

# Inhibicijsko djelovanje huperzina A i B-pinena na aktivnost acetilkolinesteraze

---

**Novosel, Barbara**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*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:167:804043>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**INHIBICIJSKO DJELOVANJE HUPERZINA A  
I  $\beta$ -PINENA NA AKTIVNOST ACETILKOLINESTERAZE**

**ZAVRŠNI RAD**

**BARBARA NOVOSEL**

**Matični broj: 276**

**Split, rujan 2018.**

**KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**INHIBICIJSKO DJELOVANJE HUPERZINA A  
I  $\beta$ -PINENA NA AKTIVNOST ACETILKOLINESTERAZE**

**ZAVRŠNI RAD**

**BARBARA NOVOSEL**

**Matični broj: 276**

**Split, rujan 2018.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**

**INHIBITORY EFFECT OF HUPERZINE A AND  $\beta$ -PINENE  
ON THE ACTIVITY OF ACETYLCHOLINESTERASE**

**BACHELOR THESIS**

**BARBARA NOVOSEL**

**Parent number: 276**

**Split, September 2018**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu  
Preddiplomski studij kemije

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Tema rada** je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

**Mentor:** doc. dr. sc. Franko Burčul

### INHIBICIJSKO DJELOVANJE HUPERZINA A I $\beta$ -PINENA NA AKTIVNOST ACETILKOLINESTERAZE

Barbara Novosel, 276

**Sažetak:** Enzimi su molekule neophodne za život, a po sastavu su uglavnom proteini. Kataliziraju reakcije tako da stabiliziraju prijelazno stanje i mogu ubrzati reakciju za faktor koji može biti veći od milijun. Nedostatak samo jednog enzima u tijelu može biti koban. Visoko su specifični za svoje reaktante (supstrate) i reakcije koje kataliziraju. Inhibitori su molekule koje smanjuju aktivnost enzima, mnogi inhibitori su i učinkoviti lijekovi. Alzheimerova demencija je progresivna degenerativna bolest središnjeg živčanog sustava. To je najčešća vrsta demencije koja se pojavljuje s učestalošću od 5% oboljelih u dobi iznad 50 godina te 50 % oboljelih u osoba iznad 80 godina. Acetilkinolin je prijenosnik živčanih impulsa koji regulira procese pamćenja i učenja te održava razinu svijesti. Acetilkinolinesteraza je enzim koji katalizira hidrolizu acetilkolina prekidajući tako prijenos živčanog impulsa. Razni inhibitori acetilkolinesteraze pokazali su se kao dobri lijekovi za ublažavanje simptoma Alzheimerove bolesti. Prema kolinergičnoj teoriji kod Alzheimerove bolesti dolazi do odumiranja kolinergičnih neurona i smanjene sinteze acetilkolina. Inhibitori usporavaju hidrolizu acetilkolina i time se povećava njegova koncentracija što omogućava normalnije funkcioniranje mozga. U ovom radu je ispitano inhibicijsko djelovanje alkaloida huperzina A i monoterpena  $\beta$ -pinena na aktivnost acetilkolinesteraze. Prema eksperimentalnim podacima može se zaključiti da su oni dobri inhibitori acetilkolina te bi se kao takvi mogli koristiti u liječenju Alzheimerove bolesti.

**Ključne riječi:** enzimi, inhibicija, acetilkolin, acetilkolinesteraza, Alzheimerova bolest, huperzin A,  $\beta$ -pinen

**Rad sadrži:** 27 stranica, 11 slika, 5 tablica, 18 literaturnih navoda.

**Jezik izvornika:** hrvatski.

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević - predsjednik
2. Doc. dr. sc. Mario Nikola Mužek – član
3. Doc. dr. sc. Franko Burčul - član - mentor

**Datum obrane:** 28. rujna 2018.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

**University of Split**  
**Faculty of Chemistry and Technology Split**  
**Undergraduate 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. 3.

**Mentor:** Franko Burčul, PhD, assistant prof.

### INHIBITORY EFFECT OF HUPERZINE A AND $\beta$ -PINENE ON THE ACTIVITY OF ACETYLCHOLINESTERASE

Barbara Novosel, 276

**Abstract:** Enzymes are molecules that are necessary for life and by structure they are mainly proteins. They catalyze reactions in a way that they stabilize transitional state and can speed up the reaction by a factor that can be bigger than a million. The deficiency of only one enzyme can be fatal for the body. They are highly specific for the reactants (substrates) of the reactions that they catalyze. Inhibitors are the molecules that reduce the activity of an enzyme and many reversible inhibitors are also effective drugs. Alzheimers disease is a progressive degenerative disease of the central nervous system. It is one of the most common type of dementia with a frequency of 5 % diseased from the age of 50 and over and 50 % diseased of people over the age of 80. Acetylcholine is a transducer of nerve impulses that regulates memory and processes of learning and it maintains the level of consciousness. Acetylcholinesterase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of acetylcholine by interrupting the transmission of a nervous pulse. Various acetylcholine inhibitors are good drugs for Alzheimer disease. According to the cholinergic theory, in Alzheimers disease the cholinergic neurons are dying away and the synthesis of acetylcholine is reduced. The inhibitors are slowing down the hydrolysis of acetylcholine and there by increasing its concentration, enabling normal functioning of the brain. In this thesis, the inhibition effectiveness of alkaloid huperzine A and monoterpene  $\beta$ -pinene on acetylcholinesterase activity, were tested. According to the experimental data it can be concluded that they are both good acetylcholinesterase inhibitors and that they could be used in the treatment of Alzheimers disease.

**Keywords:** enzymes, inhibition, acetylcholine, acetylcholinesterase, Alzheimers disease, huperzine A,  $\beta$ -pinene

**Thesis contains:** 27 pages, 11 pictures, 5 tables, 18 literary references.

**Original in:** Croatian.

#### Defence committee:

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

**Defence date:** September 28<sup>th</sup>, 2018.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, RuđeraBoškovića 35.

*Završni rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Franka Burčula, tijekom mjeseca rujna, 2018. godine.*

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

*Zahvaljujem svom strpljivom dvogodišnjem mentoru, doc. dr. sc. Franku Burčulu na pomoći prilikom eksperimentalnog dijela rada i savjetima prilikom pisanja ovog završnog rada, kao i tijekom studiranja općenito. Također zahvaljujem članovima Zavoda za biokemiju na nesebičnoj pomoći, a posebno Vladimiru Jelaska-Relji što mi je pravio društvo dok sam čekala da uređaj napravi svoje mjerenje (i radio pufer).*

*Hvala svim profesorima, kolegama i suradnicima Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu što su me motivirali i pomagali mi tijekom mog studiranja.*

*Zahvaljujem prijatelju i (bivšem) kolegi Marijanu Božinoviću Karauzu na velikoj pomoći i na svim korisnim savjetima koji su mi olakšali ovaj studij.*

*Posebna zahvala mojoj obitelji, prijateljima i dečku Mati zato što su vjerovali u mene i omogućili mi da dođem do ovdje.*

*Barbara Novosel*



## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA :

*Ispitati inhibicijsko djelovanje huperzina A i  $\beta$ -pinena na enzim acetilkolinesterazu (AChE) pomoću Ellmanove metode*

