

# Inhibicijsko djelovanje seskviterpena ( $\beta$ -kariofilena i karofilen oksida) na aktivnost acetilkolinesteraze

---

**Bodač, Antonija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2016**

*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:167:552735>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-20**

*Repository / Repozitorij:*

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



UNIVERSITY OF SPLIT



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

**INHIBICIJSKO DJELOVANJE SESKVITERPENA  
( $\beta$ -KARIOFILENA I KARIOFILEN OKSIDA) NA AKTIVNOST  
ACETILKOLINESTERAZE**

**ZAVRŠNI RAD**

**ANTONIJA BODAČ**

**Matični broj: 257**

**Split, rujan 2016.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO- TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**INHIBICIJSKO DJELOVANJE SESKVITERPENA**  
**( $\beta$ -KARIOFILENA I KARIOFILEN OKSIDA) NA AKTIVNOST**  
**ACETILKOLINESTERAZE**

**ZAVRŠNI RAD**

**ANTONIJA BODAČ**

**Matični broj: 257**

**Split, rujan 2016.**

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

**INHIBITORY EFFECT OF SESQUITERPENES**  
**( $\beta$ -CARYOPHYLLENE AND CARYOPHYLLENE OXIDE) ON THE**  
**ACTIVITY OF ACETYLCHOLINESTERASE**

**BACHELOR THESIS**

**ANTONIJA BODAČ**

**Parent number: 257**

**Split, September 2016.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

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

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 4. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: dr. sc. Franko Burčul, znanstveni suradnik

### INHIBICIJSKO DJELOVANJE SESKVITERPENA ( $\beta$ -KARIOFILENA I KARIOFLEN OKSIDA) NA AKTIVNOST ACETILKOLINESTERAZE

Antonija Bodač, 257

**Sažetak:** Acetilkinesteraza (AChE) je enzim iz obitelji hidrolaza (E.C.3.1.1.7.). Razgrađuje neuroprijenosnik acetilkolin na acetat i kolin i tako smanjuje aktivnost acetilkolina. Inhibicija acetilkolinesteraze ima ključnu ulogu u ublažavanju simptoma kod Alzheimerove demencije (važno za početne stadije).

Alzheimerova bolest je progresivna degenerativna bolest središnjeg živčanog sustava koja se očituje gubitkom živčanih stanica u moždanoj kori s posljedičnom atrofijom mozga i progresivnom demencijom. Demencija je karakterizirana višestrukim kognitivnim deficitima koji uključuju gubitak sposobnosti pamćenja, razmišljanja, rasuđivanja i dr. Inhibitori kolinesteraza su danas jedina terapija za ublažavanje simptoma Alzheimerove bolesti.

Cilj ovog rada je bio ispitati sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze korištenjem seskviterpena ( $\beta$ -kariofilena i kariofilen oksida) kao inhibitora.  $\beta$ -kariofilen je pokazao dobru inhibicijsku sposobnost dok kariofilen oksid nije pokazao inhibicijsku aktivnost. Povećanjem koncentracije  $\beta$ -kariofilena raste i postotak inhibicije, a najveća vrijednost inhibicije postignuta je pri koncentraciji od  $45,45 \mu\text{g mL}^{-1}$  i iznosi 96,13 %, dok je  $\text{IC}_{50}$  vrijednost iznosila  $12,39 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Ključne riječi:** acetilkolinesteraza, Alzheimerova bolest, inhibicija,  $\beta$ -kariofilen, kariofilen oksid

**Rad sadrži:** 34 stranice, 14 slika, 6 tablica, 13 literaturnih navoda.

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

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

**Datum obrane:** 22. rujna 2016.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-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. 4.

**Mentor:** dr. sc. Franko Burčul, research associate

### INHIBITORY EFFECT OF SESQUITERPENES ( $\beta$ -CARYOPHYLLENE AND CARYOPHYLLENE OXIDE) ON THE ACTIVITY OF ACETYLCHOLINESTERASE

Antonija Bodač, 257

**Abstract:** Acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme that belongs to the hydrolases family (E.C.3.1.1.7.), it catalyses the hydrolysis of the neurotransmitter, acetylcholine, to acetate and choline. Inhibition of acetylcholinesterase has a crucial role in the treatment of Alzheimer's dementia (important at early stages).

