10].

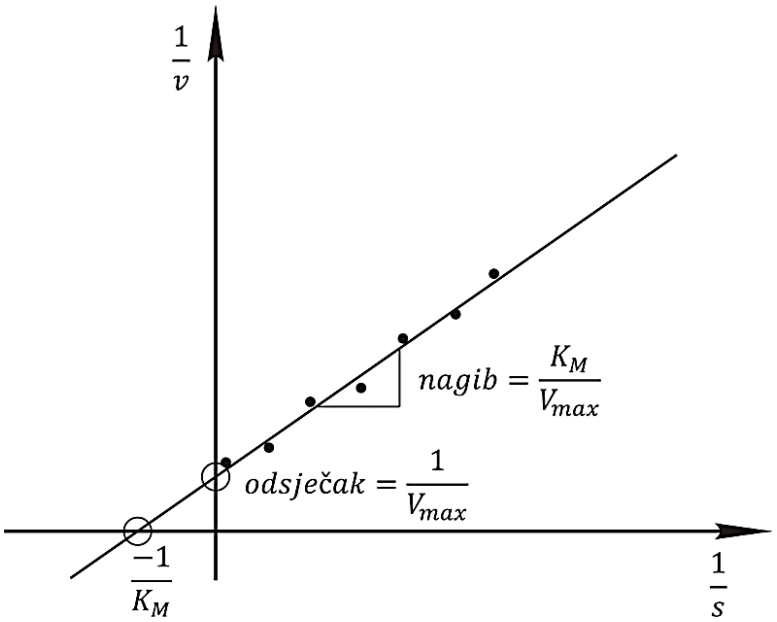
1.3.5. Linearizacije Michaelis-Menten jednadžbe

Preciznije određivanje kinetičkih parametara K_M i V_{max} moguće je ako se jednadžba Michaelis-Menten transformira u linearni oblik. Razlikujemo Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf i Eisenthal – Cornish-Bowden linearizirani prikaz[12].

- **Lineweaver-Burk ili dvostruko-recipročni prikaz**

1/*V* nanosi se kao funkcija 1/[S] i dobije se pravac sa sjecištem na ordinati $1/V_{max}$, na apscisi $-1/K_M$ te nagibom pravca K_M/V_{max} (slika 1.8.). Lineweaver-Burk linearizirani oblik Michaelis-Menten jednadžbe predstavljen je sljedećim izrazom:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}}\frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \qquad (1.6.)$$

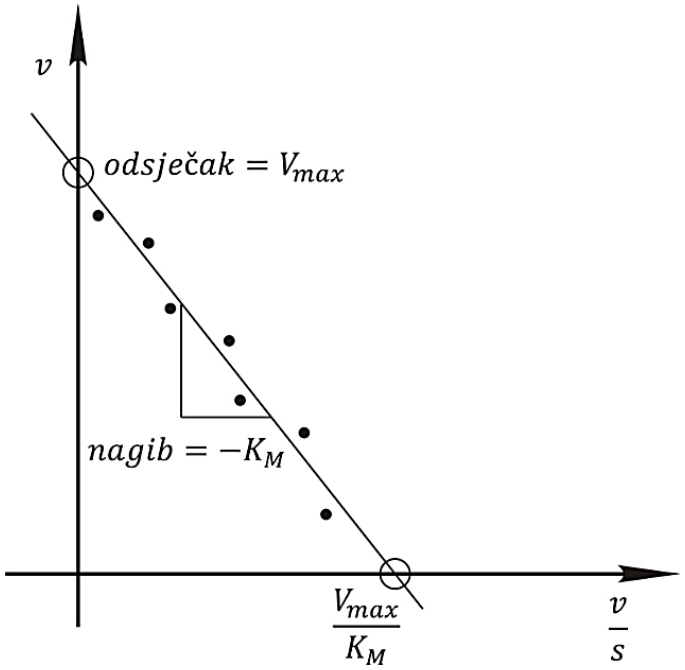


Slika 1.8. Lineweaver-Burk prikaz.

- **Eadie-Hofstee prikaz**

Na apscisu se nanosi *v*/[S], a na ordinatu *v* i dobije se pravac s nagibom -K_M (slika 1.9.). Eadie-Hofstee linearizirani oblik Michaelis-Menten jednadžbe predstavljen je sljedećim izrazom:

$$v = V_{max} - K_M * \frac{v}{s} \qquad (1.7.)$$

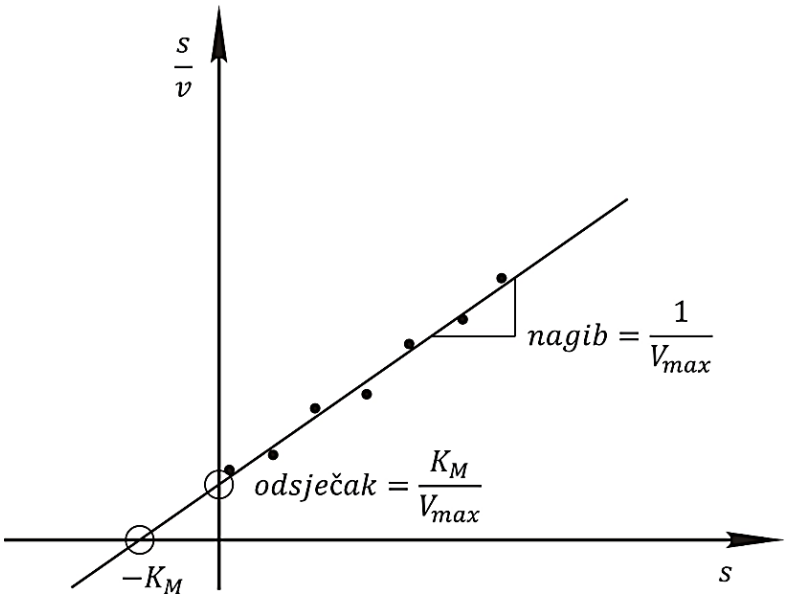


Slika 1.9. Eadie-Hofstee prikaz.

- **Hanes-Woolf prikaz**

Na apscisu se nanosi [S], a na ordinatu [S]/*v* i dobije se pravac s nagibom $1/V_{max}$ (slika 1.10.). Hanes-Woolf linearizirani oblik Michaelis-Menten jednadžbe predstavljen je sljedećim izrazom:

$$\frac{S}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{S}{V_{max}} \qquad (1.8.)$$

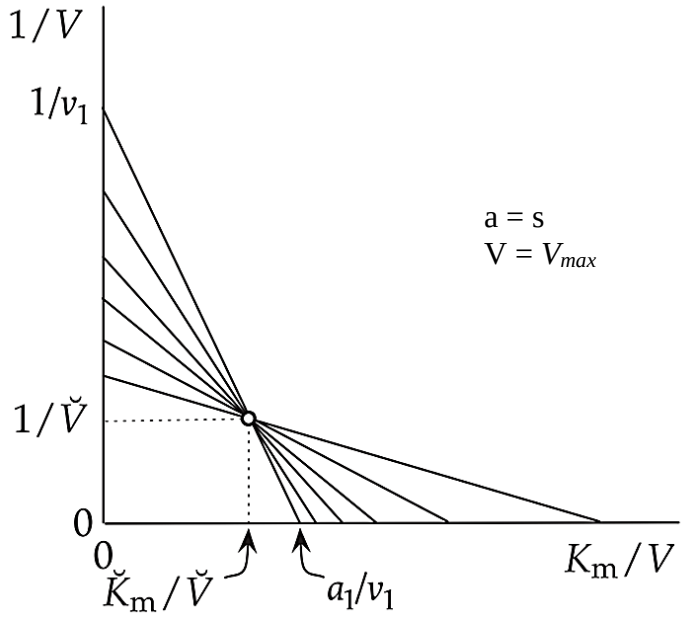


Slika 1.10. Hanes-Woolf prikaz

- **Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz**

Na apscisu (K_M/V_{max} os) se nanose [S]/*v* vrijednosti, a na ordinatu ($1/V_{max}$ os) se nanose vrijednosti 1/*v*. Za više pravaca (različite konc. supstrata) dobiju se sjecišta s koordinatnim osima koja odgovaraju vrijednostima K_M/V_{max} i $1/V_{max}$. Za razliku od Eisenthal – Cornish-Bowden grafa V_{max} prema K_M ovaj prikaz je korisniji u praksi, jer se linije sijeku pod većim kutovima i sjecišta su bolje definirana. Promatraju se samo sjecišta koja su u prvom kvadrantu. U realnom slučaju pravci se ne sijeku u jednoj točci, nego dobijemo više sjecišta[13]. Pomoću FooPlot-a odredimo presjecišta pravaca, odnosno K_M/V_{max} i $1/V_{max}$ od kojih medijan daje najbolju vrijednost K_M i V_{max}[14]. Eisenthal – Cornish-Bowden linearizirani oblik Michaelis-Menten jednadžbe predstavljen je sljedećim izrazom:

$$V_{max} = v + \frac{v}{S} * K_M \qquad (1.9.)$$



Slika 1.11. Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz[13].

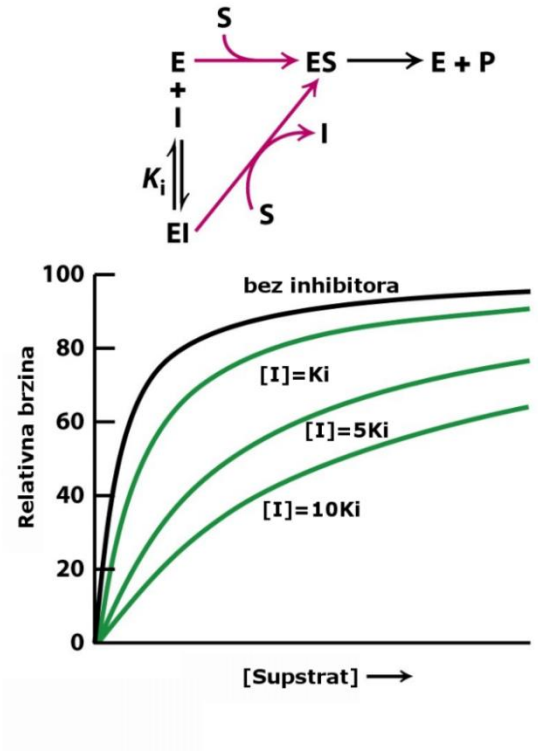
1.3.6. Inhibicija enzimske aktivnosti

Aktivnost mnogih enzima se može inhibirati vezanjem malih molekula i iona. Inhibicija, koja može biti reverzibilna i ireverzibilna je glavni kontrolni mehanizam u biološkim sustavima. Ireverzibilni inhibitor vrlo sporo disocira s ciljnog enzima, jer je na njega vrlo čvrsto kovalentno ili nekovalentno vezan. Neki ireverzibilni inhibitori vrlo su važni lijekovi, primjerice penicilin i aspirin. Enzimska aktivnost koja je inhibirana ireverzibilnim inhibitorom se ne može povratiti nikakvom fizikalnom metodom, ali ju je moguće povratiti određenim kemijskim metodama. Nasuprot tomu, reverzibilnu inhibiciju karakterizira brza disocijacija kompleksa enzim – inhibitor, a povrat enzimske aktivnosti može se ostvariti uklanjanjem inhibitora bilo kemijskim bilo fizikalnim putem. Postoje četiri glavna tipa ove inhibicije, a to su:

- kompetitivna,
- akompetitivna,
- nekompetitivna i
- miješana inhibicija.

U prisustvu inhibitora kinetički parametri koji se eksperimentalno određuju su K_M^{app} i V_{max}^{app} (app = prividni, od engl. *apparent*)[12].

Kod **kompetitivne ili konkurentske inhibicije**, enzim može vezati ili supstrat (tvoreći kompleks ES) ili inhibitor (EI), ali nikada oba (ESI). Kompetitivni se inhibitor veže na aktivno mjesto enzima, zbog čega je spriječeno vezanje supstrata na isto aktivno mjesto. On smanjuje brzinu reakcije, jer smanjuje udio molekula enzima koje vežu supstrat. Reakcijski put, prikazan na slici 1.12., pokazuje kako se dovoljno velikom koncentracijom supstrata može nadvladati kompetitivna inhibicija.

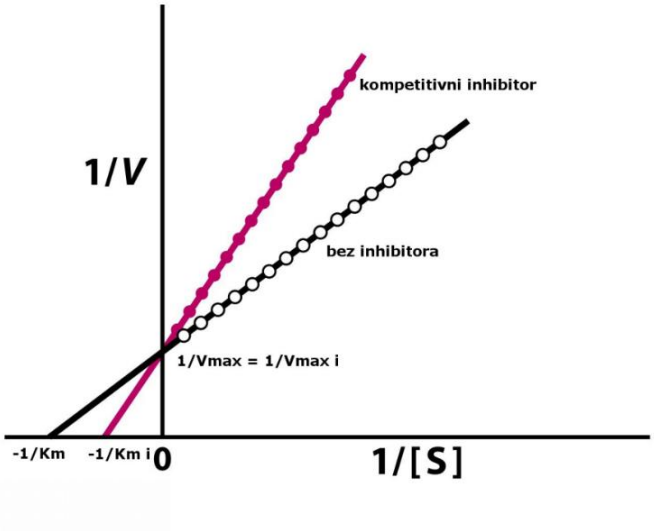


Slika 1.12. Kinetika kompetitivnog inhibitora.

Kompetitivni inhibitor ne utječe na V_{max}, ali prividno povećava K_M, što znači da je potrebno više supstrata da bi se dosegla određena brzina reakcije. Ta prividna vrijednost K_M, zvana K_M^{app}, brojčano je jednaka:

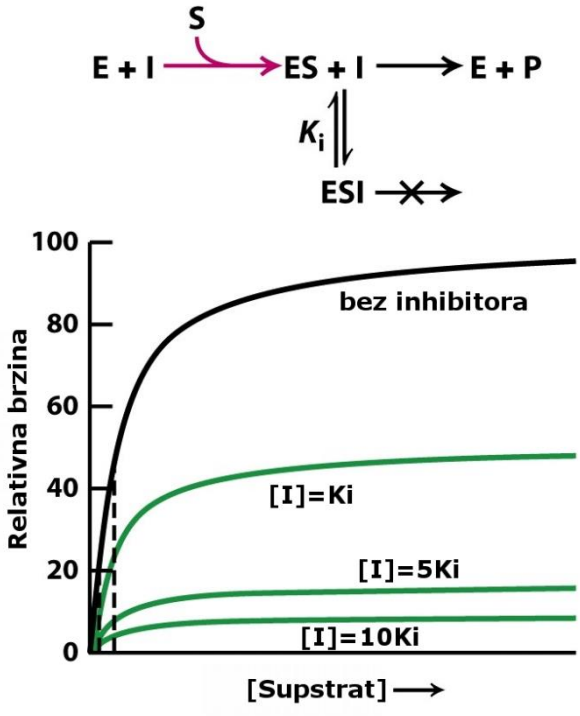
$$K_M^{app} = K_M(1 + [I]/K_I), \qquad (1.10.)$$

gdje je $[I]$ koncentracija inhibitora, a K_I konstanta disocijacije kompleksa enzim-inhibitor.



Slika 1.13. Lineweaver-Burk prikaz kompetitivne inhibicije.

Kod **akompetitivne inhibicije** inhibitor se veže samo na kompleks enzim-supstrat. Vezno mjesto za akompetitivni inhibitor se formira tek nakon interakcije enzima i supstrata. Ova inhibicija se ne može nadvladati povećanjem koncentracije supstrata. Reakcijski put akompetitivne inhibicije prikazan je na slici 1.14.



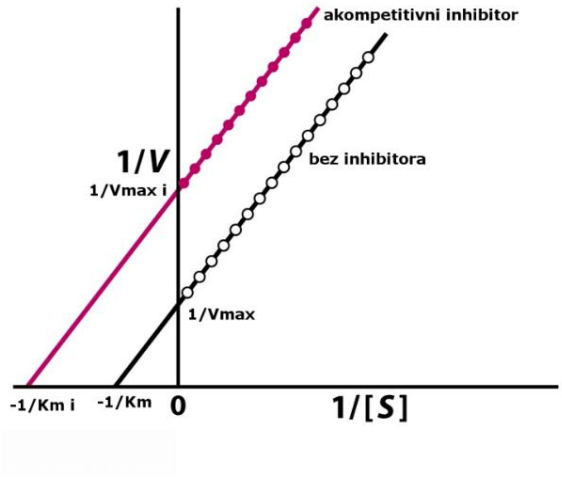
Slika 1.14. Kinetika akompetitivnog inhibitora.