## SAŽETAK

Enzimi su molekule neophodne za život, a po sastavu su uglavnom proteini. Kataliziraju reakcije tako da stabiliziraju prijelazno stanje i mogu ubrzati reakciju za faktor koji može biti veći od milijun. Nedostatak samo jednog enzima u tijelu može biti koban. Visoko su specifični za svoje reaktante (supstrate) i reakcije koje kataliziraju. Inhibitori su molekule koje smanjuju aktivnost enzima, mnogi inhibitori su i učinkoviti lijekovi. Alzheimerova demencija je progresivna degenerativna bolest središnjeg živčanog sustava. To je najčešća vrsta demencije koja se pojavljuje s učestalošću od 5 % oboljelih u dobi iznad 50 godina, te 50 % oboljelih u osoba iznad 80 godina. Acetilkinolin je prijenosnik živčanih impulsa koji regulira procese pamćenja i učenja te održava razinu svijesti. Acetilkinolinesteraza je enzim koji katalizira hidrolizu acetilkolina prekidajući tako prijenos živčanog impulsa. Razni inhibitori acetilkolinesteraze pokazali su se kao dobri lijekovi za ublažavanje simptoma Alzheimerove bolesti. Prema kolinergičnoj teoriji kod Alzheimerove bolesti dolazi do odumiranja kolinergičnih neurona i smanjene sinteze acetilkolina. Inhibitori usporavaju hidrolizu acetilkolina i time se povećava njegova koncentracija što omogućava normalnije funkcioniranje mozga. U ovom radu je ispitano inhibicijsko djelovanje alkaloida huperzina A i monoterpena  $\beta$ -pinena na aktivnost acetilkolinesteraze. Prema eksperimentalnim podacima može se zaključiti da su oni dobri inhibitori acetilkolinesteraze te bi se kao takvi mogli koristiti u liječenju Alzheimerove bolesti.

**Ključne riječi:** enzimi, inhibicija, acetilkolin, acetilkolinesteraza, Alzheimerova bolest, huperzin A,  $\beta$ -pinen

## SUMMARY

Enzymes are molecules that are necessary for life and by structure they are mainly proteins. They catalyze reactions in a way that they stabilize transitional state and can speed up the reaction by a factor that can be bigger than a million. The deficiency of only one enzyme can be fatal for the body. They are highly specific for the reactants (substrates) of the reactions that they catalyze. Inhibitors are the molecules that reduce the activity of an enzyme and many reversible inhibitors are also effective drugs. Alzheimers disease is a progressive degenerative disease of the central nervous system. It is one of the most common type of dementia with a frequency of 5 % diseased from the age of 50 and over and 50 % diseased of people over the age of 80. Acetylcholine is a transducer of nerve impulses that regulates memory and processes of learning and it maintains the level od consciousness. Acetylcholinesterase is an enyzme that catalyzes the hydrolysis of acetylcholine by interrupting the transmission of a nervous pulse. Various acetylcholine inhibitors are good drugs for Alzheimer disease. According to the cholinergic theory, in Alzheimers disease the cholinergic neurons are dying away and the synthesis of acetylcholine is reduced. The inhibitors are slowing down the hydrolysis of ACh and there by increasing its concentratitoin, enabling normal functioning of the brain. In this thesis, the inhibition effectiveness of alkaloid huperzine A and monoterpene  $\beta$ -pinene on acetylcholinesterase activity, were tested. According to the experimental data it can be concluded that they are both good acetylcholinesterase inhibitors and that they could be used in the treatment of Alzheimers disease.

**Keywords:** enyzmes, inhibition, acetylcholine, acetylcholinesterase, Alzheimers disease, huperzine A,  $\beta$ -pinene

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO .....	2
2.1. Enzimi .....	2
2.1.1. Klasifikacija enzima .....	4
2.1.2. Inhibicija enzima .....	6
2.2. Acetilholin i acetilkolinesteraza .....	7
2.2.1. Inhibitori acetilkolinesteraze .....	8
2.3. Alzheimerova bolest .....	9
2.4. Huperzin A .....	12
2.4.1. Djelovanje huperzina A .....	13
2.5. $\beta$ -pinen .....	14
2.6. Spektrofotometrija .....	16
2.6.1. Ellmanova metoda .....	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	19
4. REZULTATI .....	21
5. RASPRAVA .....	24
6. ZAKLJUČAK .....	25
7. LITERATURA .....	26

## 1. UVOD

Enzimi su makromolekule koje kataliziraju reakcije u biološkim sustavima. Reakcijom enzima sa supstratom prvo nastaje prijelazno stanje koje je stabilizirano enzimom. Acetilkinesteraza (AChE) je enzim koji katalizira reakciju hidrolize neuroprijenosnika acetilkolina. AChE katalizira do 10 000 molekula acetilkolina u sekundi. Aktivno mjesto ovog enzima je udubina na površini enzima duboka 20 Å.

Alzheimerova demencija je progresivna, degenerativna i smrtonosna bolest tkiva mozga; trenutno se broji više od 30 milijuna oboljelih u svijetu. Kod ove bolesti odumiru kolinergični neuroni (kolinergična hipoteza), a inhibicijom hidrolize acetilkolina smanjuje se njegova razgradnja čime je omogućeno normalnije funkcioniranje mozga. Inhibicijom AChE i drugih kolina moguće je olakšati simptome Alzheimerove bolesti u ranim fazama.

Huperzin A (hupA) je seskviterpenski alkaloid koji se može izolirati iz mnogih ljekovitih biljaka roda *Lycopodium*.  $\beta$ -Pinen je najzastupljeniji terpen u biljkama, a može se dobiti i biosintetski ciklizacijom geranil-pirofosfata (GPP).

U ovom radu spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu dokazana je inhibicijska djelotvornost hupA i  $\beta$ -pinena na AChE.

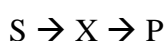
## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Enzimi

Enzimi su biološki katalizatori koji povećavaju brzinu raznih reakcija. Karakterizira ih visoka selektivnost i specifičnost za supstrat. Skoro svi enzimi su proteini, ali nisu svi proteini enzimi. Da bi enzim bio aktivan potreban je kofaktor, mala molekula koja može biti organska (tada se naziva koenzim) ili metal. Enzim bez kofaktora se naziva apoenzimom, a s kofaktorom holoenzim. Prostetička skupina je koenzim koji je čvrsto vezan na enzim. Neki od češćih koenzima su tiamin-pirofosfat (TPP), flavin-adenin-dinukleotid (FAD), biotin, koenzim A, tetrahidrofolat itd.

Enzimi mijenjaju brzinu kemijske reakcije, ali ne utječu na njenu spontanost. Nemaju moć promijeniti ishod reakcije niti promijeniti položaj kemijske ravnoteže, ali će zato ubrzati kemijsku reakciju tako da će sniziti slobodnu energiju aktivacije. Neke reakcije trajale bi stoljećima bez prisustva enzima. Postoje enzimi koji koriste energiju ATP-a (adenozin-trifosfata) kako bi mogli transportirati molekule kroz membranu. U tom slučaju nastaje kemijski i električni gradijent koji su također izvor energije. Ta energija se koristi za slanje živčanih impulsa.

U reakciji kataliziranoj enzimom on reagira sa supstratom koji se zatim prevodi u prijelazno stanje, a nakon toga u produkt (ako je povoljan  $\Delta G$  reakcije).



Gdje S označava supstrat, X prijelazno stanje, a P produkt.

Razlika između slobodne energije prijelaznog stanja (X) i slobodne energije supstrata (S) je energija aktivacije (Gibbsova slobodna energija aktivacije). Vezanje supstrata i kataliza se događaju na malom dijelu enzima koji se naziva aktivno mjesto enzima.

Prije katalize potrebno je da se supstrat veže za enzim. Postoje dva modela po kojima se supstrat veže na enzim: model ključ-brava i inducirano pristajanje. U modelu ključ-brava aktivno mjesto enzima odgovara obliku supstrata, a u modelu induciranog pristajanja aktivno mjesto enzima će poprimiti oblik supstrata tek nakon njegovog vezanja.