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disease of the central nervous system, which is manifested by a loss of nerve cells in the cerebral cortex of the brain resulting in atrophy and progressive dementia. Dementia is characterized by multiple cognitive deficits including loss of memory, judgement, ability, thinking and other. Cholinesterase inhibitors are still the only therapy for patients with Alzheimer's disease.

The aim of this study was to examine the ability of sesquiterpenes ( $\beta$ -caryophyllene, caryophyllene oxide) to inhibit AChE.  $\beta$ -caryophyllene showed good inhibitory activity on AChE, while caryophyllene oxide showed no activity. It was concluded that  $\beta$ -caryophyllene showed ability to inhibit the AChE in concentration dependant manner. Maximum percentage of AChE inhibition of 96,13 %, was achieved at  $\beta$ -caryophyllene concentration of 45,45  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , while  $\text{IC}_{50}$  value was 12,39  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Keywords:** acetylcholinesterase, Alzheimer's disease, inhibition,  $\beta$ -caryophyllene, caryophyllene oxide

**Thesis contains:** 34 pages, 14 pictures, 6 tables, 13 literary references.

**Original in:** Croatian.

#### Defence committee:

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

**Defence date:** September 22<sup>nd</sup>, 2016.

**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 biokemiju, Kemijsko- tehnološkog fakulteta u Splitu  
pod mentorstvom znanstvenog suradnika dr. sc. Franka Burčula tijekom mjeseca  
lipnja, 2016.godine.*

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



*Zahvaljujem se članovima Zavoda za biokemiju, a posebno mentoru dr.sc. Franku Burčulu na korisnim savjetima, strpljenju i velikoj pomoći pri izradi ovog rada.*

*Zahvaljujem se i svojim prijateljima za nezaboravna zajednička iskustva.*

*Hvala mojim roditeljima na bezuvjetnoj podršci tijekom školovanja.*

*Antonija Bodač*

## **ZADATAK ZAVRŠNOG RADA**

- 1. Određivanje sposobnosti inhibicije seskviterpena ( $\beta$ -kariofilena i kariofilen oksida) na djelovanje acetilkolinesteraze (AChE) metodom po Ellmanu.*
- 2. Odrediti  $IC_{50}$  vrijednost za pojedini spoj.*

## SAŽETAK

Acetilkinesteraza (AChE) je enzim iz obitelji hidrolaza (E.C.3.1.1.7.). Razgrađuje neuroprijenosnik acetilkolin na acetat i kolin i tako smanjuje aktivnost acetilkolina. Inhibicija acetilkolinesteraze ima ključnu ulogu u ublažavanju simptoma kod Alzheimerove demencije (važno za početne stadije).

Alzheimerova bolest je progresivna degenerativna bolest središnjeg živčanog sustava koja se očituje gubitkom živčanih stanica u moždanoj kori s posljedičnom atrofijom mozga i progresivnom demencijom. Demencija je karakterizirana višestrukim kognitivnim deficitima koji uključuju gubitak sposobnosti pamćenja, razmišljanja, rasuđivanja i dr. Inhibitori kolinesteraza su danas jedina terapija za ublažavanje simptoma Alzheimerove bolesti.

Cilj ovog rada je bio ispitati sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze korištenjem seskviterpena ( $\beta$ -kariofilena i kariofilen oksida) kao inhibitora.  $\beta$ -kariofilen je pokazao dobru inhibicijsku sposobnost dok kariofilen oksid nije pokazao inhibicijsku aktivnost. Povećanjem koncentracije  $\beta$ -kariofilena raste i postotak inhibicije, a najveća vrijednost inhibicije postignuta je pri koncentraciji od  $45,45 \mu\text{g mL}^{-1}$  i iznosi 96,13 %, dok je  $\text{IC}_{50}$  vrijednost iznosila  $12,39 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Ključne riječi:** acetilkolinesteraza, Alzheimerova bolest, inhibicija,  $\beta$ -kariofilen, kariofilen oksid

## SUMMARY

Acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme that belongs to the hydrolases family (E.C.3.1.1.7.), it catalyses the hydrolysis of the neurotransmitter, acetylcholine, to acetate and choline. Inhibition of acetylcholinesterase has a crucial role in the treatment of Alzheimer's dementia (important at early stages).