Na slici 1.15. je prikazano kako su u prisutnosti akompetitivnog inhibitora V_{max} i K_M podjednako smanjeni. Prividni K_M i V_{max} iznose:

$$K'_M = K_M^{app} = \frac{K_M}{\alpha'} = \frac{K_M}{1+\frac{[I]}{K'_I}} \qquad (1.11.)$$

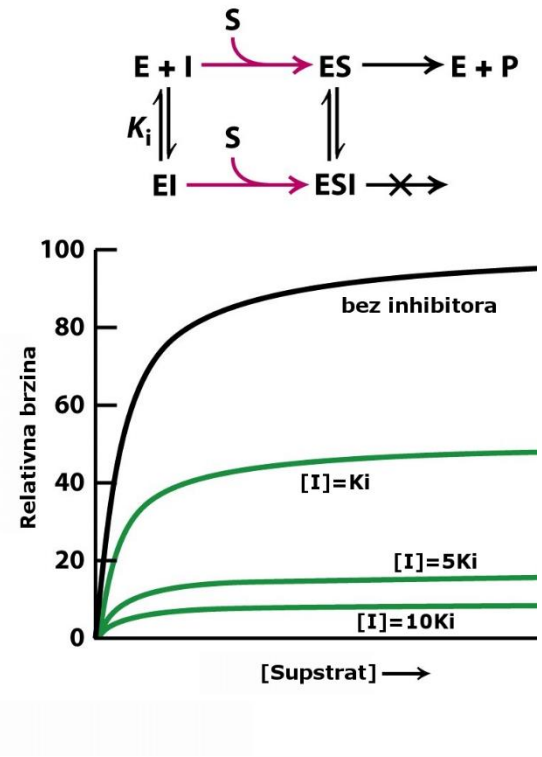
$$V'_{max} = V_{max}^{app} = \frac{V_{max}}{\alpha'} = \frac{V_{max}}{1+\frac{[I]}{K'_I}}, \qquad (1.12.)$$

gdje je K'_I je konstanta nastajanja kompleksa ESI, a α' faktor za koji se smanjuju K_M i V_{max}.



Slika 1.15. Lineweaver-Burk prikaz akompetitivne inhibicije.

Pri **nekompetitivnoj inhibiciji**, inhibitor i supstrat se mogu istodobno vezati na različita vezna mjesta. No, kompleks enzim-inhibitor-supstrat ne može dati produkt. Poput akompetitivne, ni nekompetitivna se inhibicija ne može nadvladati povećanjem koncentracije supstrata. Mehanizam inhibicije prikazan je na slici 1.16.



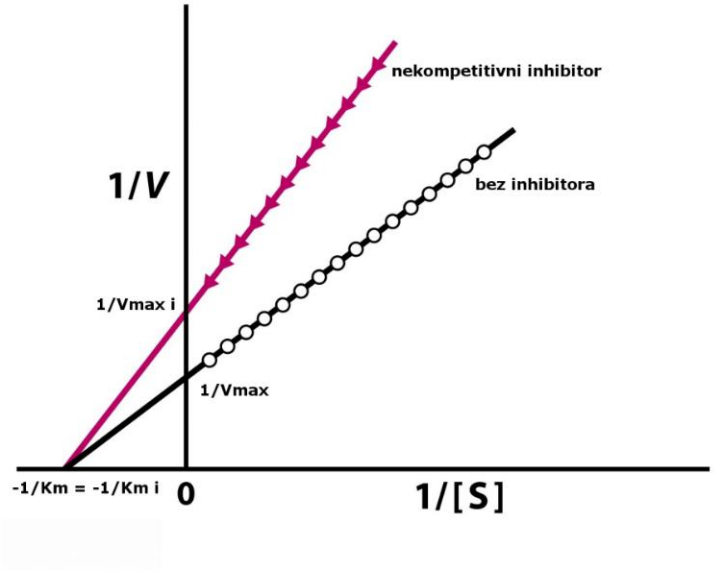
Slika 1.16. Kinetika nekompetitivnog inhibitora.

Nekompetitivni inhibitor djeluje tako što smanjuje obrtni broj enzima, V_{max}, na novu vrijednost V_{max}^{app}, ali pri tome ne smanjuje broj molekula enzima koje mogu vezati supstrat. K_M ostaje nepromijenjen (slika 1.17.). Inhibitor jednostavno smanjuje koncentraciju funkcionalnog enzima.

Prividni V_{max} iznosi:

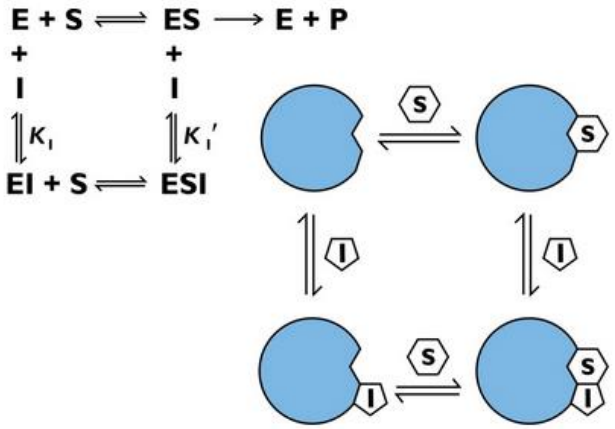
$$V'_{max} = V_{max}^{app} = \frac{V_{max}}{\alpha} = \frac{V_{max}}{1+\frac{[I]}{K_I}} , \qquad (1.13.)$$

gdje je α faktor za koji se smanjuje V_{max}, a K_I konstanta nastajanja kompleksa EI.



Slika 1.17. Lineweaver-Burk prikaz nekompetitivne inhibicije.

Kod **miješane inhibicije** inhibitor se može vezati na enzim pri čemu nastaje kompleks enzim-inhibitor (EI). Isto tako, može se vezati i na kompleks enzim-supstrat u takozvano drugo aktivno mjesto pri čemu nastaje kompleks enzim-supstrat-inhibitor (ESI). Mehanizam inhibicije prikazan je na slici 1.18.



Slika 1.18. Mehanizam miješane inhibicije.

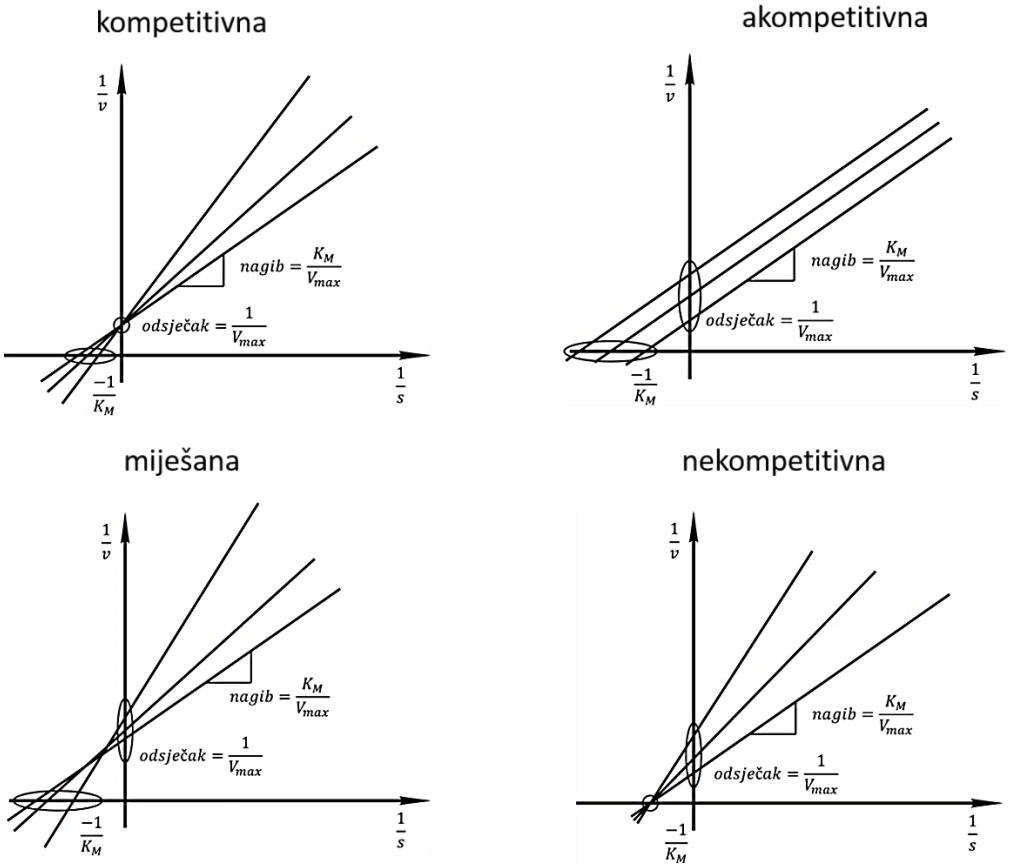
Inhibitor otežava vezanje supstrata pa se povećava K_M, a V_{max} se smanjuje. Prividni V_{max} i K_M iznose:

$$V'_{max} = V_{max}^{app} = \frac{V_{max}}{\alpha'} = \frac{V_{max}}{1+\frac{[I]}{K'_I}} \qquad (1.14.)$$

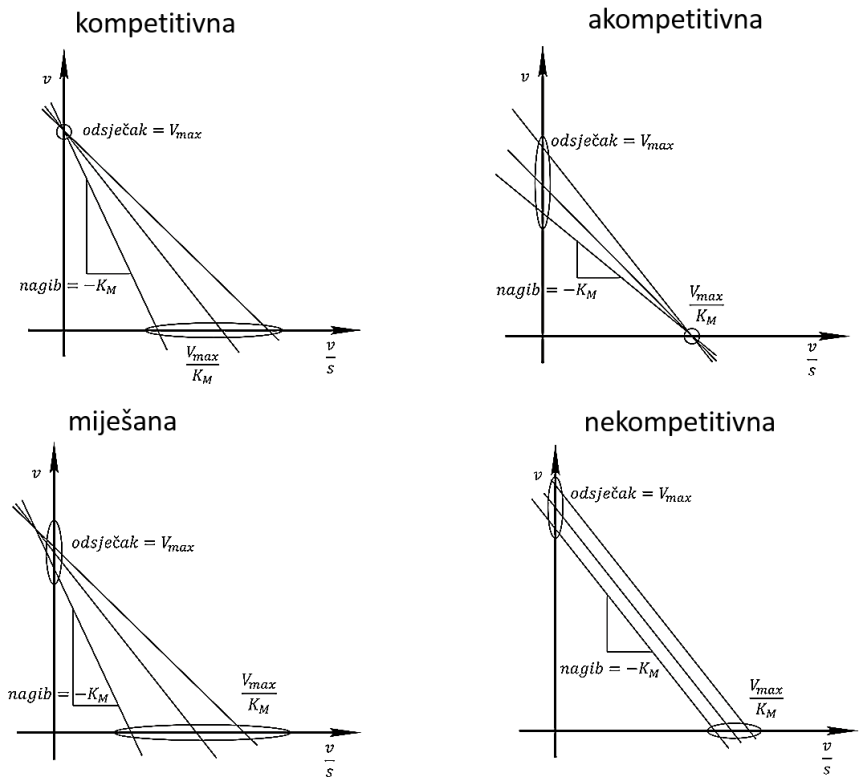
$$K'_M = K_M^{app} = \frac{\alpha K_M}{\alpha'} = \frac{\left(1+\frac{[I]}{K_I}\right)K_M}{1+\frac{[I]}{K'_I}}, \qquad (1.15.)$$

gdje je α faktor za koji se smanjuje V_{max}, K_I konstanta nastajanja kompleksa EI, K'_I je konstanta nastajanja kompleksa ESI, a α' faktor za koji se smanjuju K_M i V_{max}[10,12].

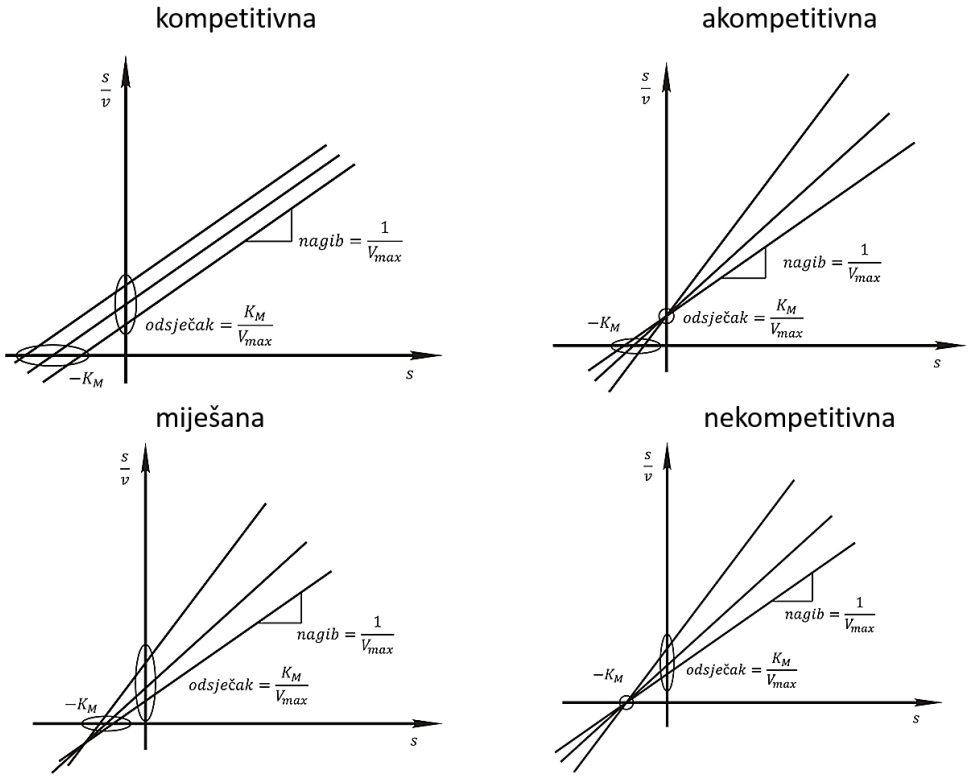
Na slikama 1.19.-1.22. prikazan je način određivanja vrste inhibicije iz Lineweaver-Burk, Eadie–Hofstee, Hanes–Woolf i Eisenthal – Cornish-Bowden prikaza. Za različite koncentracije inhibitora određuje se skup sjecišta s koordinatama te se ovisno o načinu "kretanja" tih sjecišta (porastom koncentracije inhibitora) određuje vrsta inhibicije[12].



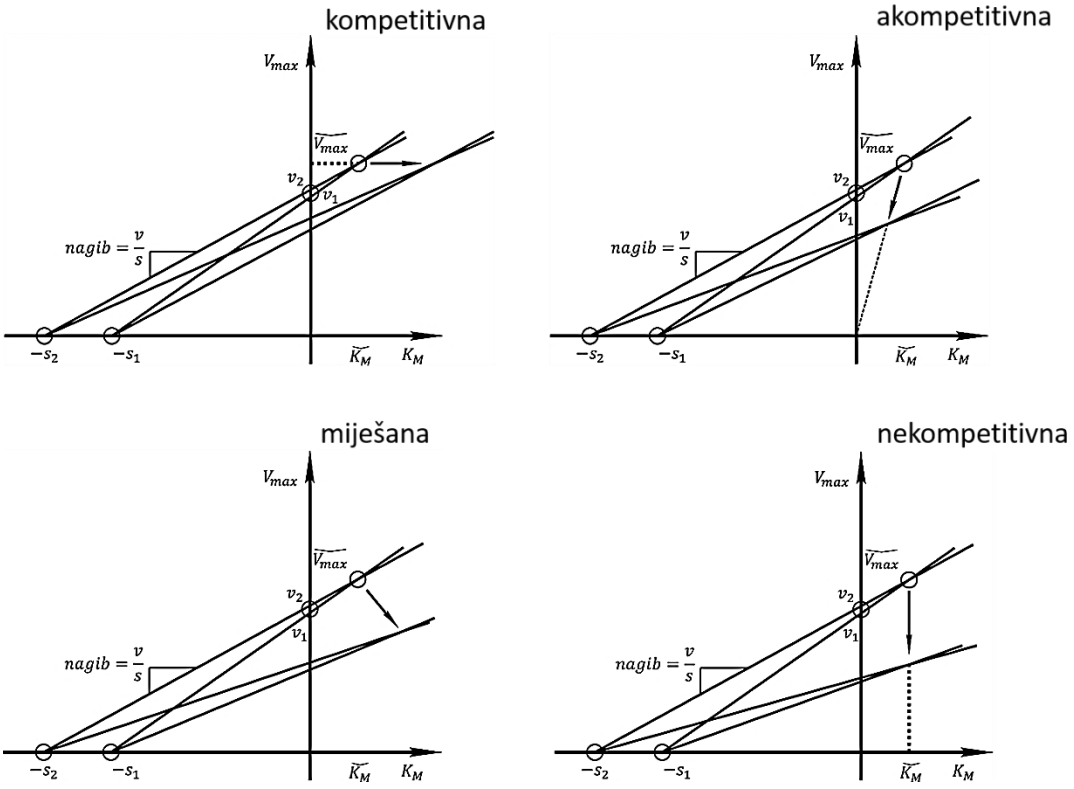
Slika 1.19. Lineweaver-Burke prikaz različitih vrsta inhibicija.