U reakciji koja je katalizirana enzimom prvo nastaje enzim-supstrat kompleks (ES). Supstrat se veže na aktivno mjesto enzima. Kofaktor se također veže na aktivno mjesto enzima (ako je prisutan). ES kompleks je nestabilan tako da on brzo prelazi u produkt ili u supstrat (ovisno o  $\Delta G$  reakcije). Smanjenje energije aktivacije se događa prilikom vezanja supstrata na enzim.

Enzimska kinetika bavi se proučavanjem brzina kemijskih reakcija koje su katalizirane enzimom. Michaelis-Mentenova jednadžba objašnjava kinetiku enzimski kataliziranih reakcija:

$$V_o = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (1)$$

gdje je:

$V_o$  – početna brzina kemijske reakcije;

$V_{\max}$  – maksimalna brzina kemijske reakcije;

[S] – koncentracija supstrata;

$K_M$  – koncentracija supstrata kad je brzina reakcije jednaka  $V_{\max}/2$ .

Pomoću Michaelis-Mentenove jednadžbe može se odrediti red reakcije (prema brzini kemijske reakcije).<sup>1</sup>

### 2.1.1. Klasifikacija enzima

Enzimi se klasificiraju prema tipu reakcije koju kataliziraju. Prema nekim imenima enzima ne može se zaključiti koji tip reakcije katalizira taj enzim. Zato je 1964. godine Međunarodna unija za biokemiju (IUB) uvela nomenklaturu enzima.<sup>1</sup>

Svaki enzim ima svoj broj koji započinje s „EC“ i slijede ga 4 broja odvojena točkom i zarezom. Glavne klase enzima prikazane su u Tablici 1. Osim klase, postoje i podklasa, skupina i podskupina.<sup>2</sup>

**Tablica 1.** Nomenklatura enzima<sup>1</sup>

	<b>Klasa</b>	<b>Tip reakcije</b>	<b>Primjer</b>
EC 1	oksidoreduktaze (engl. <i>oxidoreductases</i> )	oksidacija-redukcija	malat- dehidrogenaza
EC 2	transferaze (engl. <i>transferases</i> )	prijenos skupina	heksokinaza
EC 3	hidrolaze (engl. <i>hydrolases</i> )	hidroliza	kimotripsin
EC 4	liaze (engl. <i>lyases</i> )	dodatak ili gubitak skupina uz nastanak dvostruke veze	fumaraza
EC 5	izomeraze (engl. <i>isomerases</i> )	izomerizacija	aldolaza
EC 6	ligaze (engl. <i>ligases</i> )	spajanje dvaju supstrata uz ATP (adenozin-trifosfat)	aminoacil-tRNA- sintetaza



Primjer klasifikacije enzima acetilkolinesteraze (AChE)<sup>3</sup>:

---

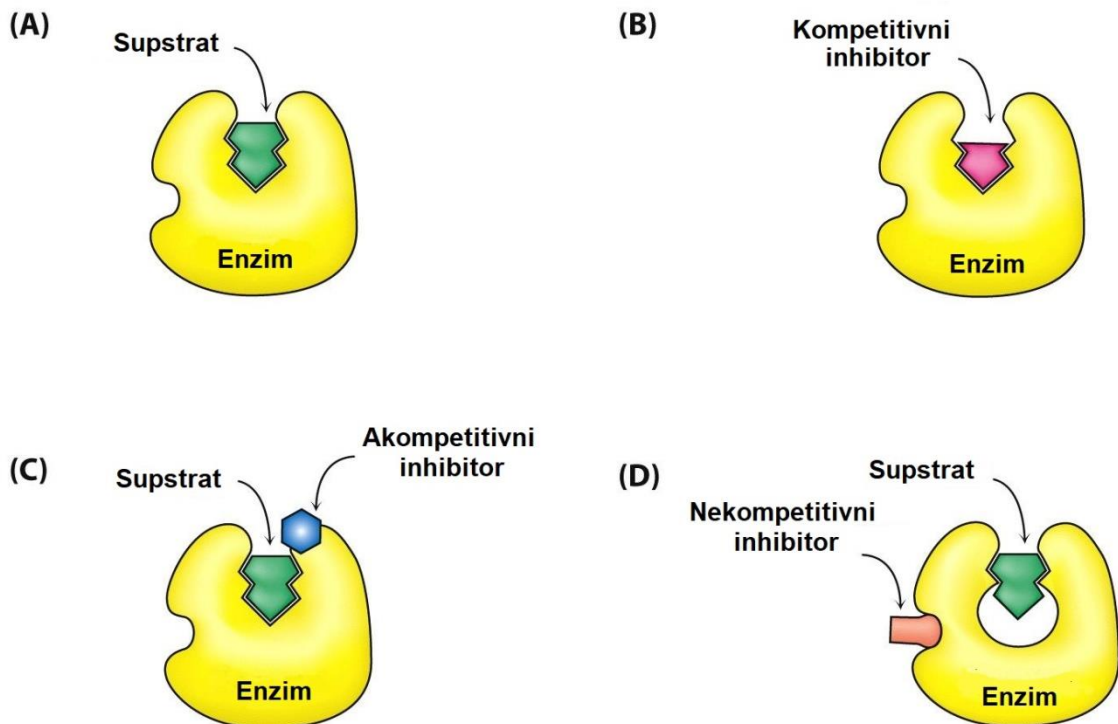
EC 3.1.1.7.

- EC → engl. *Enzyme Commission number*
  - EC 3 → Hidrolaze
  - EC 3.1. → Djeluju na esterske veze
  - EC 3.1.1. → Hidrolaze karboksilnih estera
  - EC 3.1.1.7. → Acetilkolinesteraza (djeluje na acetilkolin)
-

### 2.1.2. Inhibicija enzima

Neke molekule i ioni mogu inhibirati enzime vežući se na njih reverzibilno ili ireverzibilno (neki lijekovi). Vrste reverzibilne inhibicije su kompetitivna, akompetitivna i nekompetitivna inhibicija. Te vrste se određuju na način na koji se enzim veže. Inhibicija enzima raznim inhibitorima omogućuje kontrolirani tijek nekih reakcija u biološkim sustavima.

Kod kompetitivne ili konkurentske inhibicije na enzim se veže supstrat ili enzim tako da može nastati enzim-supstrat (ES) kompleks ili kompleks enzim-inhibitor (EI). Kod ovog tipa inhibicije nikada se neće vezati i supstrat i inhibitor (ESI). Akompetitivnu inhibiciju karakterizira nastanak kompleksa ESI. Prvo će se vezati supstrat na enzim gdje nastaje ES kompleks, a nakon toga će se vezati inhibitor. Nekompetitivna inhibicija je vrsta inhibicije enzima u kojoj se supstrat i enzim vežu na različita mjesta enzima.<sup>1</sup>



Slika 1. Vrste inhibicije<sup>1</sup>

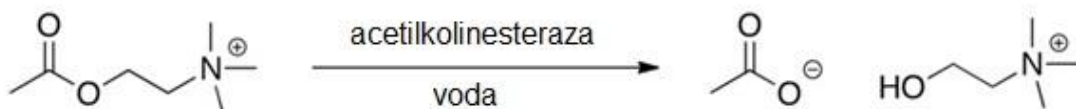
## 2.2. Acetilolin i acetilkolinesteraza

**Acetilolin (ACh)** je prvi otkriveni neuroprijenosnik. Neuroprijenosnici prenose živčane impulse kroz sinapse. Dobiva se iz acetil koenzima A (acetyl-CoA) i kolina uz enzim kolin-acetil-transferazu (ChAT). Neuron koji koristi acetilolin kao prijenosnik nazivaju se kolinergični neuroni i nalaze se u mozgu. Acetilolin djeluje u dvije vrste receptora-nikotinski i muskarinski (po nikotinskoj i muskarinskoj kiselini).<sup>4</sup>

**Acetilolinesteraza (AChE, EC 3.1.1.7)** je jedan od najdjelotvornijih enzima s okretnim brojem ( $k_{cat}$ ) od 16 000 do 25 000  $s^{-1}$  koji se sintetizira u živcima, mišićima i određenim hematopoetskim stanicama. Acetilolinesteraza u sinapsi cijepa acetilolin na acetat i kolin. Kolin se vraća natrag u neurone kako bi se resintetizirao acetilolin.