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disease of the central nervous system, which is manifested by a loss of nerve cells in the cerebral cortex of the brain resulting in atrophy and progressive dementia. Dementia is characterized by multiple cognitive deficits including loss of memory, judgement, ability, thinking and other. Cholinesterase inhibitors are still the only therapy for patients with Alzheimer's disease.

The aim of this study was to examine the ability of sesquiterpenes ( $\beta$ -caryophyllene, caryophyllene oxide) to inhibit AChE.  $\beta$ -caryophyllene showed good inhibitory activity on AChE, while caryophyllene oxide showed no activity. It was concluded that  $\beta$ -caryophyllene showed ability to inhibit the AChE in concentration dependant manner. Maximum percentage of AChE inhibition of 96,13 %, was achieved at  $\beta$ -caryophyllene concentration of 45,45  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , while  $\text{IC}_{50}$  value was 12,39  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Keywords:** acetylcholinesterase, Alzheimer's disease, inhibition,  $\beta$ -caryophyllene, caryophyllene oxide.

# SADRŽAJ

<b>UVOD</b> .....	1
<b>1. OPĆI DIO</b> .....	2
1.1. ENZIMI .....	2
1.2. ACETILKOLIN.....	2
1.3. ACETILKOLINESTERAZA (AChE).....	5
1.3.1. ULOGA ACETILKOLINESTERAZE .....	6
1.3.2. STRUKTURA I MEHANIZAM DJELOVANJA AChE .....	7
1.3.3. INHIBITORI ACETILKOLINESTERAZE .....	10
1.4. ALZHEIMEROVA BOLEST.....	11
1.4.1. LIJEČENJE ALZHEIMEROVE BOLESTI .....	14
1.4.2. INHIBITORI ACETILKOLINESTERAZE U TRETMANU ALZHEIMEROVE BOLESTI .....	14
1.5. SESKVITERPENI.....	16
1.5.1. $\beta$ -KARIOFILEN .....	17
1.5.2. KARIOFILEN OKSID.....	18
1.6. ODREĐIVANJE INHIBICIJSKE SPOSOBNOSTI ACETILKOLINESTERAZE METODOM PO ELLMANU .....	19
1.6.1. SPEKTROFOTOMETRIJA.....	19
1.6.2. ELLMANOVA METODA .....	21
<b>2. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	23
2.1. ISPITIVANJE SPOSOBNOSTI INHIBICIJE ENZIMA AChE METODOM PO ELLMANU .....	23
2.1.1. PRIPREMA KEMIKALIJA.....	23
2.1.2. POSTUPAK .....	25

<b>3. REZULTATI</b> .....	29
<b>4. RASPRAVA</b> .....	31
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	32
<b>6. LITERATURA</b> .....	33

## UVOD

**Enzimi**, katalizatori u živim sustavima, važni su molekularni "uređaji" koji usmjeravaju kemijske pretvorbe. Gotovo svi poznati enzimi su proteini, izuzevši određene RNA molekule koje pokazuju katalitičku aktivnost (ribozimi). Metaboličke reakcije, bez prisustva enzima, odvijale bi se jako sporo pri normalnoj tjelesnoj temperaturi i pH. Enzimi uvelike ubrzavaju ove reakcije omogućujući stanicama organizma da obavljaju svoje funkcije pri normalnim tjelesnim uvjetima.<sup>1</sup>

**Acetilkinesteraza (AChE; E.C.3.1.1.7)** je enzim iz skupine hidrolaza koji katalizira hidrolizu neuroprijenosnika acetilkolina na acetat i kolin, a zbog svoje uloge u organizmu intenzivno se istražuje unutar područja biomedicine i toksikologije. AChE i butirilkolinesteraza (BuChE) su važne mete kod tretmana neurodegenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest i druge "senilne" demencije. U mozgu pacijenata s Alzheimerovom bolesti dolazi do gubitka kolinergičkih neurona te smanjenja koncentracije acetilkolina i aktivnosti AChE, dok je ekspresija BuChE pojačana (u podmaklim stadijima). Inhibitori kolinesteraza imaju ključnu ulogu u tretmanu osoba s dijagnosticiranom demencijom Alzheimerova tipa.