Slika 1.20. Eadie-Hofstee prikaz različitih vrsta inhibicija.



Slika 1.21. Hanes-Woolf prikaz različitih vrsta inhibicija.

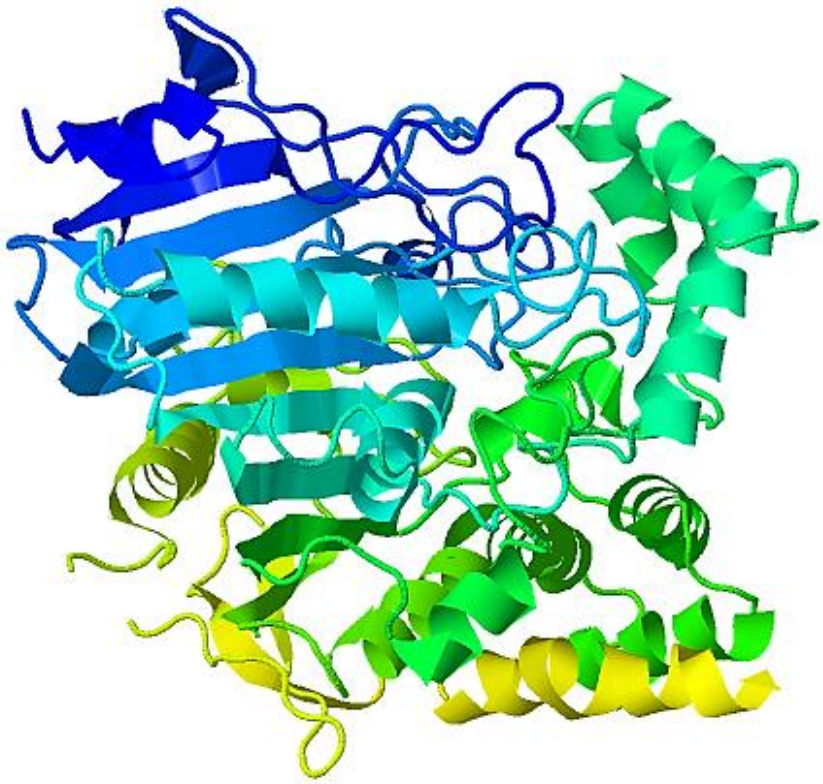


Slika 1.22. Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz različitih vrsta inhibicija[15].

1.4. KOLINESTERAZE I INHIBICIJA

1.4.1. Struktura i mehanizam djelovanja acetilkolinesteraze

Kolinesteraze se prema enzimskoj nomenklaturi ubrajaju u skupinu hidrolaza, podskupinu esteraza i potpodskupinu hidrolaza estera karboksilnih kiselina. Acetilkolinesteraza (engl. *acetylcholinesterase*, AChE, klasifikacijska oznaka E.C. 3.1.1.7) tzv. "prava kolinesteraza" je složen protein čiju osnovnu strukturu čini 12 *β*-nabranih ploča okruženih s 14 *α*-uzvojnica što je klasificira u skupinu hidrolaza *α*/*β*-strukture. Dokazano je da je kristalna struktura ljudske AChE visoko homologna strukturi AChE iz enzima električne jegulje (*Electrophorus electricus* L.). Prostor interakcije sa supstratima, ali i s drugim ligandima, kod ljudske AChE precizno je određen s 14 aromatskih aminokiselina raspoređenih kroz aktivno mjesto enzima. U svojoj strukturi ljudska AChE ima tri *N*-glikozilacijska mjesta Asn-X-Ser/Thr[16].



Slika 1.23. 3D-struktura acetilkolinesteraze (PDB-2ACE)[17].

Aktivno mjesto enzima je 20 Å dugačko i oko 5 Å široko ždrijelo, a čine ga četiri domene:

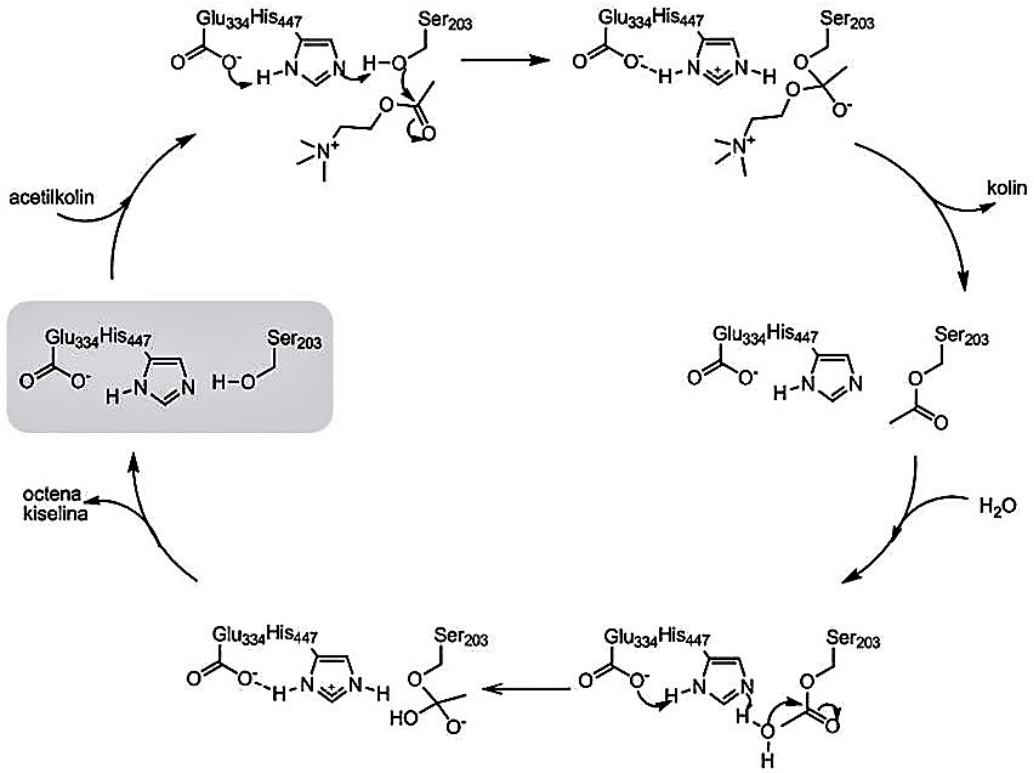
a) katalitičko mjesto (katalitička trijada Ser-His-Glu s oksianionskom šupljinom),

b) kolinsko mjesto (kation-π mjesto važno za stabilizaciju pozitivno nabijenoga kvarternog dijela kolinskih supstrata),

c) acilni džep odgovoran za vezanje acilnog dijela ACh i

d) periferno mjesto koje je smješteno na rubu ždrijela (odgovorno za alosterički mehanizam inhibicije AChE pri visokim koncentracijama ACh).

AChE je jedan od najučinkovitijih enzima u prirodi, zaslužan za izuzetno brz prijenos živčanih impulsa jer vrlo učinkovito hidrolizira neuroprijenosnik acetilkolin. Mehanizam hidrolize kolinesterazama se odvija u tri koraka koji obuhvaćaju nastajanje Michaelisovog kompleksa, aciliranje enzima i njegovo deaciliranje vodom. Zadnja dva procesa uključuju tetraedarsko prijelazno stanje kojeg čine aktivni serin i supstrat. Ključnu ulogu ima stvaranje međuprodukta u kojemu se acilna skupina sa supstrata prenosi na serinski ostatak enzima[16].

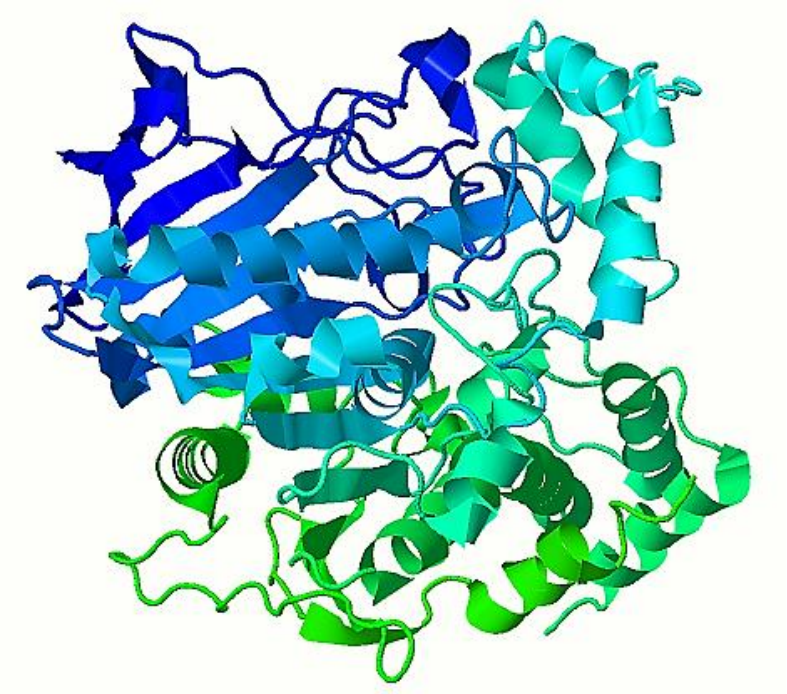


Slika 1.24. Reakcijski stupnjevi u hidrolizi acetilkolina kataliziranog kolinesterazama. Broj aminokiselina odnosi se na položaj aminokiseline u ljudskoj AChE[16].

1.4.2. Struktura i mehanizam djelovanja butirilkolinesteraze

Butirilkolinesteraza (engl. *butyrylcholinesterase*, BuChE, klasifikacijska oznaka E.C. 3.1.1.8) tzv. "pseudokolinesteraza" je složen enzim slične strukture i mehanizma djelovanja kao kod acetilkolinesteraze. Kristalna struktura ljudske BuChE određena je desetak godina kasnije od kristalne strukture AChE, a razlog tomu je veliki broj glikozilacijskih mjesta koja joj omogućuju dugotrajnu stabilnost u plazmi gdje je njezina aktivnost i najizraženija. Razlika je u tome što umjesto 14 aromatskih aminokiselina koje se nalaze unutar aktivnog mjesta AChE, kod BuChE je njih 6 zamijenjeno alifatskim aminokiselinama što volumen aktivnog mjesta BuChE čini većim za oko 200 Å u odnosu na aktivno mjesto AChE. Iako postoje razlike u sastavu aminokiselina mehanizam hidrolize supstrata je jednak.

Aktivno mjesto je, slično kao i kod AChE, u obliku ždrijela dubokog oko 20 Å. Uloga perifernog mjesta, smještenog na ulazu u ždrijelo, dodijeljena je Asp70, za kojeg se pokazalo da je važan za aktivaciju/inhibiciju BuChE te Tyr332. Kolinsko mjesto BuChE nije specifično za pozitivno nabijene ligande, već taj enzim može hidrolizirati i neutralne pa čak i neke negativno nabijene ligande. Acilni džep kod BuChE sadržava leucin i valin koji omogućavaju hidrolizu većih supstrata kao što je butirilkolin (BuCh)[16].



Slika 1.25. 3D-struktura butirilkolinesteraze (PDB-1P0I)[18].

1.4.3. Usporedba acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze

Acetilkolinesteraza (AChE; E.C. 3.1.1.7) i butirilkolinesteraza (BuChE; E.C. 3.1.1.8) enzimi su koji se zbog svoje uloge u organizmu intenzivno istražuju unutar područja biomedicine i toksikologije. AChE se sintetizira u koštanoj srži, mozgu i mišićima, a osim u živčanim stanicama, mišićima i mozgu nalazi se i u krvi gdje je vezana na eritrocite. BuChE je u višoj koncentraciji prisutna u centralnom i perifernom živčanom sustavu, cerebrospinalnoj tekućini te crijevima, plućima, gušterači i jetri[16].

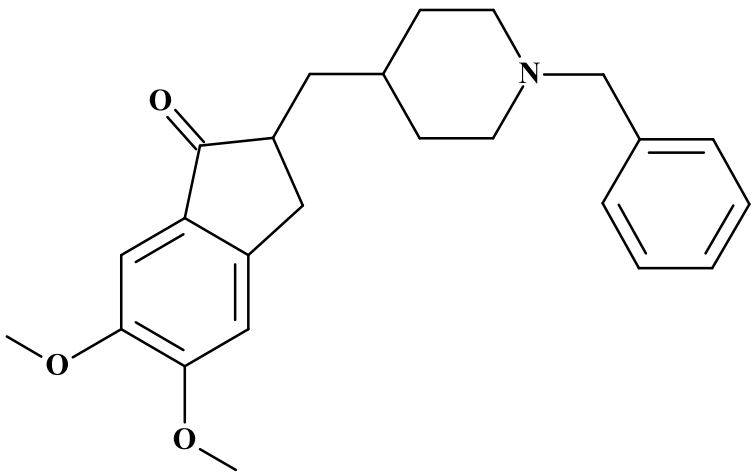
Iako strukturno homologni, ovi enzimi razlikuju se prema katalitičkoj aktivnosti, odnosno specifičnosti prema supstratima koje mogu hidrolizirati te selektivnosti za vezanje mnogih liganada. Acetilkolinesteraza je enzim visoko specifičan za hidrolizu acetilkolina i ne može hidrolizirati supstrate veće od propionilkolina, za razliku od BuChE koja hidrolizira puno širi spektar estera (propionil(tio)kolin, benzoil(tio)kolin i dr.) uključujući i voluminozne neutralne estere (heroin, kokain, prokain i dr.) pa čak i neke negativno nabijene estere (aspirin), i to brzinama bliskima brzini hidrolize butirilkolina, za čiju je razgradnju specifična. Razlika između ovih kolinesteraza je i ta što uz suvišak ACh dolazi do inhibicije AChE dok kod BuChE dolazi do aktivacije[4,16].

1.4.4. Inhibitori kolinesteraza u liječenju Alzheimerove bolesti

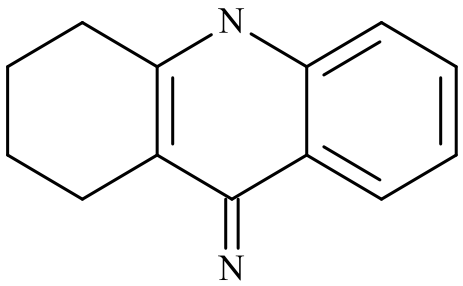
Raspodjela AChE i BuChE u zdravom mozgu iznosi 80:20 % dok se u mozgu pacijenata oboljelih od AD omjer mijenja od 1:1 pa čak i do 1:11 (11 puta više BuChE), u odmaklim fazama AD[12]. Boljim omjerom inhibicije AChE i BuChE mogla bi se postići veća efikasnost u tretmanu bolesti. Povijest inhibitora kolinesteraza počinje i prije otkrića ovih enzima. Naime, učinak mnogih biljaka koje su se rabile u tradicionalnim obredima afričkih plemena kod dokazivanja krivnje osuđenicima, ali i biljaka koje se još i danas rabe u tradicionalnoj kineskoj medicini, temelji se na spojevima koji inhibiraju AChE. Kako je kasnije otkriveno, inhibicija kolinesteraza postiže se vezanjem spojeva nekovalentnim interakcijama (reverzibilna inhibicija) ili kovalentnim vezanjem za serin katalitičke trijade (ireverzibilna ili progresivna inhibicija).