Acetilolinesteraza izolirana iz pacifičke električne raže (*Tetronarce californica* Ayres - sinonim: *Torpedo californica* Ayres, TcAChE) je enzim koji je jako sličan ljudskoj AChE i pomoću njega je razjašnjena struktura ljudske AChE i mehanizam hidrolize acetilkolina. Postoje četiri dijela aktivnog mjesta ovog enzima koji sudjeluju u katalizi:

1. esterazno mjesto (ovdje se nalazi katalitička trijada)
2. oksianionska rupa (sastoji se od glicina i alanina)
3. anionsko mjesto (ovdje se veže kolin)
4. acilni džep (veže se acilni dio ACh)<sup>4</sup>



**Slika 2.** Hidroliza ACh uz enzim AChE

Acetilolinesteraza u svom aktivnom mjestu sadrži katalitičku trijadu glutamata, histidina i serina. Kisikov atom acetilkolina veže se na vodikov atom serina, a kisikov atom serina veže se na ugljikov atom acetilkolina. Pritom dolazi do pucanja veze i

otpušta se acetat. Acetat je još uvijek vezan za serin, a kolin je slobodan. Vezanjem vode otpustit će se acetat, a katalitička trijada se vraća u početni oblik kako bi se mogla dalje vezati nova molekula acetilkolin.



**Slika 3.** Acetilkinesteraza (AChE), PBD: 4X3C

### **2.2.1. Inhibitori acetilkolinesteraze**

Acetilkinesterazni inhibitori (AChEI) ili anti-kolinesteraze su specifične molekule koje smanjuju aktivnost acetilkolinesteraze. AChEI djeluju kao insekticidi i bojni otrovi, ali češće se koriste u medicinske svrhe, npr. za liječenje Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti, glaukoma, shizofrenije, autizma itd. Neki ih koriste da bi povećali mogućnost za lucidno sanjanje.<sup>5</sup>

### 2.3. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest je progresivna, neurodegenerativna i neizlječiva bolest koja je 1906. godine prvi put opisana od strane njemačkog psihijatra Aloisa Alzheimerera pod nazivom „bolest zaboravljanja“. Iako su simptome bolesti prepoznali poznati antički filozofi i znanstvenici, kao što su Platon i Solon, oni su je pripisali starosti, tako da se dugo smatralo da starija životna dob uzrokuje sama po sebi demenciju i mentalne bolesti. Alzheimer je, prateći razvoj bolesti kod 51-godišnje žene Auguste Deter 1901. prvi javno progovorio i opisao simptome bolesti kojoj je kasnije njegov prijatelj, mentor i kolega znanstvenik Emil Kraepelin dao ime Alzheimerova bolest 1910. u svojoj knjizi „Priručnik psihijatrije“.

Ova bolest je najčešća vrsta demencije. Prvi simptom bolesti je poremećaj pamćenja i on je najdominantniji od svih simptoma bolesti. Potom se javljaju i ostali simptomi, a u koje spadaju poremećaj govornih funkcija, poteškoće u vršenju osnovnih životnih aktivnosti, gubitak prostorne i vremenske orijentacije, promjena osobnosti itd.<sup>6</sup>

Uzrok Alzheimerove bolesti nije poznat, unatoč brojnim istraživanjima te velikom broju teorija. Većina znanstvenika smatra da nastaje interakcijom gena s okolišnim čimbenicima. Poznata su tri gena odgovorna za nastanak bolesti:

1. APP (amiloidni prekursori protein),
2. PSEN1 (presenilin 1),
3. PSEN2 (presenilin 2).<sup>7</sup>

Postoje četiri faze bolesti. Prva faza se može nazvati „preddementna faza“. Simptome koji se javljaju u ovoj fazi većina ljudi zanemari ili jednostavno predstavi kao zbunjenost uslijed stresa ili starenja. Bolest u prvoj fazi se može očitovati u laganim poteškoćama u obavljanju kompliciranih životnih aktivnosti ili gubitku kratkotrajnog pamćenja. Ostali simptomi koji se razvijaju su blagi problemi u organizaciji života, pojava depresije, nedostatak apatije, nadraženost itd.

U drugoj fazi, koja se može nazvati „rana faza“, nastaju poteškoće pri usvajanju novih informacija, rast zaboravljivosti te problemi pri kretanju. Nastaju i problemi u govoru, i često tzv. „petljanje jezika“ osoba u ovoj fazi.

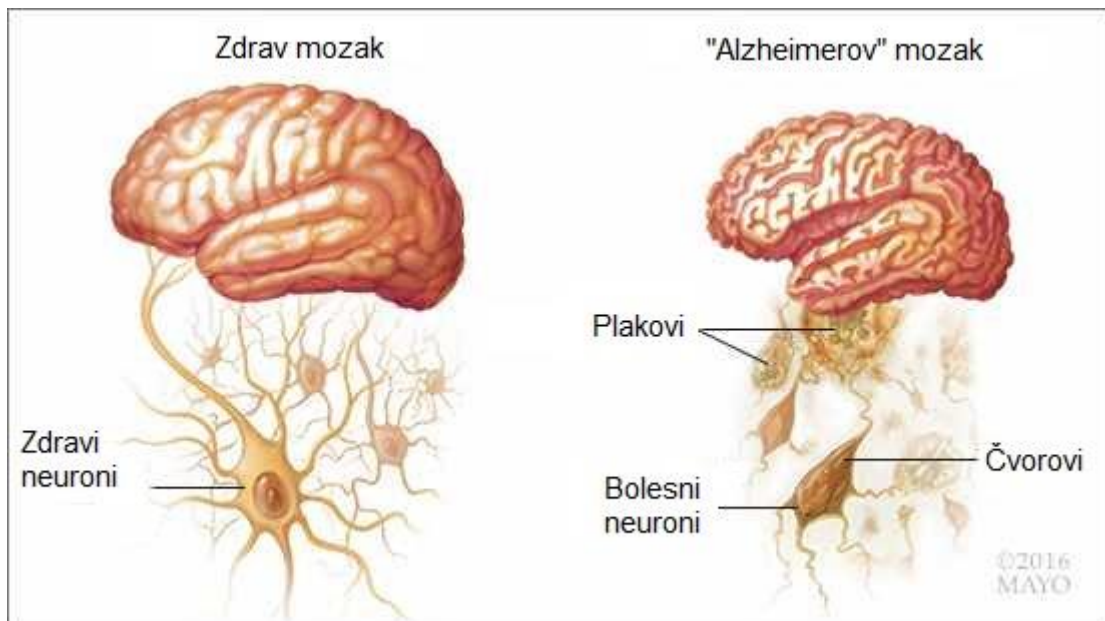
I dok u prethodne dvije faze osobe oboljele od Alzheimerera mogu izvršavati većinu zadataka i obaveza u svakodnevnom životu, u „umjerenj fazi“ već dolazi do potrebe za asistiranjem i pomaganjem oboljeloj osobi. Dok je u ranijim stadijima bolesti dugoročno pamćenje nezahvaćeno, u ovoj fazi dolazi i do njegova gubitka. Govor često postaje nerazumljiv, a bolesnik ima i problem prepoznavanja najbližih članova obitelji. Neuropsihijatrijske promjene i promjene u ponašanju postaju još očiglednije, a normalna je i povećana agresija te nagli izljevi bijesa.