U radu su kao inhibitori AChE korišteni  $\beta$ -kariofilen i kariofilen oksid. Prema eksperimentalnim rezultatima može se zaključiti da kariofilen oksid nema sposobnost inhibicije acetilkolinesteraze.  $\beta$ -kariofilen je prirodni biciklički seskviterpen, sastojak brojnih eteričnih ulja, posebno ulja klinčića, konoplje, ružmarina i hmelja.

# 1. OPĆI DIO

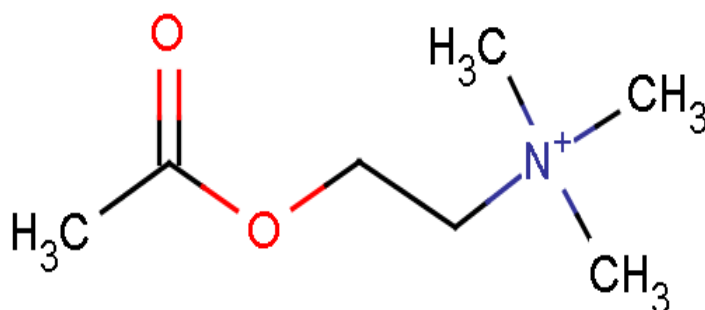
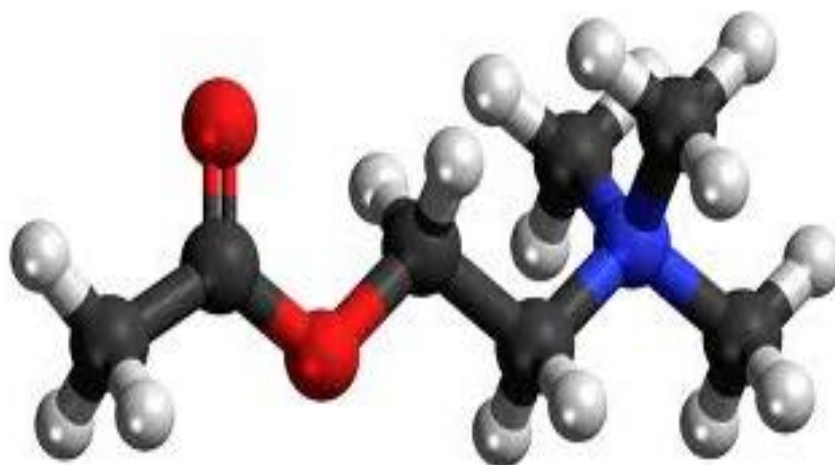
## 1.1. ENZIMI

Enzimi su snažni i vrlo specifični katalizatori (biokatalizatori) i imaju ključnu ulogu u odvijanju metaboličkih reakcija koje bi se bez prisutstva enzima odvijale jako sporo pri normalnoj tjelesnoj temperaturi i pH. Naime, enzimi uvelike ubrzavaju te reakcije omogućujući stanicama organizma da obavljaju svoje funkcije pri normalnim tjelesnim uvjetima. Najuočljivije značajke enzima su njihova specifičnost i katalitička moć. Kataliza se zbiva na specifičnom mjestu enzima, nazvanom aktivno mjesto. Imaju sposobnost specifičnog vezanja vrlo različitih molekula koristeći se svim vrstama međumolekulskih sila, dovodeći supstrate u optimalnu orijentaciju, što prethodi stvaranju ili kidanju kemijskih veza. Aktivnost mnogih enzima se može inhibirati vezanjem malih molekula i iona, također, mnogi lijekovi, a i otrovi su često inhibitori određenih enzima. Inhibicija enzimske aktivnosti glavni je kontrolni mehanizam u biološkim sustavima te pruža uvid u mehanizam djelovanja enzima.<sup>1</sup> Do danas je poznato i klasificirano oko 4000 enzima, a s obzirom na veliki broj enzima Međunarodna unija za biokemiju je 1961. godine preporučila nomenklaturu i klasifikaciju enzima prema kojoj se oni dijele u 6 klasa (obitelji) prema reakcijama koje kataliziraju i to u: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze, ligaze.