Mnogi reverzibilni inhibitori su prirodnog podrijetla i izolirani su iz biljaka, na primjer alkaloidi i flavonodi. Najuspješniji pristup liječenju odnosno ublažavanju simptoma Alzheimera, barem za sada, koji je proizašao iz kolinergične hipoteze, predstavljaju inhibitori kolinesteraza. U kliničkoj upotrebi su sintetski reverzibilni inhibitori AChE donepezil (Aricept®) i takrin (Cognex®), prikazani na slici 1.26. Reverzibilni inhibitori vežu se u aktivno, periferno ili istodobno na oba mjesta enzima. Takrin je bio prvi dostupni, akridinski baziran spoj, za tretiranje AD, no njegova primjena je danas ograničena zbog toksičnosti za jetru. Donepezil je piperidinski visokoselektivni inhibitor AChE sa zanemarivim utjecajem na BuChE. Umjereno poboljšava kognitivne funkcije u pacijenata s blagom ili umjerenom AD i nije hepatotoksičan kao takrin.

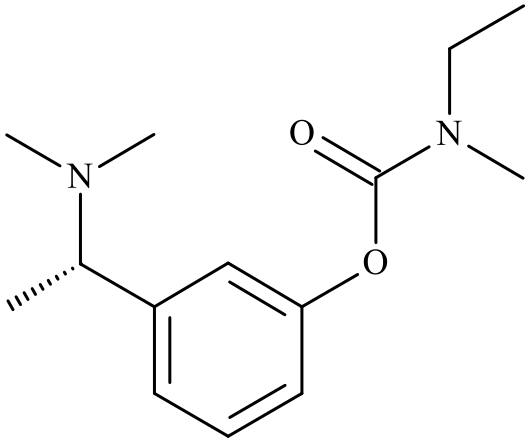
Da bi neki kolinesterazni inhibitor bio ireverzibilan, on u aktivnome mjestu enzima mora formirati Michaelisov tip kompleksa s katalitičkim serinom, zatim se inhibitor kovalentno veže za serin, pri čemu se prijelazno stanje stabilizira interakcijama s aminokiselinama u oksianionskoj šupljini. Prvi poznati inhibitor kolinesteraza, karbamat fizostigmin, izoliran iz sjemenki biljke kalbarski grah (*Physostigma venenosum* Balf.) rabi se u terapiji Alzheimerove bolesti, a dugo se uspješno rabio i za liječenje glaukoma. Osim prirodnog karbamata fizostigmina brojni sintetički karbamati imaju primjenu kao lijekovi, na primjer rivastigmin (Exelon®), čija je struktura također prikazana na slici 1.26. Tijekom kliničkih studija ovog lijeka zapaženo je poboljšanje spoznajnih funkcija i sposobnosti uz očuvanje dnevnih aktivnosti u osoba oboljelih od AD[4,16].



donepezil



takrin



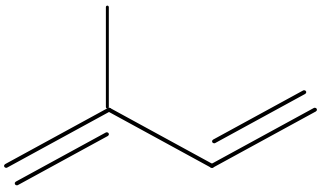
rivastigmin

Slika 1.26. Prikaz strukture donepezila, takrina i rivastigmina.

1.5. (-)-*β*-ELEMEN

Biljke i biljni pripravci se od davnina koriste za ublažavanje različitih bolesti i tegoba te predstavljaju vrlo važan izvor bioaktivnih spojeva. Istraživanja su pokazala da spojevi iz pojedinih biljaka posjeduju sposobnost inhibicije enzima AChE, tako da bi se mogle primjenjivati za tretiranje AD. Zbog specifičnosti aktivnog mjesta AChE i BuChE, njihova inhibicija istim spojem može se značajno razlikovati. U ovom radu se ispitivala sposobnost inhibicije kolinesteraza koristeći (-)-*β*-elemen kao inhibitor.

Elemen, molekulske formule $C_{15}H_{24}$, pripada klasi organskih spojeva koji se zovu terpenski spojevi odnosno podklasi seskviterpena. Terpenski spojevi (*sin.* terpenoidi, izoprenoidi) ili, kraće, terpeni su široko rasprostranjena grupa biljnih produkata. To su spojevi nastali kondenzacijom izoprenskih molekula. Izopren, odnosno 2-metilbut-1,3-dien, je spoj sastavljen od 5 ugljikovih atoma:

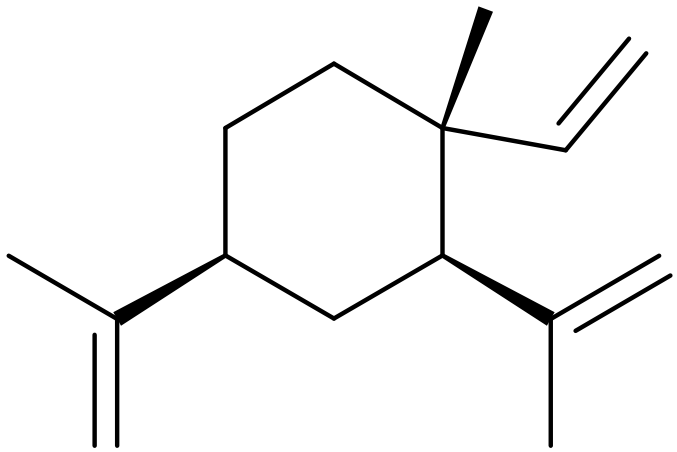


Slika 1.27. Struktura izoprena.

Tablica 1.3. Podjela terpena prema broju izoprenskih jedinica[4].

VRSTA	BROJ C ATOMA	BROJ IZOPRENSKIH JEDINICA
semiterpeni	5	1
monoterpeni	10	2
seskviterpeni	**15**	**3**
diterpeni	20	4
triterpeni	30	6
tetraterpeni	40	8
politerpeni	5n	n

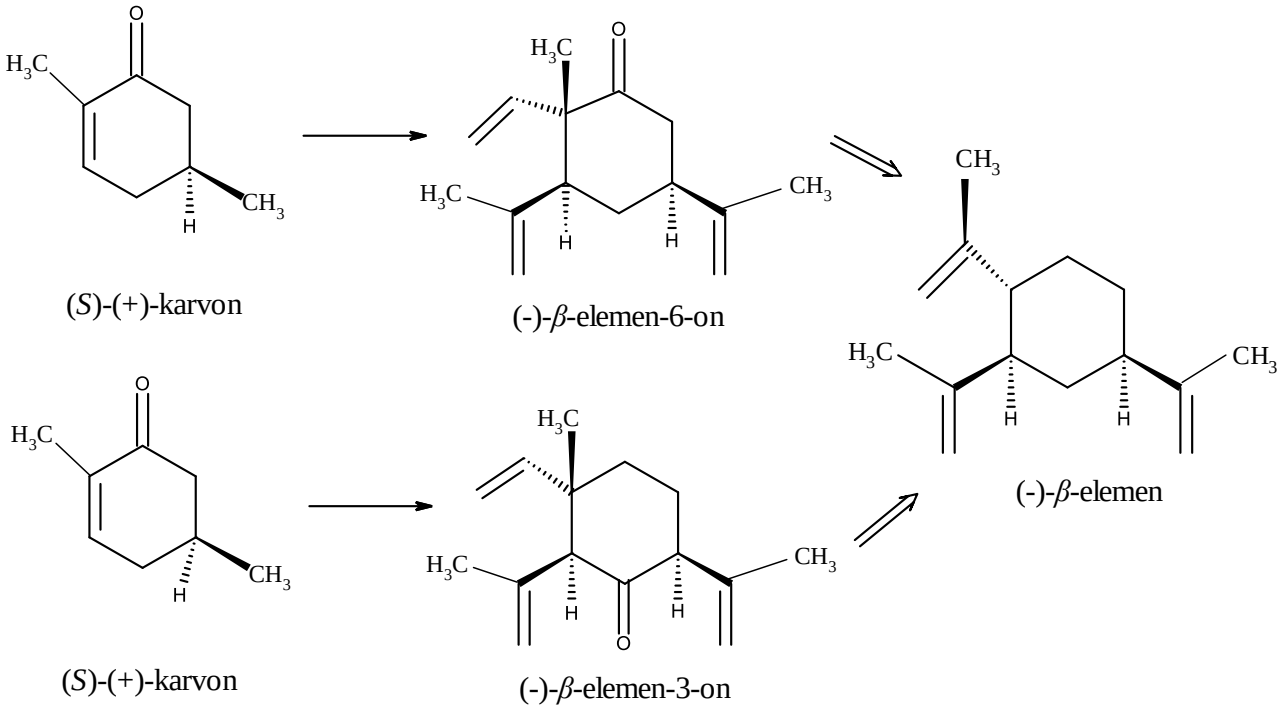
Seskviterpeni su značajni sastojci eteričnih ulja. Sastoje se iz tri izoprenske jedinice, a biogenetski nastaju iz farnezil-pirofosfata koji može izomerizirati u odgovarajući alilni izomer, nerolidil-pirofosfat, što doprinosi strukturnoj raznolikosti seksviterpena. Dijele se na acikličke i cikličke (monocikličke, bicikličke, tricikličke). Najpoznatiji primjeri acikličkih seskviterpena su farnezol i nerolidol. Od monocikličkih seskviterpena jedan od najpoznatijih spojeva je upravo *β*-elemen. IUPAC (eng. *International Union for Pure and Applied Chemistry*) naziv mu je: (1*S*,2*S*,4*R*)-1-etenil-1-metill-2,4-bis(prop-1-en-2-il)cikloheksan, a strukturna formula ovog spoja je prikazana na slici 1.28.



Slika 1.28. Struktura (-)-*β*-elemena.

Nalazi se u mnogim biljkama i začinima. Sastavni je dio eteričnog ulja iđirota (*Acorus calamus* L.), damašćanske crnjike (*Nigella damascena* L.), javanske citronele (*Cymbopogon winterianus*), etiopske kadulje (*Salvia aethiopis* L.), crnog papra (*Piper nigrum* L.), može se izolirati iz lišća limuna (*Citrus limon* L.) i mnogih drugih biljnih vrsta[4,19].

Brojne studije su pokazale da *β*-elemen posjeduje antiviralnu, antimikrobnu i posebno antikancerogenu aktivnost. Sinteza (-)-*β*-elemena iz (*S*)-(+)-karvona prikazana je na slici 1.29.



Slika 1.29. Sinteza (-)-*β*-elemena iz (*S*)-(+)-karvona[19].

Elemen izoliran iz ekstrakta tradicionalne kineske biljke *Rhizoma zedoariae* je odobren u Kini od strane kineske agencije za hranu i lijekove (engl. *China state Food and Drug Administration*) kao antineoplastični lijek te se koristi u liječenju malignih tumora. Iako mehanizam djelovanja nije u potpunosti razjašnjen, pretpostavlja se da pojačava citotoksičnost cisplatina u liječenju raka pluća, glioblastoma i drugih tumora[20]. Cisplatin je citostatik sa širokim spektrom djelovanja koji se koristi u tretmanu tumora glave, vrata, pluća i gastrointestinalnog trakta[21]. Zajednički učinak ovih spojeva je povećanje oslobađanja citokroma C iz mitohondrija u citoplazmu te proteolitičkih enzima kaspaza koji reguliraju apoptozu. Istraživanja ukazuju na to da apoptoza (programirana smrt stanice kao odgovor na patološka oštećenja stanice i fiziološke podražaje) ima ključnu ulogu u borbi protiv raka. Dovoljna je jedna molekula ili metabolički put koji bi ciljano usmjerili apoptozu na maligne stanice, a pretpostavlja se da upravo *β*-elemen stvara okidač za apoptozu[20,22]. Zaustavljanje staničnog ciklusa (prijenos iz G_0/G_1 faze u S fazu) i nekroze (odumiranje stanica u živim tkivima uzrokovano vanjskim čimbenicima) su mogući mehanizmi zaslužni za antikancerogeni učinak *β*-elemena[22].

Lijekovi koji se žele koristiti za tretiranje bolesti središnjeg živčanog sustava trebali bi neometano prolaziti krvno-moždanu barijeru. Krvno-moždana barijera je specijalizirana struktura koja omogućava neometan i učinkovit rad neurona i održavanje homeostaze u mozgu, a sastoji se od fizičke barijere i sustava transportnih mehanizama. Barijeru sačinjavaju endotelne stanice koje su zadužene za kontrolu prolaska različitih metabolita i drugih kemijskih tvari iz i u krvotok, grušanje krvi, upalne procese, vazodilataciju i vazokonstrikciju itd. Međutim, Alzheimerova bolest može razoriti krvno-moždanu barijeru i na taj način izazvati dodatno pogoršanje[23]. Kako bi lijekovi male molekulske mase mogli proći kroz barijeru u značajnijoj količini moraju biti vrlo lipofilni i ne smiju imati masu veću od 403,20 g/mol[4]. β-elemen, s masom od 204,35 g/mol, ima upravo ta svojstva.

1.6. METODE ODREĐIVANJA INHIBICIJSKE SPOSOBNOSTI

Određivanje sposobnosti inhibicije kolinesteraza može se izvoditi *in vivo* i *in vitro*. Kod *in vivo* ispitivanja obično se radi o model organizmima (ribe, miševi, štakori), a kod *in vitro* ispitivanja koristi se komercijalno pribavljeni enzim ("gotovi" liofilizirani proizvod) ili se izolira iz krvi i tkiva raznolikih organizama. Uglavnom se radi o spektrofotometrijskim metodama[4].

1.6.1. Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je metoda koja mjeri apsorpciju emitiranog elektromagnetskog zračenja do koje dolazi kada se određeni uzorak podvrgne samom zračenju. U tablici 1.4. se nalaze nazivi i simboli, s pripadajućim definicijama, koji se primjenjuju u apsorpcijskim mjerenjima.

Tablica 1.4. Nazivlje i simboli u apsorpcijskim mjerenjima.

NAZIV I SIMBOL	DEFINICIJA
Snaga zračenja P, P_0	energija zračenja (u ergima) koja u 1 s pada na 1 cm^2 površine detektora
Transmitacija T	dio upadnog zračenja koji je prošao kroz otopinu: $T = \frac{P}{P_0}$ P_0 - ulazna snaga snopa svijetlosti, P - snaga snopa svijetlosti nakon apsorpcije
Apsorbancija A	logaritam odnosa zračenja koji je prošao kroz otopinu (P_0) i upadnog zračenja (P): $A = \log\frac{P_0}{P}$
Duljina puta zračenja b	
Apsorptivnost a^*	$a = \frac{A}{b * c}$ c – koncentracija apsorbirajuće vrste
Molarna apsorptivnost ε^{**}	$\varepsilon = \frac{A}{b * c}$

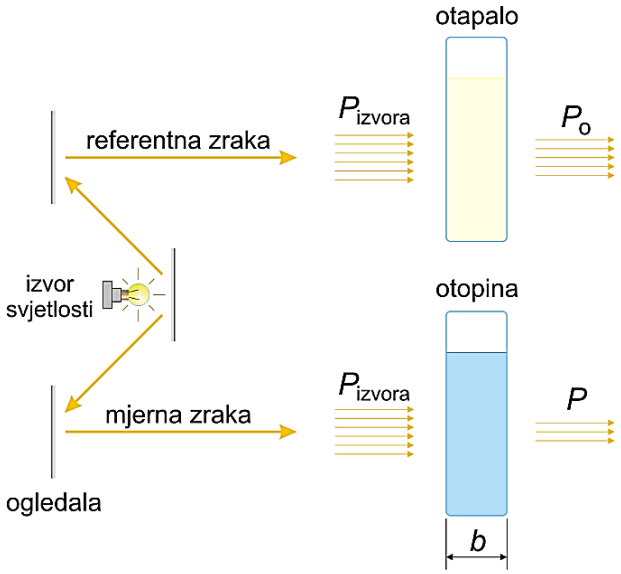
*b se izražava u cm; c se izražava u g/L

**b se izražava u cm; c se izražava u mol/L

Funkcijski odnos između veličine mjerene apsorpcijskom metodom i one koja se određuje (koncentracija *c*) poznat je kao Beerov zakon:

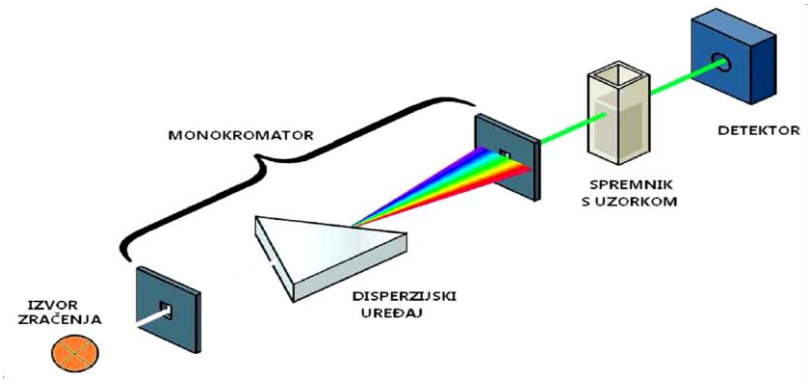
$$A = \log\frac{P_0}{P} = a * b * c \qquad (1.16.)$$

Na slici 1.30. prikazan je snop paralelnog zračenja prije i nakon prolaska kroz sloj otopine debljine *b* i koncentracije *c* vrste koja apsorbira. Posljedica međudjelovanja fotona i čestica koje apsorbiraju jest smanjenje snage snopa s P_0 na P [24].