U zadnjoj fazi, tzv. „uznapredovanoj fazi“, bolesnik nije u mogućnosti složiti smislenu rečenicu, ne može vršiti niti osnovne životne funkcije.

Trenutno ne postoji lijek za ovu bolest, ali postoje neki tretmani za smanjivanje učinkovitosti i simptoma bolesti. Prema kolinergičnoj hipotezi kod ove bolesti dolazi do odumiranja kolinergičnih neurona. Alzheimerova bolest se tretira inhibitorima acetilkolinesteraze (ACh) koji povećavaju kolinergičke aktivnosti mozga. Koriste se:

1. Donepezil - daje najbolje rezultate pa se najčešće primjenjuje,
2. Rivastigmin - ima nuspojave u vidu povraćanja i mučnina,
3. Takrin - pogoršava funkcije jetre,
4. Galantamin.

Trenutno u svijetu oko 30 milijuna ljudi živi s Alzheimerovom bolesti. Većina od tih ljudi oboljeva nakon 65. godine, iako postoji mogućnost pojave simptoma i prije toga.<sup>8</sup>



**Slika 4.** Mozak zdrave osobe i mozak osobe oboljele od Alzheimerove bolesti

## 2.4. Huperzin A

Huperzin A (hupA) je seskviterpenski alkaloid i nootropik koji je pronađen u mnogim biljkama, među kojima su *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trevis (kineska huperzija), *Huperzia elmeri* (Herter) Holub, *Huperzia carinata* (Desv. ex Poir.) Trevis. i *Huperzia aqualupiana* (Spring) Rothm. Te biljke spadaju u rod *Lycopodium*, a huperzin A se u njima pojavljuje samo kao (-) enantiomer. Spoj se dobiva ekstrakcijom iz osušenih nadzemnih dijelova vrste *Huperzia serrata* Thunb. s prinosom od samo 0,0047-0,025%, ovisno o vremenu sakupljanja biljnog materijala i primijenjenoj metodi ekstrakcije.<sup>9</sup> Huperzin A se može dobiti i sintezom u laboratoriju.

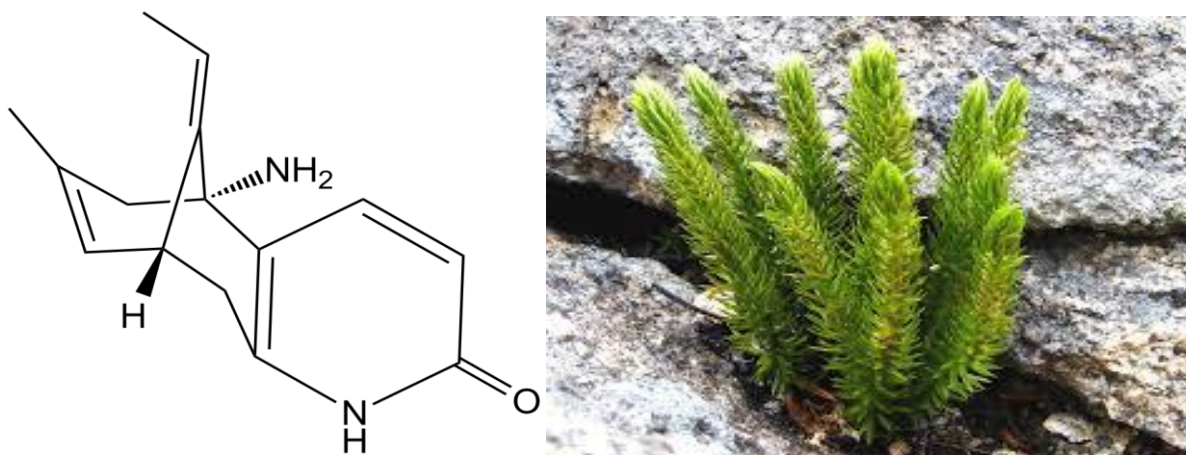
Kineska huperzija je ljekovita biljka koje se koristi više od 1000 godina za liječenje raznih bolesti kao što su epilepsija, reuma, shizofrenija i mijastenija gravis (slabost mišića). Najrasprostranjenija je u Kini, ali može se pronaći i u Rusiji, Japanu, Koreji, Australiji, Indiji, Indoneziji i Tajlandu.<sup>10</sup> Osim huperzina A, iz kineske huperzije su izolirani i drugi oblici huperzina, alkaloidi (triterpeni, flavoni, fenolne kiseline (klorogenska i ferulična) i drugi fenolni spojevi).<sup>11</sup>

Klinički je dokazano da hupA ublažava simptome Alzheimerove bolesti na način da inhibira acetilkolinesterazu (AChE). Kod pacijenata koji su uzimali hupA primijećeno je poboljšanje kognitivnih funkcija. Studije su provedene u Kini na ljudima koji boluju od Alzheimerove bolesti.

HupA je reverzibilni kompetitivni inhibitor AChE, ali ne utječe na kolin acetil-transferazu (ChAT). Pokazao se kao bolji inhibitor od nekih koji se nalaze u lijekovima za Alzheimerovu bolest (takrin, galantamin i rivastigmin), a uzrokuje manje nuspojave od njih. Također je utvrđeno da ne može doći do tolerancije ili smanjenja inhibicijskog učinka hupA.

Bez obzira na jako dobro inhibicijsko djelovanje hupA na AChE, on se još uvijek ne koristi kao službeni lijek za Alzheimerovu bolest kod nas (u Kini od 1994. godine) zato što nije dovoljno istraženo njegovo dugotrajno djelovanje.<sup>12</sup>



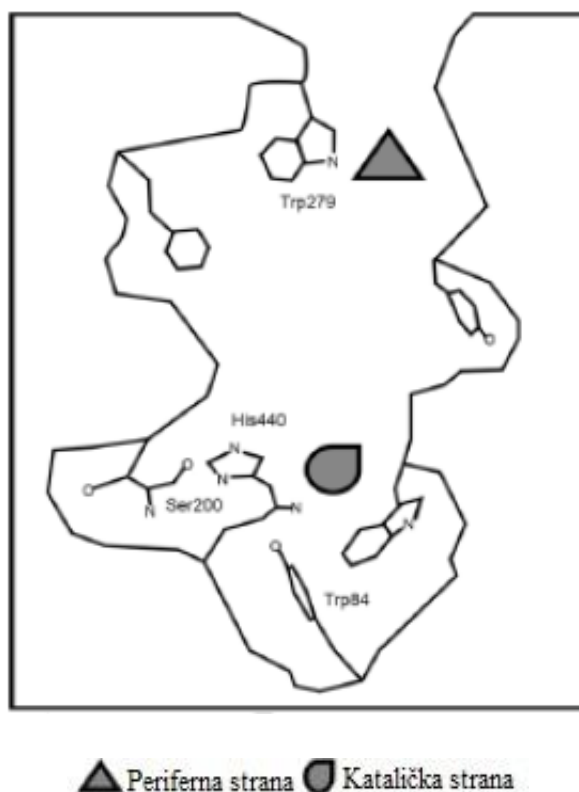


**Slika 5.** Struktura huperzina A i kineska huperzija

#### **2.4.1. Djelovanje huperzina A**

Huperzin A se veže na aktivno mjesto enzima acetilkolinesteraze (AChE) i tako onemogućuje vezanje acetilkolina čime se povećava njegova koncentracija u sinapsama. Rendgenskom kristalografijom AChE iz pacifičke električne raže (*Torpedo californica* Ayers) i huperzina A vidljivo je da amino skupina huperzina A reagira s triptofanom 279 na ulazu u aktivno mjesto enzima. Drugo vezno mjesto nalazi se iznad triptofana 84 u unutrašnjosti katalitičkog mjesta. Huperzin A sadrži pozitivno nabijen dušikov atom tako da se vezanje događa na području oksianionske rupe.<sup>12</sup>

Huperzin A i acetilkolin (ACh) posjeduju neke slične značajke u strukturi. Udaljenost kvarternog dušika i karbonilne skupine ACh jednaka je udaljenosti amino skupine i karbonilne skupine huperzina A.