## 1.2. ACETILKOLIN

Acetilkolin (engl. *acetylcholine*, ACh) je prvi otkriveni neuroprijenosnik, izlučuje se u autonomnom živčanom sustavu, u neuromišićnoj spojnici i brojnim sinapsama središnjeg živčanog sustava. Kolin-acetil-transferaza je enzim koji katalizira stvaranje acetilkolina u kolinergičnim neuronima iz kolina i acetilkoenzima A (acetil-CoA).<sup>2</sup>

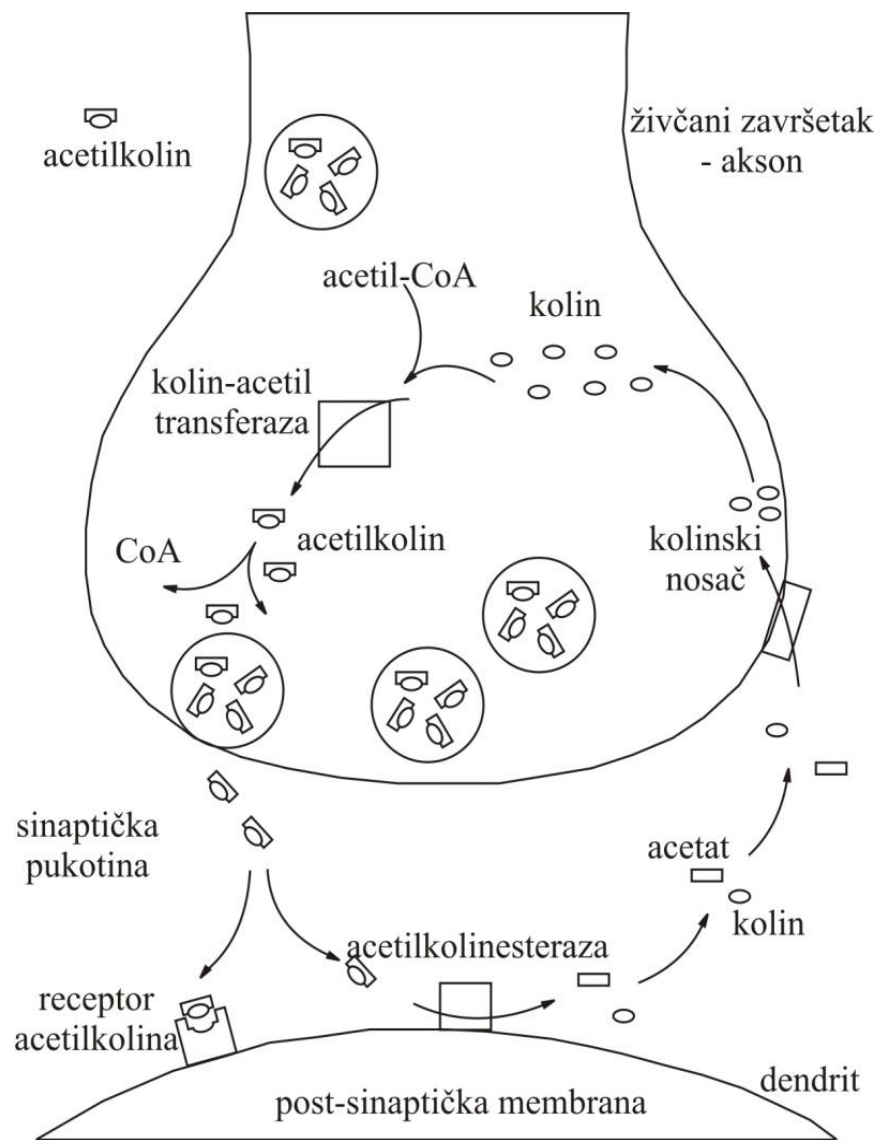




*Slika 1. Kemijska struktura acetilkolina<sup>3</sup>*

ACh djeluje na način da pobuđuje prijenos signala među neuronima kao i do stanica mišića. Postoje dva tipa receptora za ACh: muskarinski i nikotinski. Muskarinski receptori su uglavnom povezani s perifernim živčanim sustavom i srčanim mišićima, a vezanje ACh na njih rezultira stimulacijom parasimpatičkog živčanog sustava koji dalje uzrokuje smanjenje broja otkucaja srca i krvnog tlaka, sužavanje bronha, poticanje probave, povećanje peristaltike crijeva itd. Nikotinski receptori su prisutni u središnjem živčanom sustavu (SŽS) kao i na membrani postsinaptičkih neurona. U SŽS njihova se stimulacija povezuje s kognitivnim procesima i pamćenjem, dok kod mišića kostiju uzrokuje njihovu kontrakciju.