Slika 1.30. Prigušivanje snopa zračenja kao rezultat apsorpcije u otopini[25].

Uređaj za mjerenje apsorbancije naziva se spektrofotometar. Shematski prikaz spektrofotometra prikazan je na slici 1.31[24].

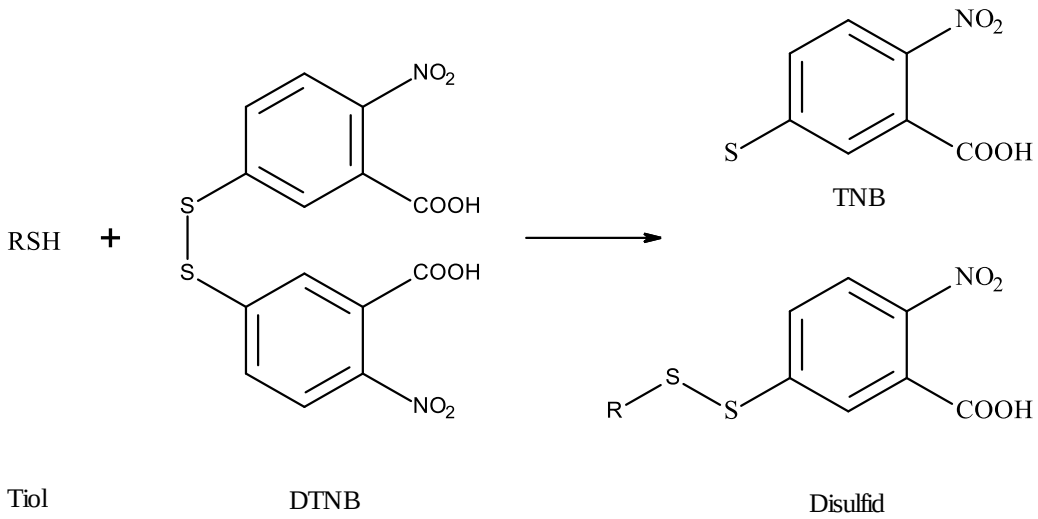


Slika 1.31. Shematski prikaz spektrofotometra.

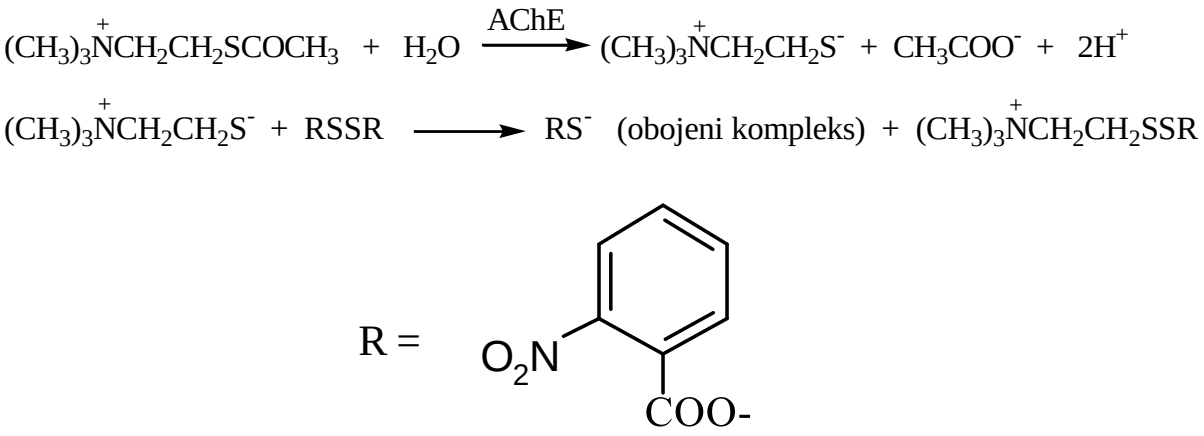
1.6.1.1. Metoda po Ellmanu

Ellmanova metoda je jednostavna spektrofotometrijska metoda koja se koristi za određivanje inhibicijske sposobnosti kolinesteraza. Metoda se temelji na reakciji tzv. Ellmanovog reagensa, DTNB [5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzojeva)] kiselina, koji služi kao indikator, s tiolnom skupinom koja se oslobađa u reakciji sintetskog supstrata acetiltiokolina (ATChI) i enzima AChE.

Reakcijom nastaje 2-nitro-5-merkaptobenzojeva kiselina (TNB), koja dalje u vodi ionizira pri čemu nastaje žuto obojeni TNB^- anion kod neutralnog ili alkalnog pH. Apsorpcijski maksimum DTNB-a je na valnoj duljini od 320 nm, dok je apsorpcijski maksimum TNB^- na valnoj duljini od 412 nm (slike 1.32. i 1.33.). Ellmanova metoda je brza metoda kod koje se dodatkom jednog mola tiola oslobađa jedan mol TNB^-[26].



Slika 1.32. Mehanizam reakcije Ellmanovog reagensa (DTNB) s tiolnom skupinom (-SH).



Slika 1.33. Mehanizam Ellmanove reakcije prilagođene za određivanje sposobnosti inhibicije enzima AChE.

Određivanje inhibicijske sposobnosti eteričnih ulja i njihovih komponenti na enzim BuChE metodom po Ellmanu koristi isti mehanizam kao i prethodno opisana metoda za AChE. Razlika je u tome što se umjesto AChE koristi BuChE, kao i umjesto acetiltiokolina (ATChI) sintetski supstrat butiriltiokolin (BuTChI).

2.EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. KEMIKALIJE

ACETILKOLINESTERAZA

- Izvor enzima: AChE (E.C. 3.1.1.7) iz elektrofora električne jegulje Tip V-S, Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Njemačka);
- Supstrat: acetiltiokolin jodid (ATChI), Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Njemačka): koncentracije u sustavu: 0,5 mmol/L; 0,4 mmol/L; 0,3 mmol/L;
- Tiolni reagens: DTNB ([5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzojeva)] kiselina, Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Njemačka);
- Uzorak (inhibitor): (-)-*β*-elemen, Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Njemačka) otopljen u 96% etanolu; koncentracije u sustavu: 0,0136 mg/mL; 0,0068mg/mL; 0,0034 mg/mL;
- 0,1 mol/L fosfatni pufer (pH = 8);
- 0,1 mol/L fosfatni pufer (pH = 7) s dodatkom 0,12 mol/L natrijevog bikarbonata i
- 96% etanol, Kemika (Zagreb, Hrvatska).

Tablica 2.1. Priprema kemikalija za rad.

Kemikalije	Osnovna otopina	Konačna koncentracija	Volumen / µL
Pufer	fosfatni pufer (pH = 8)		190
DTNB	13,079 mg u 5 ml pufera (pH = 7)	0,3 mM	10
ATChI	15,9 mg u 5 mL pufera (pH = 8)	0,5 mM	10
ATChE	0,66 U/mL u fosfatnom puferu (pH = 8)	0,03 U*/mL	10
(-)-*β*-elemen/ EtOH		različite konc./96%	10

*Definicija U (engl. *Unit*): 1 U acetilkolinesteraze će hidrolizirati 1 µmol acetilkolina, na kolin i acetat, po minuti pri pH = 8 i temperaturi od 37 °C



Slika 2.1. Potrebne kemikalije za ispitivanje AChE.

BUTIRILKOLINESTERAZA

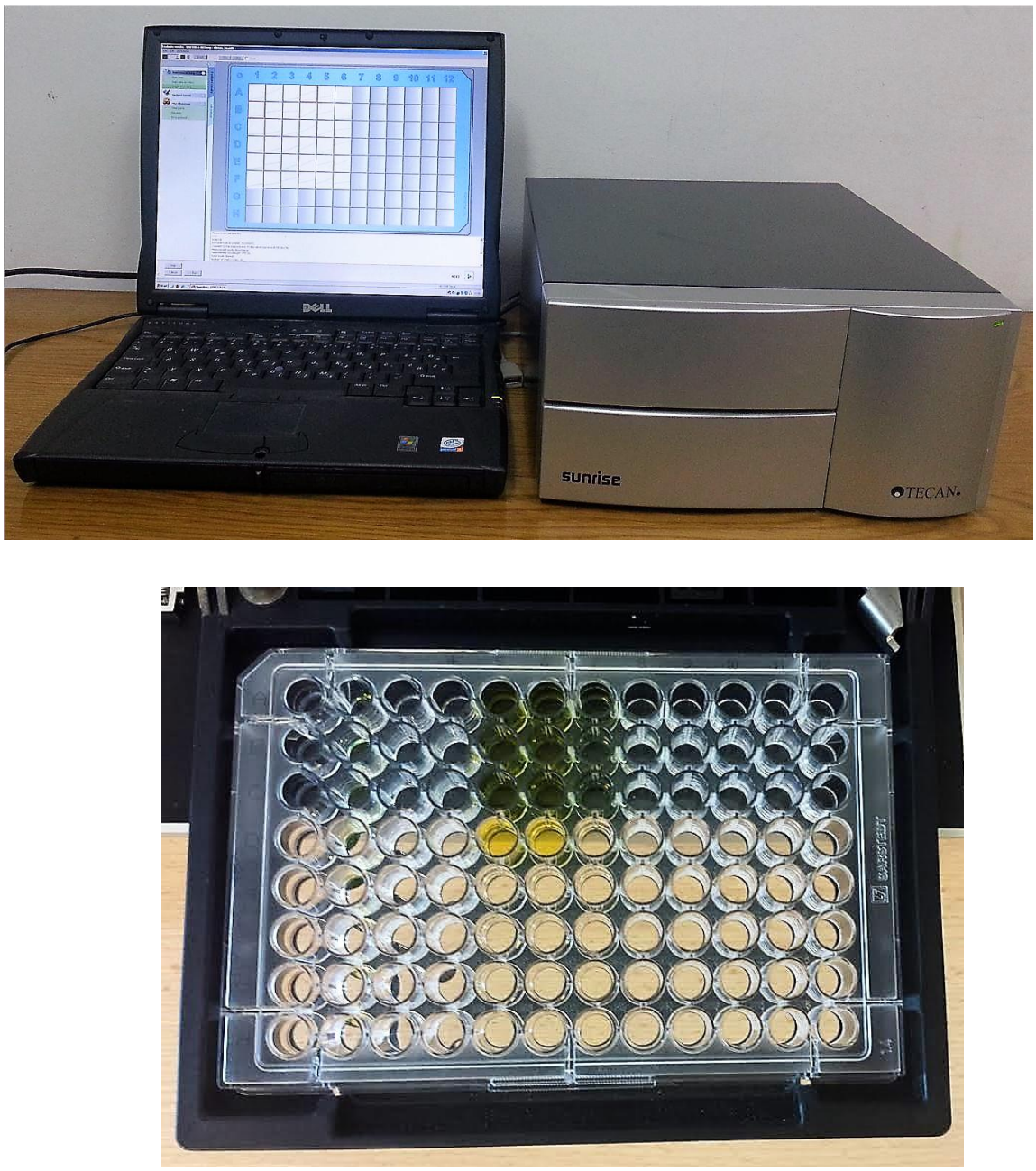
- Izvor enzima: BuChE (E.C. 3.1.1.8) iz konjskog seruma, Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Njemačka);
- Supstrat: butiriltiokolin jodid (BuTChI), Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Njemačka), koncentracije u sustavu: 0,5 mmol/L; 0,4 mmol/L; 0,3 mmol/L;
- Tiolni reagens: DTNB ([5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzojeva)] kiselina, Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Njemačka);
- Uzorak (inhibitor): (-)-*β*-elemen, Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Njemačka) otopljen u 96% etanolu, koncentracije u sustavu: 0,0136 mg/mL; 0,0068mg/mL; 0,0034 mg/mL;
- 0,1 mol/L fosfatni pufer (pH = 8);
- 0,1 mol/L fosfatni puferu (pH = 7) s dodatkom 0,12 mol/L natrijevog bikarbonata i
- 96% etanol, Kemika (Zagreb, Hrvatska).

Tablica 2.2. Priprema kemikalija za rad.

Kemikalije	Osnovna otopina	Konačna koncentracija	Volumen / µL
Pufer	fosfatni pufer (pH = 8)		190
DTNB	13,079 mg u 5 ml pufera (pH = 7)	0,3 mM	10
BuTChI	17,45 mg u 5 mL pufera (pH = 8)	0,5 mM	10
BuChE	0,66 U/mL u fosfatnom puferu (pH = 8)	0,06 U/mL	10
(-)-*β*-elemen/ EtOH		Različite konc./96%	10

2.1.1. Određivanje kinetičkih parametara i sposobnosti inhibicije AChE

Određivanje inhibicijske sposobnosti (-)-*β*-elemena na enzim AChE provedeno je korištenjem modificirane metode po Ellmanu. Mjerenje se vršilo na višekanalnom čitaču mikrotitarskih pločica "Sunrise" (Tecan GmbH, Austrija) pri valnoj duljini od 405 nm uz automatsko miješanje i pohranjivanje podataka na računalo. Jedna mikrotitarska pločica ima 96 jažica. Uređaj je prikazan na slici 2.2.



Slika 2.2. Višekanalni čitač mikrotitarskih pločica "Sunrise" (Tecan GmbH, Austria).

U svakoj jažici reakcijska smjesa sadrži:

- 180 μL 0,1 mol/L fosfatnog pufera pH = 8;
- 10 μL 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzojeve kiseline) - DTNB, čija koncentracija u smjesi iznosi 0,3 mmol/L (početna otopina pripremljena u 0,1 mol/L fosfatnom puferu pH = 7 sa dodatkom 0,12 mol/L natrij-bikarbonata, radi stabilnosti DTNB);
- 10 μL acetilkolinesteraze - AChE, čija koncentracija u smjesi iznosi 0,03 U/mL;
- 10 μL acetiltiokolin jodida – ATChI određenih koncentracija (početne otopine za AChE i ATChI pripremljene su koristeći 0,1 mol/L fosfatni pufer pH = 8) i
- 10 μL uzorka određene koncentracije otopljenog u etanolu ili samog etanola u slučaju kontrolnog mjerenja (utjecaj etanola).

Tablica 2.3. Prikaz otopina od kojih se sastoji pojedino mjerenje.

	Kontrola (E)	**BL ($B_{E)}$**	**Uzorak (S)**	**Uzorak BL (B_S)**
PUFER	180	190	180	190
DTNB	10	10	10	10
(-)-*β*-elemen /EtOH	0/10	0/10	10/0	10/0
AChE	10	0	10	0
ATChI	10	10	10	10

E predstavlja aktivnost enzima bez (-)-*β*-elemena, S predstavlja aktivnost enzima u prisustvu (-)-*β*-elemena, a B_E i B_S predstavljaju "blank" vrijednosti za E i S.

Konačni volumen smjese iznosi 220 μL. Uzorci se otpipetiraju u jažice, s time da se supstrat, ATChI, dodaje neposredno prije početka mjerenja budući da on započinje reakciju. Kod mjerenja kontrole (E) koristi se etanol (inhibicija enzima približno jednaka 0 %). Praćena je i neenzimska hidroliza na način da je napravljeno tzv. "blank" mjerenje (BL) odnosno slijepa proba u kojoj se izostavi AChE i zamijeni s jednakim volumenom pufera (umjesto 180 μL, dodaje se 190 μL pufera). Sva mjerenja su izvedena u sedam ponavljanja pri sobnoj temperaturi u trajanju od 6 min.