**Slika 6.** Katalitičko mjesto acetilkolinesteraze (AChE) na koje se veže hupA<sup>12</sup>

## 2.5. $\beta$ -Pinen

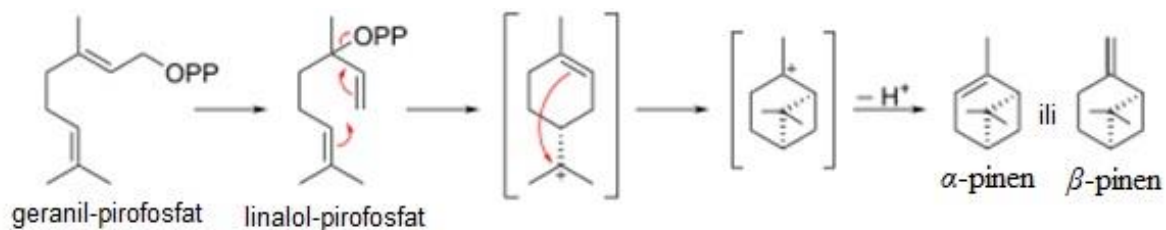
$\beta$ -Pinen je bezbojan biciklički monoterpen topljiv u alkoholu, ali ne u vodi. Izoliran je iz mnogih biljaka među kojima su *Pinus sylvestris* L. (šumski bor), *Artemisia annua* L., *Pinus nigra ssp. Dalmatica* (Vis.) Franco itd.<sup>13, 15</sup>

Najbolje inhibicijsko djelovanje iz biljke *P. nigra ssp. Dalmatica* je pokazala smjesa  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinena u omjeru 3:2.<sup>15</sup> Osim u ovoj biljci, racemična smjesa  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinena pronađena je i u eukaliptičnom ulju.

Borovo ulje ima antibakterijsko, antifungalno, antivirusno, antiseptičko i antineuralgično svojstvo, dobar je diuretik, koristi se za ublažavanje simptoma bolesti dišnog sustava i kao insekticid.

*Artemisia annua* L. je biljka iz Kine koja se koristi za liječenje malarije i groznice. Iz eteričnog ulja *A. annue* izoliran je  $\beta$ -pinen. Osim njega, u ovoj biljci su izolirane i mnoge druge tvari kao što su artemizijski ketoni, artemizijski alkohol itd.<sup>14</sup>

$\beta$ -Pinen i  $\alpha$ -pinen dobivaju se biosintezom iz geranil-pirofosfata (GPP), međuprodukta u 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reduktaznom putu, reakcijom ciklizacije.



**Slika 7.** Biosinteza  $\beta$ -pinena (ili  $\alpha$ -pinena)<sup>16</sup>

$\beta$ -Pinen je moguće dobiti i izolacijom iz bakterija.

## 2.6. Spektrofotometrija

Spektrometrija je grana znanosti koja proučava efekte vezane uz emisiju i apsorpciju elektromagnetskog zračenja i njegovog djelovanja, kemijski sastav i strukturu tvari. Tako nastali emisijski (ili apsorpcijski) spektri karakteristični su za određenu tvar.

Spektroskopske metode koje se najčešće primjenjuju u organskoj kemiji su: nuklearna magnetska rezonancija (NMR), infracrvena (IR) i ultraljubičasta/vidljiva (UV-Vis) spektroskopija, te spektrometrija masa (MS). Prije primjene metoda određeni spoj treba odvojiti od sporednih produkata tvari. Najčešći postupci za to su destilacija tekućina, kristalizacija krutina ili kromatografija.

**UV-VIS –spektrofotometrija** ili ultraljubičasta i vidljiva spektrofotometrija je tehnika koja je bazirana na apsorpcijskoj spektroskopiji u ultraljubičastom i vidljivom dijelu spektra. Spektrofotometrijom se može izvoditi i kvalitativna i kvantitativna analiza. Kvalitativna analiza se zasniva na apsorpcijskom spektru uzorka, a ovisi o njegovom sastavu i strukturi. Kvantitativna analiza se zasniva na Lambert-Beerovom zakonu. Do apsorpcije dolazi uslijed elektronskih prijelaza u molekulama. Koristi se za kvantitativno određivanje prijelaznih metala i organskih komponenti u otopini.<sup>17</sup>

Koncentracija analizirane vrste određuje se preko Lambert-Beerovog zakona koji glasi:

$$A = -\log \frac{P}{P_0} = abc \quad (2)$$

Pojašnjenje simbola iz izraza:

A – apsorbancija (bezdimenzijska veličina);

a – konstanta (molarna apsorptivnost);

P<sub>0</sub> – snaga upadnog zračenja;

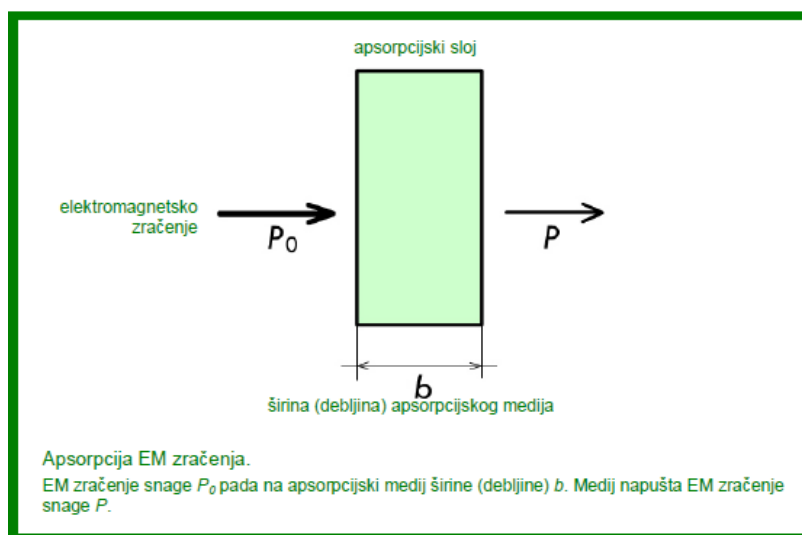
P – snaga propuštenog zračenja;

c – koncentracija tvari u otopini uzorka;

b – debljina kivete.