ACh se nalazi u vrećicama na krajevima neurona iz kojih se depolarizacijom živčanog kraja otpušta u sinaptičku pukotinu gdje se nakon toga veže na odgovarajući receptor. Otpušteni ACh ima kratko vrijeme poluživota zbog visoke koncentracije AChE, enzima koji hidrolizira estersku vezu ACh čime dolazi do gubitka stimulirajućeg signala.



**Slika 2.** Shematski prikaz kolinergične sinapse i kružnog ciklusa acetilkolina<sup>2</sup>

Kako se acetilkolin uklanja razgradnjom, a ne difuzijom iz sinaptičke pukotine, njegovom hidrolizom acetilkolinesteraza (AChE) kontrolira prijenos živčanih impulsa u kolinergičkoj sinapsi središnjeg i perifernog živčanog sustava. Dolazak živčanog impulsa uzrokuje ispuštanje acetilkolina iz sinaptičkog mjehurića predsinaptičke membrane u sinaptičku pukotinu gdje se zatim veže na kolinergične receptore (nikotinski i muskarinski) koji su vezani na postsinaptičku membranu kolinergičke sinapse ili mišićne stanice.

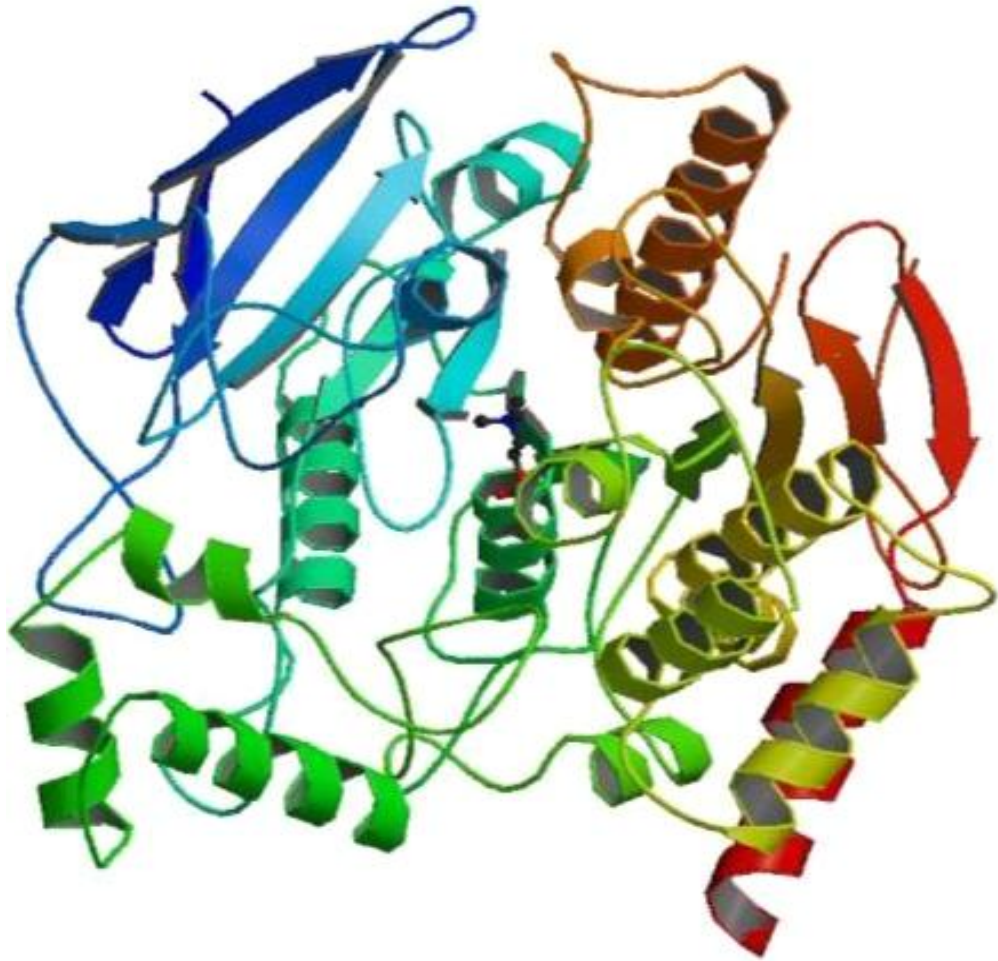
Vežanjem ACh pokreće se niz procesa koji rezultiraju depolarizacijom membrane i daljnim prijenosom signala odnosno živčanog impulsa. Brzom razgradnjom acetilkolina u sinaptičkoj pukotini djelovanjem AChE ponovno se uspostavlja polarizacija postsinaptičke membrane i prijenos impulsa prestaje (slika 2.).