Sposobnost inhibicije enzima računa se prema formuli:

$$\textit{\% inhibicije AChE} = (AK - AA / AK) \times 100, \qquad (2.1.)$$

gdje je *AA* apsorbancija test otopine , a *AK* je apsorbancija kontrolnog uzorka.

2.1.2. Određivanje kinetičkih parametara i sposobnosti inhibicije BuChE

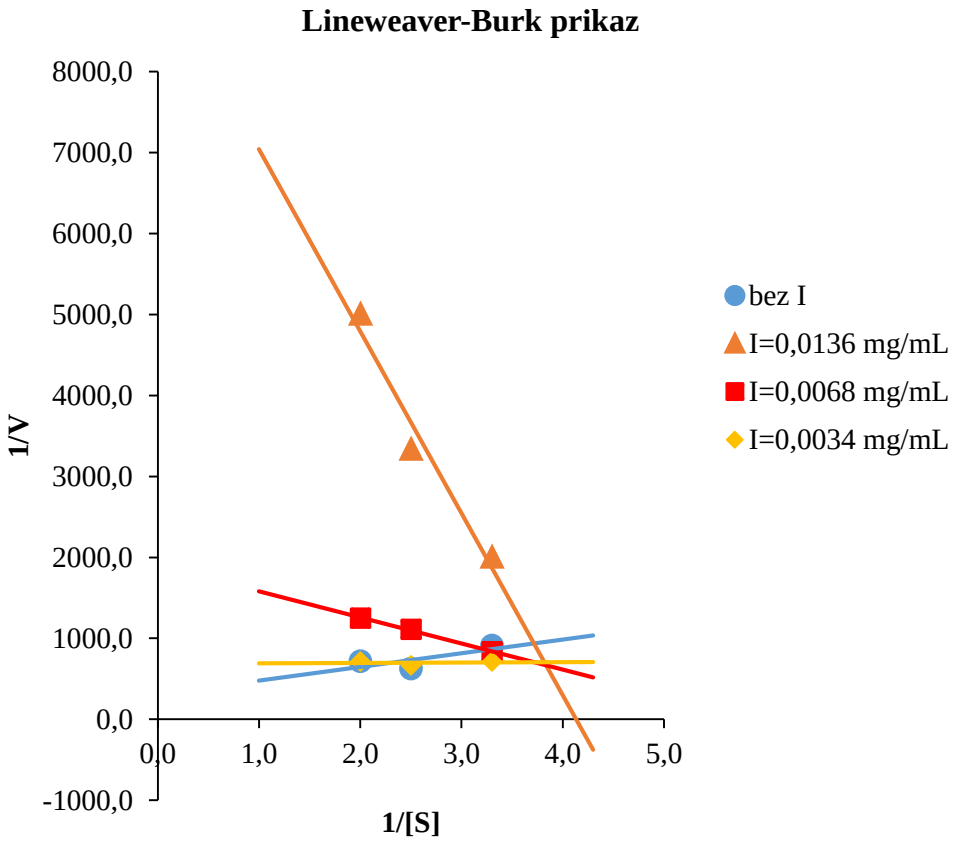
Određivanje inhibicijske sposobnosti (-)-*β*-elemena na BuChE provedeno je korištenjem iste metode i tehnike kao i za enzim AChE.

Umjesto ATChI koristi se sintetski butiriltiokolin jodid (BuTChI) koncentracija (0,5; 0,4 i 0,3) mmol/L u smjesi i BuChE čija koncentracija u smjesi iznosi 0,06 U/mL. Početne otopine BuTChI i BuChE su pripremljene u 0,1 mol/L fosfatnom puferu pH = 8. Ostali sastojci reakcijske smjese i mehanizam reakcije su identični.

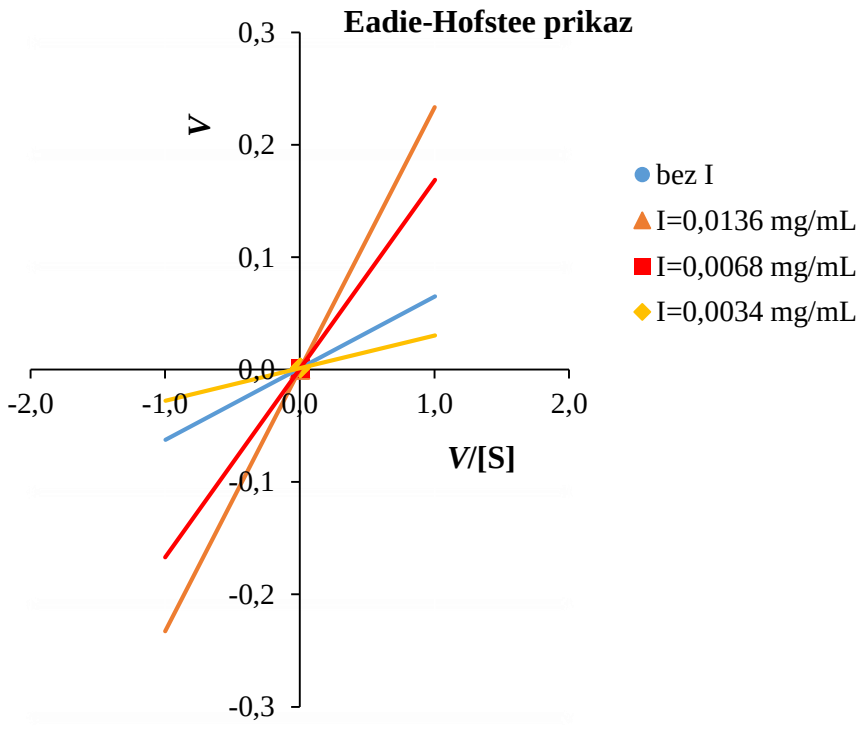
3.REZULTATI

3.1. KINETIČKI PARAMETRI I SPOSOBNOST INHIBICIJE AChE

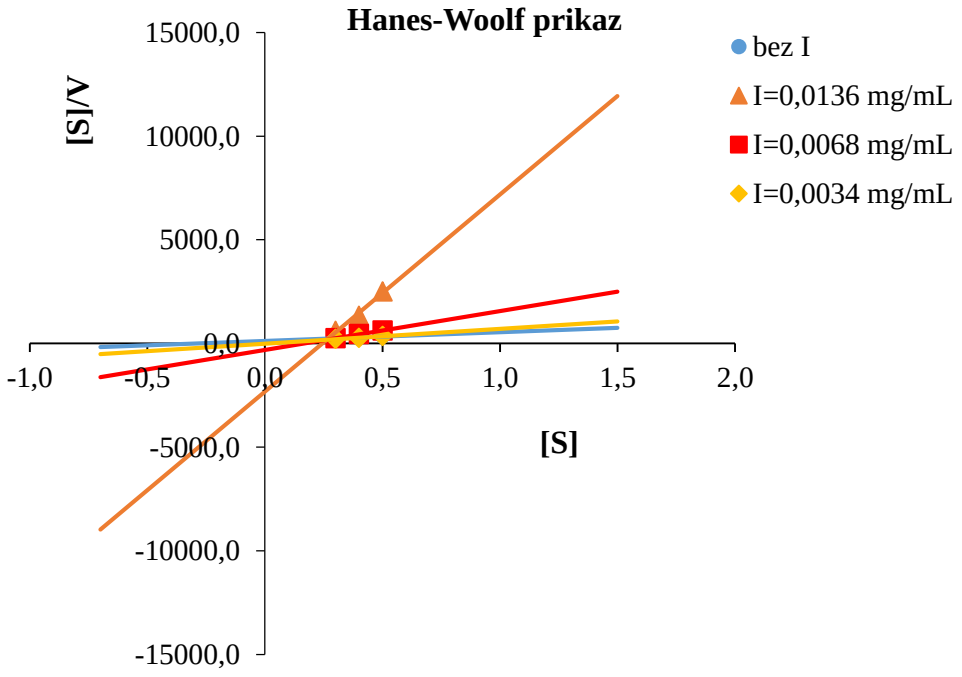
Inhibicijska sposobnost *β*-elemena na enzim acetilkolinesterazu (AChE) ispitivana je metodom po Ellmanu (opisana u poglavlju 1.6.1.1.). Određena je vrsta inhibicije pomoću Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf i Eisenthal – Cornish-Bowden prikaza. Dobiveni rezultati su prikazani slikama 3.1.-3.7. Vrijednosti kinetičkih parametara K_M, K_M^{app}, V_{max} i V_{max}^{app} određene su iz Eisenthal – Cornish-Bowden prikaza na temelju odgovarajućih sjecišta pravaca.



Slika 3.1. Lineweaver-Burk prikaz ovisnosti brzine hidrolize ATChI o njegovoj koncentraciji.

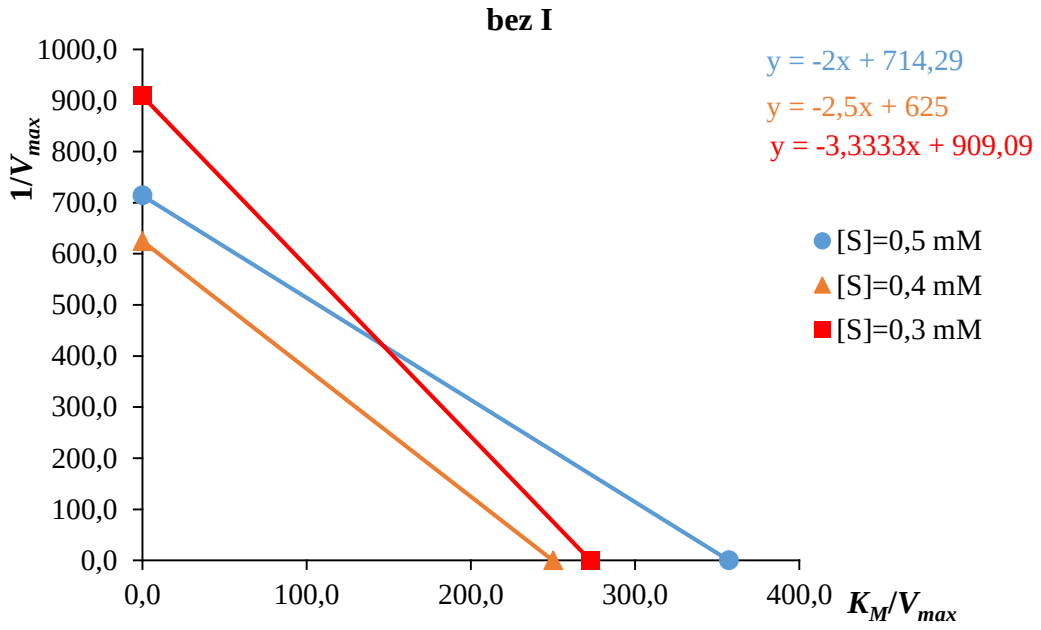


Slika 3.2. Eadie-Hofstee prikaz ovisnosti brzine hidrolize ATChI o njegovoj koncentraciji.

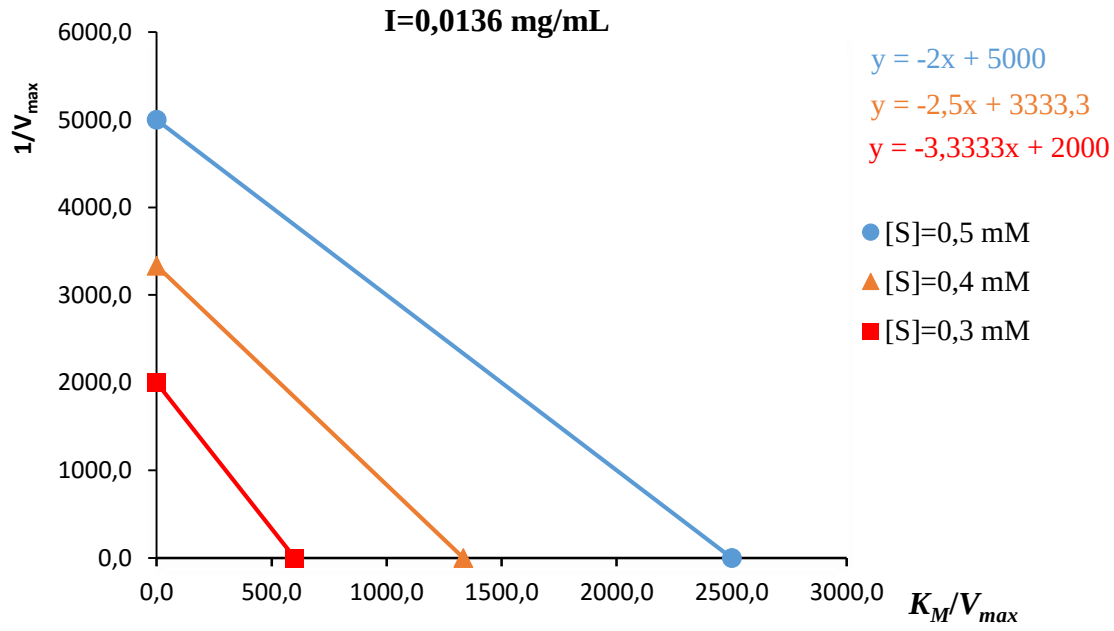


Slika 3.3. Hanes-Woolf prikaz ovisnosti brzine hidrolize ATChI o njegovoj koncentraciji.

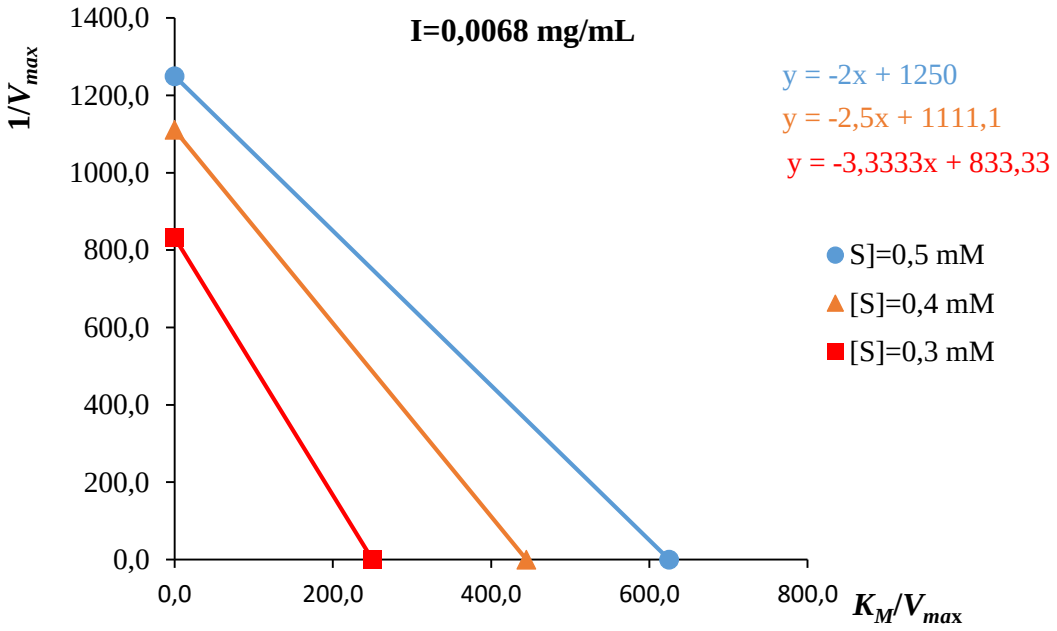
Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz je radi preglednosti konstruiran posebno bez inhibitora kao i za sve koncentracije inhibitora.