Kada je koncentracija izražena u mol L<sup>-1</sup>, a debljina kivete u cm onda je  $a = \epsilon$ . To je molarni apsorpcijski koeficijent mjerne jedinice Lmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

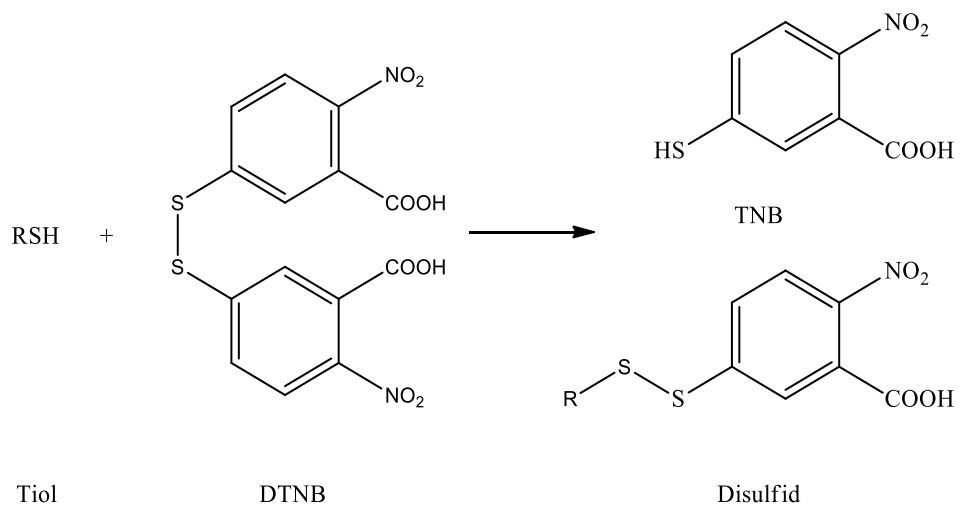
Analiza se provodi uređajem koji se naziva spektrofotometar. Spektrofotometri se dijele na jednozračne i dvozračne spektrofotometre. Komponente koje sadržava svaki spektrofotometar su sljedeće: izvor zračenja, selektor valnih duljina (filteri, monokromatori), držač uzoraka, detektor, sustav za obradu i prikaz podataka.<sup>17</sup>



Slika 8. Apsorpcija EM zračenja<sup>18</sup>

### 2.6.1. Ellmanova metoda

Ellmanova metoda je spektrofotometrijska metoda koja se koristi za procjenu slobodnih tiolnih skupina. Tiol koji nastaje u reakciji enzima AChE i acetiltiokolina (ATChI) reagira s DTNB-om (Ellmanov reagens) i nastaje 2-nitro-5-tiomerktobenzojeva kiselina (TNB<sup>-</sup>, žute boje) koji se zatim ionizira do TNB<sup>2-</sup> pri neutralnoj ili alkalnoj pH vrijednosti. Drugi produkt ove reakcije je miješani disulfid. Ova metoda služi i za mjerenje aktivnosti acetilkolinesteraze. George L. Ellman je prvi put sintetizirao DTNB 1959. godine oksidacijom 2-nitro-5-klorobezaldehida u karboksilnu kiselinu. Tiol se uvodi preko natrijevog sulfida i nastaju monomeri koji se zatim spajaju uz jod. Ovaj reagens koristi se zbog specifičnosti za tiolne skupine, visoke molarne ekstincije i zbog brze reakcije.<sup>4</sup>



**Slika 9.** Reakcija Ellmanovog reagensa sa slobodnom tiolnom skupinom

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

U eksperimentalnom dijelu rada korišten je enzim acetilkolinesteraza (AChE) koji je izoliran iz elektrofora električne jegulje (Tip V-S). Kao supstrat je korišten acetiltiokolin jodid (ATChI), a kao inhibitor huperzin A (hupA) otopljen u vodi i etanolu i  $\beta$ -pinen otopljen u etanolu. Korištena je modificirana spektrofotometrijska metoda po Ellmanu uz tiolni reagens ditio-nitrobenzojevu kiselinu (DTNB).



Slika 10. Eksperimentalni dio rada

Otopine koje su korištene u eksperimentalnom dijelu rada:

- Otopina fosfatnog pufera pH=8 i pH=7 (0,1 M)
- DTNB otopljen u fosfatnom puferu pH=7 + 0,12 mM NaHCO<sub>3</sub> (0,3 mM)
- AChE otopljen u fosfatnom puferu pH=8 (0,03 U mL<sup>-1</sup>)
- Supstrat ATChI (0,5 mM)
- Otopina inhibitora huperzina A (hupA) u vodi (konačnih koncentracija u sustavu 1,88 μmol L<sup>-1</sup>, 0,95 μmol L<sup>-1</sup>, 0,19 μmol L<sup>-1</sup>, 0,094 μmol L<sup>-1</sup>, 0,019 μmol L<sup>-1</sup>)

- Otopina inhibitora huperzina A (hupA) u etanolu (konačnih koncentracija u sustavu 1,88  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , 0,94  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , 0,19  $\mu\text{mol L}^{-1}$  i 0,094  $\mu\text{mol L}^{-1}$ )
- Otopina inhibitora  $\beta$ -pinena u etanolu (koncentracija 334  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , 167  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , 33  $\mu\text{mol L}^{-1}$ )

### Opis rada

Otopine enzima AChE, supstrata ATChI, reagensa DTNB-a i fosfatnog pufera pH=8 uliju se svaka u svoju kadicu. Otopine se dodaju redom kako je navedeno u Tablici 2. Zadnja otopina (ATChI) dodaje se malo prije nego što se započne mjerenje zato što će se njenim dodatkom započeti reakcija.

**Tablica 2.** Shema dodatka volumena određene otopine (volumeni su u  $\mu\text{L}$ )

	Kontrola H <sub>2</sub> O	BL H <sub>2</sub> O	Kontrola EtOH	BL EtOH	Uzorak	BL Uzorak
Pufer	190	200	180	190	180	190
DTNB	10	10	10	10	10	10
Uzorak	0	0	10 (EtOH)	10 (EtOH)	10	0
AChE	10	0	10	0	10	10
ATChI	10	10	10	10	10	10

Mjerenje se vršilo pomoću višekanalnog čitača mikrotitarskih pločica „Sunrise“ (Tecan, GmbH, Austrija) uz automatsko miješanje i pohranjivanje podataka na računalo.

Postotak inhibicije pokazuje učinkovitost nekog inhibitora i računa se prema formuli:

$$\% = \frac{A_K - A_S}{A_K} * 100 \quad (3)$$

Gdje  $A_K$  označava apsorbanciju kontrolne otopine, a  $A_S$  apsorbanciju otopine supstrata tj. otopine s inhibitorom.



#### 4. REZULTATI

U eksperimentalnom dijelu rada ispitano je inhibicijsko djelovanje hupA i  $\beta$ -pinena na aktivnost AChE. HupA otopljen u vodi pokazuje jači inhibicijski učinak od hupA otopljenog u etanolu.

Povećanjem koncentracija uzorka (inhibitora) povećava se i postotak inhibicije uzorka na enzim AChE. Kod hupA otopljenog u vodi postotak inhibicije AChE kod koncentracije od  $1,88 \mu\text{mol L}^{-1}$  je 90,8 %, a kod iste koncentracije hupA otopljenog u etanolu postotak inhibicije je 78,2 %. Pri manjim koncentracijama hupA također pokazuje dobru sposobnost inhibicije AChE (u vodi i u etanolu).

$\beta$ -Pinen također pokazuje dobar inhibicijski učinak na AChE, ali slabiji od hupA. Kod koncentracije od  $334 \mu\text{g L}^{-1}$  postotak inhibicije  $\beta$ -pinen za AChE je 94,9 %.

**Tablica 3.** Inhibicijski učinak hupA ( $\text{H}_2\text{O}$ ) pri različitim koncentracijama

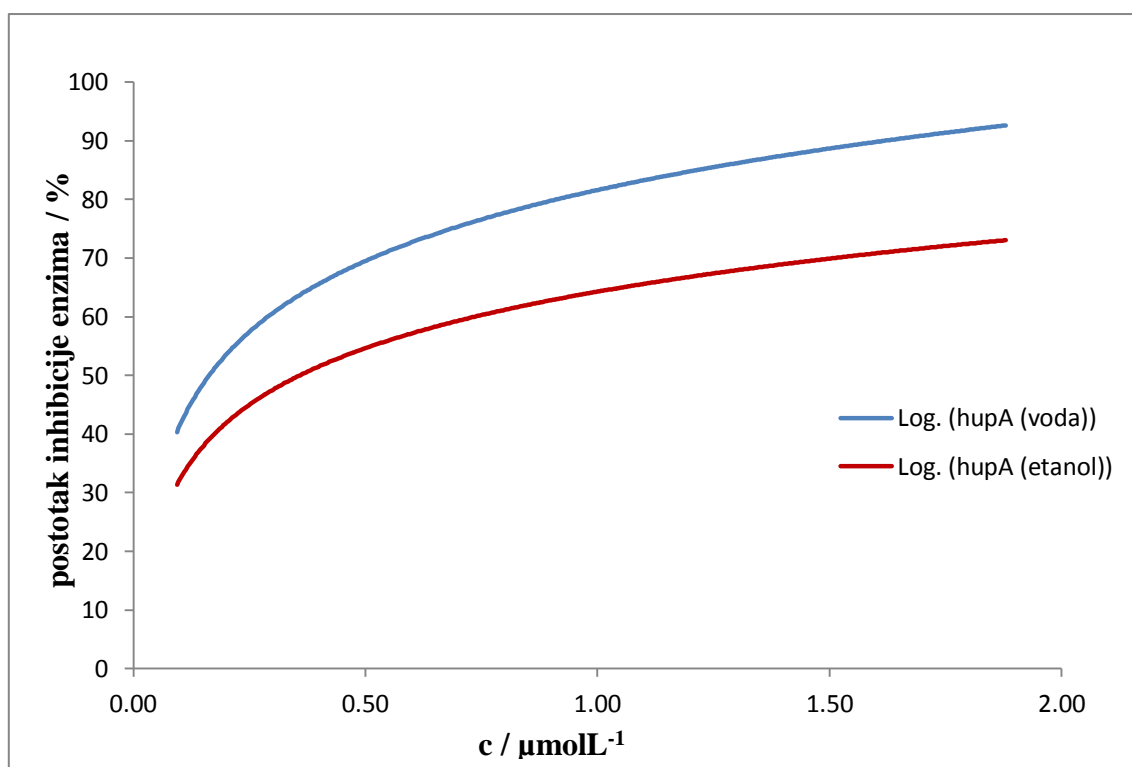
Koncentracija ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Postotak inhibicije (%)
1,88	90,8
0,94	83,7
0,19	49,9
0,094	41,7
0,019	29,2

**Tablica 4.** Inhibicijski učinak hupA (EtOH) pri različitim koncentracijama

<b>Koncentracija (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Postotak inhibicije (%)</b>
1,88	78,2
0,94	54,4
0,19	48,7
0,094	27,7

**Tablica 5.** Inhibicijski učinak  $\beta$ -pinena pri različitim koncentracijama

<b>Koncentracija (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>Postotak inhibicije (%)</b>
334	94,9
167	64,2
33	5,3



**Slika 11.** Grafički prikaz ovisnosti koncentracije inhibitora hupA o postotku inhibicije enzima AChE u vodi i etanolu

Iz grafičkog prikaza na slici 11 vidljivo je da se postotak inhibicije enzima AChE za hupA razlikuje u vodi i etanolu – veći je u vodi.

## 5. RASPRAVA

Alzheimerova bolest je neizlječiva bolest koja je glavni uzrok demencije. Simptomi se javljaju postepeno. Acetilkinesterazni inhibitori pokazali su se kao učinkoviti lijekovi kod ublažavanja simptoma Alzheimerove bolesti. Acetilkinesteraza katalizira hidrolizu acetilkolina na acetat i kolin. Anti-kinesteraza će se vezati na aktivno mjesto enzima AChE umjesto acetilkolina i time će se razgradnja acetilkolina znatno smanjiti.

U eksperimentalnom dijelu rada ispitano je inhibicijsko djelovanje hupA i  $\beta$ -pinena na AChE spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu.

Povećanjem koncentracije inhibitora u otopini povećava se i postotak inhibicije enzima. Tako je pri koncentraciji od  $1,88 \mu\text{mol L}^{-1}$  postotak inhibicije enzima acetilkolinesteraze za hupA u vodi 90,8 %, dok se pri koncentraciji od  $0,19 \mu\text{mol L}^{-1}$  smanjio na 29,2 %.

## 6. ZAKLJUČAK

- Huperzin A i  $\beta$ -pinen su snažni inhibitori acetilkolinesteraze
- Najbolji inhibitor acetilkolinesteraze je huperzin A otopljen u vodi, slijedi ga huperzin A otopljen u etanolu, a zadnji je  $\beta$ -pinen.
- Huperzin A u etanolu je slabiji inhibitor nego hupA u vodi što znači da etanol smanjuje inhibicijski učinak hupA.
- Najbolje djelovanje hupA u vodi je pri koncentraciji  $1,88 \mu\text{molL}^{-1}$  sa 90,8%, dok je pri istoj koncentraciji u etanolu postotak inhibicije 78,2%.
- Najbolje djelovanje  $\beta$ -pinena postignuto je pri koncentraciji od  $334 \mu\text{molL}^{-1}$  sa 94,9% inhibicije.
- Zbog dobre inhibicije vjerojatno bi se mogli koristiti za liječenje Alzheimerove bolesti, ali to ovisi i o nekim drugim svojstvima i nuspojavama.

## 7. LITERATURA

1. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
- [https://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme\\_Commission\\_number](https://en.wikipedia.org/wiki/Enzyme_Commission_number) (20.09.2018.)
- I. Grbelja, *Inhibicijsko djelovanje  $\alpha$  i  $\beta$ -jonona na aktivnost acetilkolinesteraze*, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2016
- F. Burčul, *Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae*, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, Zagreb, 2014
- T. Yuschak, *Advanced Lucid Dreaming: The Power of Supplements*, Lulu Enterprises, Morrisville, 2006
- V. Brinac i suradnici, *Neurologija za medicinare*, Medicinska naklada, Zagreb, 2009.
- J. Ištaković, *Genetika Alzheimerove bolesti*, Završni rad, Zdravstveno veleučilište, Zagreb, 2017.
- S. Pavlović, *Radnoterapijski proces kod osoba oboljelih od Alzheimerove demencije*, Završni rad, Zdravstveno veleučilište, Zagreb, 2016.
- G. T. Ha, R. K. Wong, Y. Zhang, *Chem. & Biodiver.*, **8** (2011) 1189-1204.
- K. Zemljak, *Terapijski potencijal Huperzina A i njegovih derivata u liječenju Alzheimerove bolesti*, Diplomski rad, Zagreb, 2017
- X. Ma, C. Tan, D. Zhu, D. Gang, P. Xiao, *J. Ethnopharmacol* **113** (2007), 15-34
- C. Milić, *Odabrane biljne droge tradicionalne kineske medicine u prevenciji i liječenju Alzheimerove bolesti*, Diplomski rad, Zagreb, 2016.
- M. Angnieszka, D. Milaković, H. Christensen, V. Antolović, D. Kalemba, *Sci. Bull. Tech. Univ. Lodz Food Chem. Biotech*, **71** (2007) 71-95
- Y. Zhengwen, W. Bochu, Y. Fumei, S. Qianyun, Y. Zhannan, Z. Liancai, *Iranian J. Pharma. Res.*, **10**, (2011), 265-271
- O. Politeo, I. Botica, T. Bilusic, M. Jukic, I. Carev, F. Burcul, M. Milos, *J. Med. Plant Res.*, **50** (2011) 6590-6596
- <https://en.wikipedia.org/wiki/Pinene> (22.09.2018.).

17. M. Ernješ, *Određivanje polifenola i flavonola u propolisu UV-VIS spektrofotometrijom*, Završni rad, Veleučilište u Požegi, Požega, 2017.
18. Nj. Radić, L. Kukoč Modun, *Instrumentne metode analize*, Interna skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2016.