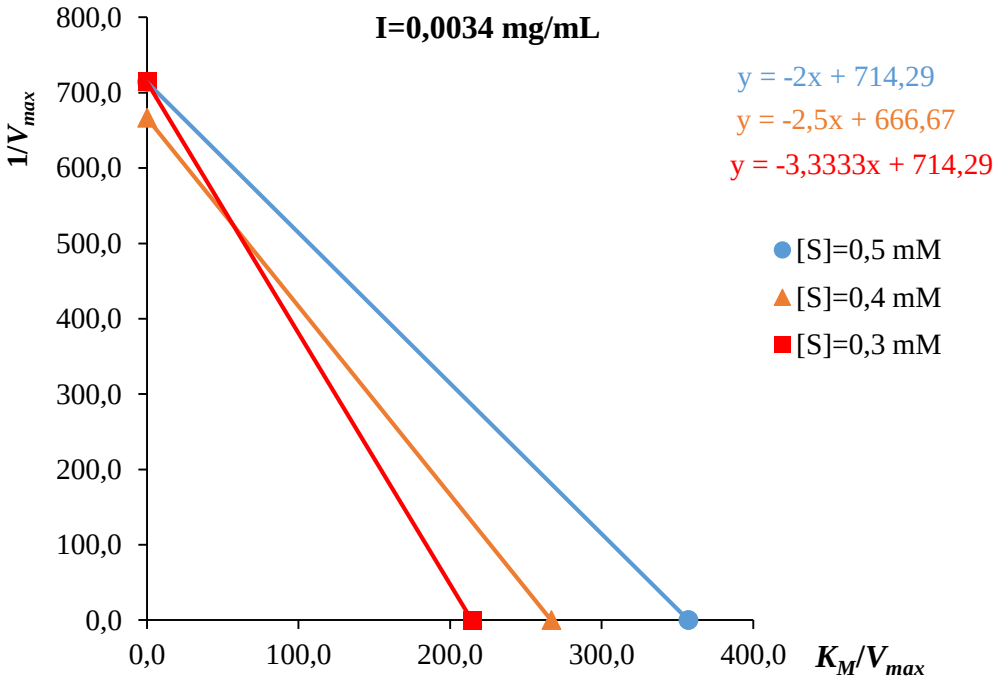
Slika 3.4. Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz bez inhibitora.



Slika 3.5. Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz za koncentraciju inhibitora 0,0136 mg/mL.



Slika 3.6. Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz za koncentraciju inhibitora 0,0068 mg/mL.



Slika 3.7. Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz za koncentraciju inhibitora 0,0034mg/mL.

Na temelju prikazanih Lineweaver-Burk, Eadie–Hofstee, Hanes–Woolf i Eisenthal – Cornish-Bowden grafova te uz pomoć slika 1.19.-1.22. određeno je da se radi o inhibiciji miješanog tipa. U tablici 3.1. prikazane su vrijednosti kinetičkih parametara (K_M, K_M^{app}, V_{max} i V_{max}^{app}) određenih na temelju Eisenthal – Cornish-Bowden grafa (opisano u poglavlju 1.3.5.)

Tablica 3.1. Određeni kinetički parametri.

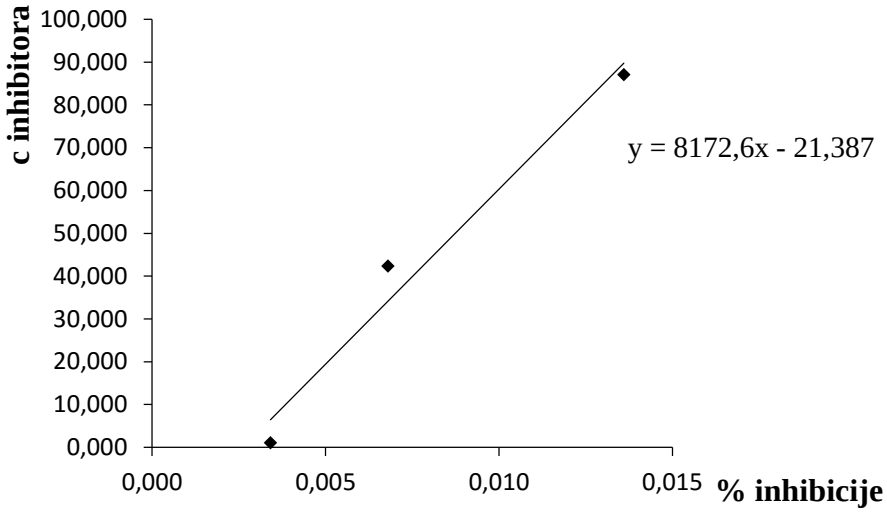
	bez inhibitora	**[I]=0,0034 mg/mL**
$\boldsymbol{K_M}$	0,3461	/
$\boldsymbol{K_M^{app}}$	/	0,1091
$\boldsymbol{V_{max}}$	0,0024	/
$\boldsymbol{V_{max}^{app}}$	/	0,0017

Postotci inhibicije enzima AChE izračunati su prema formuli 2.1. Rezultati inhibicijskog učinka različitih koncentracija β-elemena pri koncentraciji supstrata ATChI 0,5 mM prikazani su u tablici 3.2.

Tablica 3.2. Postotci inhibicije za različite koncentracije inhibitora.

[I] (mg/mL)	**% inhibicije**
0,0136	87,05
0,0068	42,33
0,0034	5,64

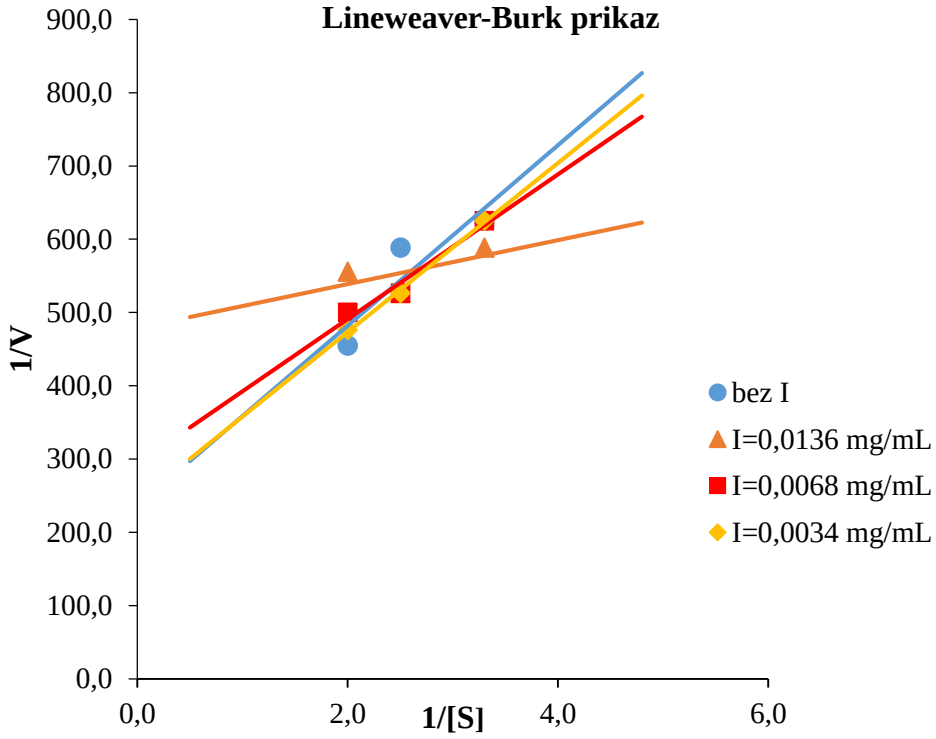
Iz dobivenih podataka može se izračunati i IC_{50} vrijednost - tj. ona koncentracija inhibitora potrebna da bi se postigla inhibicija enzima od 50 %. Na apscisu se nanesu koncentracije inhibitora, a na ordinatu % inhibicije iz tablice 3.2. Iz jednadžbe pravca je izračunata vrijednost IC_{50} koja iznosi 0,0087 mg/mL. Grafički prikaz se nalazi na slici 3.8.



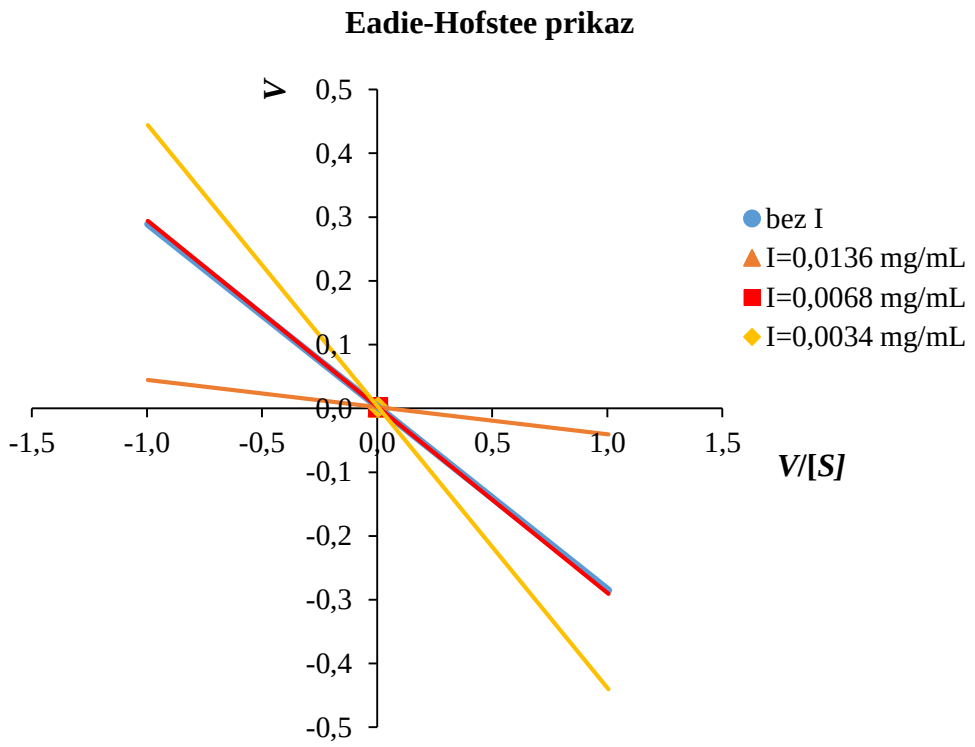
Slika 3.8. Graf ovisnosti koncentracije inhibitora o postotku inhibicije.

3.2. KINETIČKI PARAMETRI I SPOSOBNOST INHIBICIJE BuChE

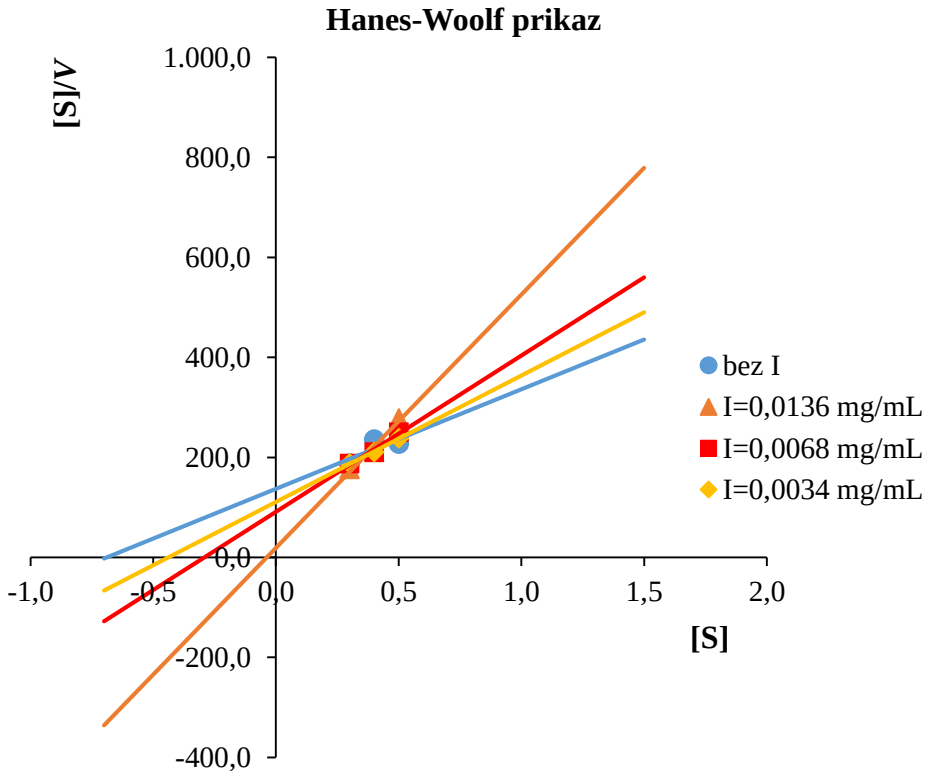
Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf i Eisenthal – Cornish-Bowden prikazi za enzim butirilkolinesterazu se nalaze na slikama 3.9.-3.15.



Slika 3.9. Lineweaver-Burk prikaz ovisnosti brzine hidrolize BuTChI o njegovoj koncentraciji.

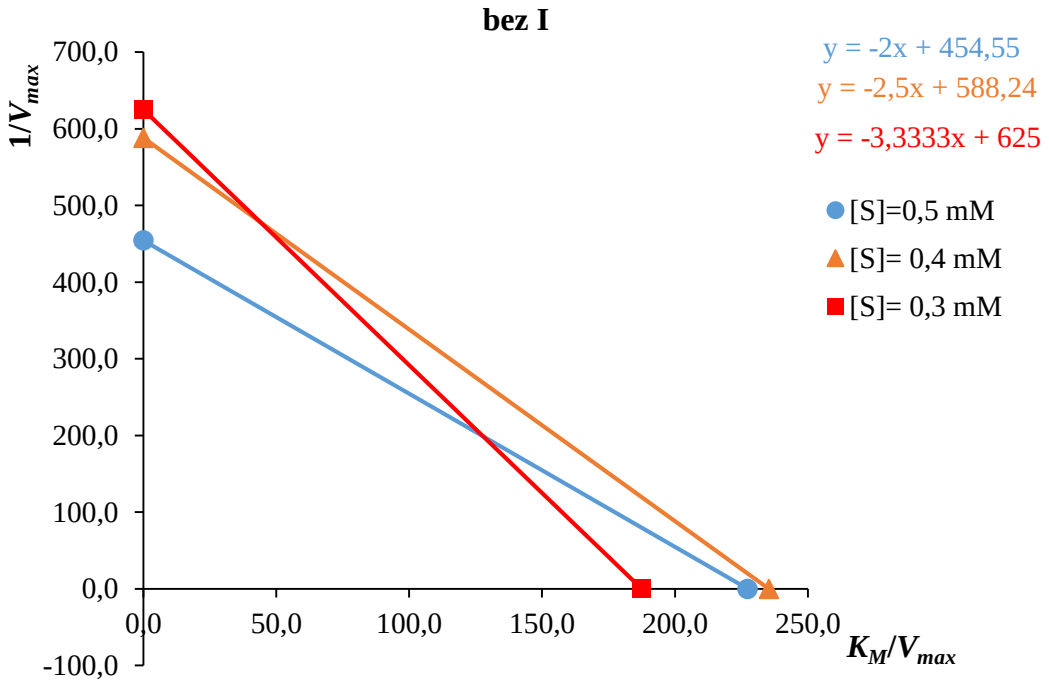


Slika 3.10. Eadie-Hofstee prikaz ovisnosti brzine hidrolize BuTChI o njegovoj koncentraciji.

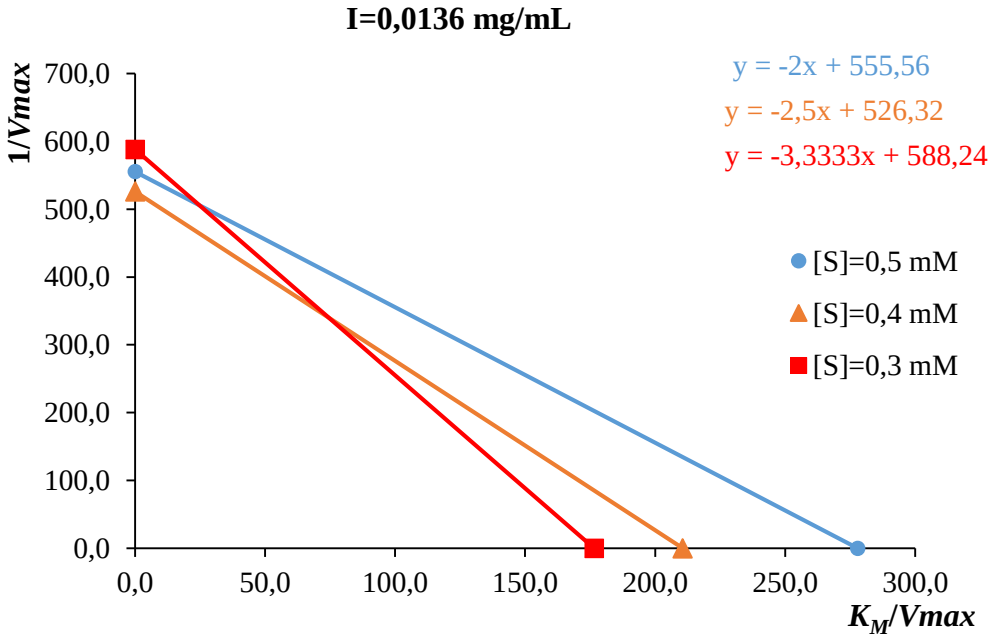


Slika 3.11. Hanes-Woolf prikaz ovisnosti brzine hidrolize BuTChI o njegovoj koncentraciji.

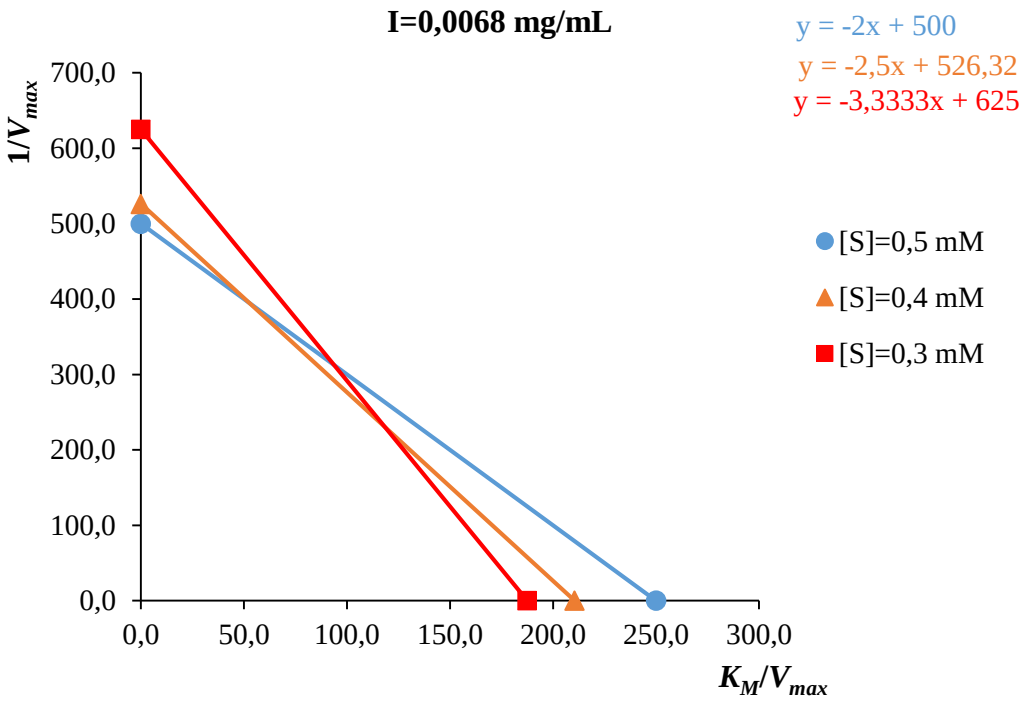
Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz je radi preglednosti konstruiran posebno bez inhibitora kao i za sve koncentracije inhibitora.



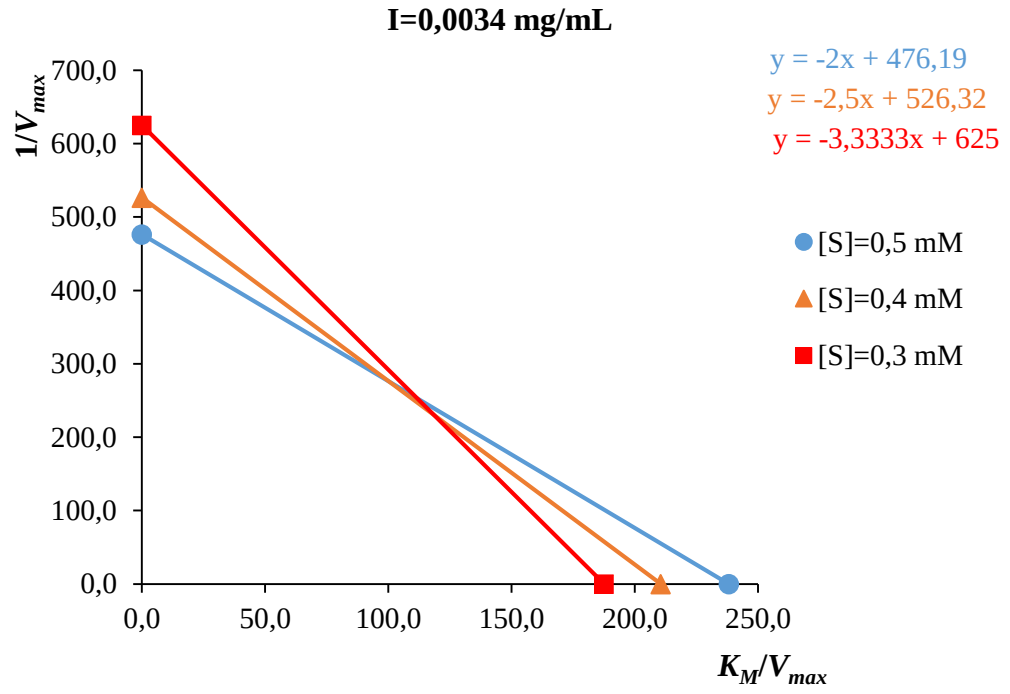
Slika 3.12. Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz bez inhibitora.



Slika 3.13. Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz za koncentraciju inhibitora 0,0136 mg/mL.



Slika 3.14. Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz za koncentraciju inhibitora 0,0068 mg/mL.



Slika 3.15. Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz za koncentraciju inhibitora 0,0034 mg/mL.

Za enzim butirilkolinesterazu je na temelju istih prikaza kao i za acetilkolinesterazu zaključeno da se radi o inhibiciji miješanog tipa te su na isti način određeni kinetički parametri za različite koncentracije inhibitora (tablica 3.3.) i postotci inhibicije enzima (tablica 3.4.).

Tablica 3.3. Kinetičkih parametri određeni na temelju Eisenthal – Cornish-Bowden prikaza.

	bez inhibitora	**[I]=0,0136 mg/mL**	**[I]=0,0068 mg/mL**	**[I]=0,0034 mg/mL**
K_M	0,3676	/	/	/
K_M^{app}	/	0,1333	0,1800	0,4412
V_{max}	0,0036	/	/	/
V_{max}^{app}	/	0,0025	0,0027	0,0040

Tablica 3.4. Postotci inhibicije za različite koncentracije inhibitora pri koncentraciji supstrata BuTChI 0,5 mM.

[I] (mg/mL)	**% inhibicije**
0,0136	17,11
0,0068	9,84
0,0034	6,09

4.RASPRAVA

Cilj istraživanja u okviru ovog diplomskog rada je odrediti vrstu inhibicije i kinetičke parametre enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze u prisustvu *β*-elemena kao inhibitora te ispitati sposobnost inhibicije enzima korištenjem navedenog inhibitora. Korišteni enzim AChE je iz elektrofora električne jegulje, dok je BuChE iz konjskog seruma. Testirane su serije uzoraka različitih koncentracija (0,0136 mg/mL, 0,0068 mg/mL i 0,0034 mg/mL), a kao supstrat korišten je acetiltiokolin jodid (ATChI), odnosno butiriltiokolin jodid (BuTChI) čije su koncentracije u sustavu iznosile 0,5 mmol/L, 0,4 mmol/L i 0,3 mmol/L.

Određivanje vrste inhibicije vršilo se pomoću Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf i Eisenthal – Cornish-Bowden prikaza (opisanih u poglavlju 1.3.5.). Za enzim AChE ovisnosti brzine hidrolize acetiltiokolin jodida o njegovoj koncentraciji su prikazane slikama 3.1.-3.7. Na temelju nacrtanih prikaza i uz pomoć slika 1.19.-1.22., gdje je prikazano određivanje vrste inhibicije pomoću "kretanja" sjecišta pravaca, dobivenih za različite koncentracije inhibitora, s koordinatnim osima, određena je vrsta inhibicije. Zaključeno je da se radi o inhibiciji miješanog tipa, čiji je mehanizam prikazan na slici 1.17. Za enzim BuChE ovisnosti brzine hidrolize butiriltiotiokolin jodida o njegovoj koncentraciji nalaze se na slikama 3.9.-3.15. Određivanje vrste inhibicije se vršilo na isti način kao i za AChE te je također zaključeno da se radi o inhibiciji miješanog tipa.

Kinetički parametri K_M, K_M^{app}, V_{max} i V_{max}^{app} određeni su pomoću Eisenthal – Cornish-Bowden prikaza. Iz jednadžbi pravaca izračunati su kinetički parametri K_M i V_{max} za reakciju hidrolize ATChI/BuTChI enzimom AChE/BuChE te K_M^{app} i V_{max}^{app} za istu reakciju u funkciji različitih koncentracija inhibitora. Za enzim AChE rezultati su prikazani u tablici 3.1., dok su za enzim BuChE prikazani u tablici 3.3.

Budući da se zbog specifičnosti aktivnog mjesta enzima, njihova inhibicija istim spojem može značajno razlikovati, posebna pažnja posvećena je i istraživanju i pronalasku selektivnih inhibitora pojedinih kolinesteraza. Iz izračunatih postotaka inhibicije (tablice 3.2. i 3.4.) vidljivo je da *β*-elemen pokazuje sposobnost inhibicije obaju enzima. Kod inhibicije AChE, najveća inhibicija je postignuta kod uzorka koncentracije 0,0136 mg/mL u iznosu od 87,05 %.

Kod inhibicije BuChE uzorak koncentracije 0,0136 mg/mL pokazuje najveću inhibicijsku sposobnost s vrijednošću od 17,11 %.

Iako *β*-elemen pokazuje sposobnost inhibicije obaju enzima, inhibicija BuChE je znatno slabija u odnosu na AChE. Na temelju rezultata može se zaključiti da se postotak inhibicije AChE i BuChE smanjuje proporcionalno sa smanjenjem koncentracije uzorka.

Za AChE je izračunata i IC_{50} vrijednost kao mjera njene inhibitorne moći. Priložena je slika 3.8. s odgovarajućim objašnjenjem postupka računanja. IC_{50} iznosi 0,0087 mg/mL.

5.ZAKLJUČAK

- Elemen je monociklički seskviterpen koji zbog svojih svojstava može proći krvno-moždanu barijeru što je važno kod lijekova za tretiranje bolesti središnjeg živčanog sustava (Alzheimerova bolest) te je kao takav bio predmet ovog istraživanja.

- Cilj rada bio je određivanje kinetičkih parametara K_M, K_M^{app}, V_{max} i V_{max}^{app} enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze u prisutnosti β-elemena kao inhibitora te ispitivanje inhibicijskih svojstava inhibitora na enzime spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu.

- Na temelju prikaza Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf i Eisenthal – Cornish-Bowden vidljivo je da se radi o inhibiciji miješanog tipa te su pomoću Eisenthal – Cornish-Bowden grafa određeni kinetički parametri K_M, K_M^{app}, V_{max} i V_{max}^{app}.

- Ispitivanjem sposobnosti inhibicije enzima AChE zaključeno je da β-elemen pokazuje dobru sposobnost inhibicije, dok za BuChE ne pokazuje značajniju sposobnost inhibicije. Maksimalna inhibicija AChE postignuta je pri koncentraciji β-elemena od 0,0136 mg/mL i iznosi 87,05 %, dok maksimalna inhibicija BuChE pri istoj koncentraciji uzorka iznosi 17,11 %.

- IC_{50} vrijednost (inhibitor β-elemen) za enzim AChE iznosi 0,0087mg/mL.

6.LITERATURA

1. A. Puljak, G. Perko, D. Mihok, H. Radašević, S.Tomek-Roksandić, *Alzheimerova bolest kao gerontološki javnozdravstveni problem*, Medicus, **14** (2005.) 229-235.
2. I. Andreis, D. Jalšovec, *Anatomija i fiziologija*, Školska knjiga, Zagreb, (2008.) 61-87.
3. I. L. Elisha, *Characterization of acetylcholinesterase inhibitor isolated from Ammocharis coranica (Amaryllidaceae)*, magistarski rad, Department of Paraclinical Sciences, Faculty of Veterinary Sciences, University of Pretoria, (2011.)
4. F. Burčul, *Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae*, Doktorski rad, Zagreb, (2014.)
5. R. Anand, D. G. Kiran, A. M. Abbas, *Therapeutics of Alzherimer's disease: Past, present and future*, Neuropharmacology, **76** (2014.), 27 – 50.
6. V. Folnegović-Šmalc, S. Uzun, O. Kozumplik, P. Folnegović-Grošić, N. Henigsberg, G. Makarić, M. Mihanović, N. Mimica, *Farmakoterapija Alzheimerove bolesti*, Medicus, **11** (2002.) No. 2, 217 – 222.
7. URL:http://www.timelesslifemag.com/index.php/2016/04/12/new-study-adds-to-evidence-that-fisetin-may-protect-against-alzheimers-disease/ (14.06.2017.)
8. URL:https://matrixworldhr.com/2014/02/11/kanabis-pomaze-u-lijecenju-alzheimerove-bolesti/ (14.06.2017.)
9. A. Prasansuklab, T. Tencomnao, *Amyloidosis in Alzheimer's Disease: The Toxicity of Amyloid Beta (Aβ), Mechanisms of Its Accumulation and Implications of Medicinal Plants for Therapy*, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, (2013.)
10. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, (2013.) 205-236.
11. URL:http://schoolbag.info/chemistry/mcat_biochemistry/13.html (10.06.2017.)
12. F. Burčul, *Enzimska kinetika*, predavanja – nerecenzirani materijali, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, (2016.).
13. A. Cornish-Bowden, R. Eisenthal, *Estimation of Michaelis constant and maximum velocity from the direct linear plot*, Biochimica et Biophysica Acta, **523** (1978.) 268-272.
14. URL: http://fooplot.com/ (19.06.2017.)

15. A. Cornish-Bowden, R. Eisenthal, *The Direct Linear Plot - A New Graphical Procedure For Estimating Enzyme Kinetic Parameters*, Biochemistry Journal, **139** (1973.) 715-720.
16. A. Bosak, M. Katalinić, Z. Kovarik, *Kolinesteraze: struktura, uloga, inhibicija*, Arh Hig Rada Toksikol, **62** (2011.) 175-190.
17. M. L. Raves, M. Harel, Y. P. Pang, I. Silman, A. P. Kozikowski, J. L. Sussman, *Native acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) from Torpedo californica*, Nature Structural & Molecular Biology, **4** (1997.) 57-63.
18. Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, J. C. Fontecilla-Camps, F. Nachon, *Crystal Structure of Human Butyrylcholinesterase and of Its Complexes with Substrate and Product*, Journal of Biological Chemistry, **278** (2003.) 41141-41147.
19. URL: https://www.google.ch/patents/US20060014987 (24.06.2017.)
20. H. Guo, G. Zhang, Y. Wang, Y. Zhang, K. Sodani, T. T. Talele, C. R. Ashby, Z. S. Chen, *β-elemene, a compound derived from Rhizoma zedoariae, reverses multidrug resistance mediated by the ABCB1 transporter*, Oncology Reports, **31** (2014.) 858-866.
21. URL:http://www.halmed.hr/upl/lijekovi/PIL/UP-I-530-09-05-02-914.pdf (20.6.2017.)
22. Z. Jiang, J. A. Jacob, D. S. Loganathachetti, P. Nainangu, B. Chen, *β-Elemene: Mechanistic Studies on Cancer Cell Interaction and Its Chemosensitization Effect*, Frontiers in Pharmacology, Vol.8 (105), (2017.)
23. H. E. de Vries, J. Kuiper, A. G. de Boer, T. J. C. Van Berkel, D. D. Breimer, *The Blood-Brain Barrier in Neuroinflammatory Diseases*, Pharmacological Reviews June 1, (1997.) Vol. 49 (2),143-156.
24. L. Kukoč-Modun, *Molekulska apsorpcijska spektrofotomerija* (laboratorijska vježba – nerecenzirani materijali), Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, Zavod za analitičku kemiju, (2003.)
25. URL: http://www.periodni.com/gallery/spektrofotometar.png (21.06.2017.)
26. G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Jr. Andres, R. M. Featherstone, *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*, Biochemical Pharmacology, 7 (1961.) 88-95.