### 1.3. ACETILKOLINESTERAZA

Acetilkolinesteraza (engl. *acetylcholinesterase*, AChE) je enzim koji pripada klasi hidrolaza, podklasi serinskih esteraza i skupini hidrolaza karboksilnih kiselina (E.C.3.1.1.7.). Njena fiziološka uloga je hidroliza neuroprijenosnika acetilkolina na acetat i kolin tijekom prijenosa živčanih impulsa, čime se omogućava normalan prijenos signala u živčanim i živčano-mišićnim sinapsama. Sintetizira se u koštanoj srži, mozgu i mišićima. Nalazi se i u krvi gdje je vezana za eritrocite. Uloga na eritrocitima do sada nije razjašnjena.

Postoje dvije vrste kolinesteraza: tip I (prava, specifična kolinesteraza, AChE) i tip II (nespecifična kolinesteraza, BuChE). Tip I se nalazi posvuda gdje se ACh luči kao neuroprijenosnik (sinapse živčanog sustava, neuromuskularna veza). Razgradnjom ACh na tom mjestu neuromuskularna veza se osposobljuje za prijenos novih impulsa sa živca na mišić. Tip II se nalazi u serumu, crijevnoj sluznici i gušterači gdje, osim acetilkolina, razgrađuje i druge kolinske estere (butirilkolin, benzoilkolin, sukcinilkolin).

Sredstva koja inhibiraju kolinesterazu pojačavaju i produljuju djelovanje acetilkolina (npr. neostigmin, fizostigmin, diizopropilni fluorofosfat). Fizostigmin i neostigmin vežu se na kolinesterazu i inaktiviraju je tijekom nekoliko sati što može prouzročiti mišićni spazam. Neostigmin se upotrebljava za liječenje mijastenije gravis, diizopropilni fluorofosfat razara kolinesterazu pa može biti veoma opasan živčani otrov.<sup>4</sup>



*Slika 3. Trodimenzionalna struktura acetilkolinesteraze (PDB-2ace)<sup>5</sup>*

### **1.3.1. ULOGA ACETILKOLINESTERAZE**

AChE je od iznimne važnosti za očuvanje homeostaze organizma budući da je njezin fiziološki supstrat, ACh, jedan od prijenosnika živčanih impulsa. Prema brzini hidrolize acetilkolina, AChE je jedan od najučinkovitijih enzima u prirodi. Za ljudsku AChE konstanta brzine hidrolize acetilkolina,  $k_{cat}$  (okretni broj) iznosi približno  $400\,000\text{ min}^{-1}$  te je njegova hidroliza strogo ograničena samo brzinom njegove difuzije u aktivno mjesto enzima.<sup>6</sup> Osim ključne esterazne aktivnosti, posjeduje i peptidaznu aktivnost koja se povezuje s razvojem i napredovanjem Alzheimerove bolesti te arilacilamidaznu aktivnost čija fiziološka uloga za sada nije razjašnjena.

Osim "klasične" katalitičke uloge AChE ima i tzv. nekatalitičke funkcije koje nisu povezane s njezinom fiziološkom funkcijom. Potvrđeno je da AChE potpomaže nastajanje neurita, da sudjeluje u sinaptogenezi, aktivaciji dopaminskih receptora i agregaciji amiloidnih vlakana, dok se njezina uloga u nastajanju trombocita i krvnih stanica povezuje s povećanim rizikom od leukemije kod osoba izloženih djelovanju pesticida koji djeluju kao inhibitori AChE.

### 1.3.2. STRUKTURA I MEHANIZAM DJELOVANJA AChE

Acetilkolinesteraza ili tzv. "prava kolinesteraza" je složen protein čiju osnovnu strukturu čini 12  $\beta$ -nabranih ploča okruženih s 14  $\alpha$ -uzvojnica, što je klasificira u skupinu hidrolaza  $\alpha/\beta$ -strukture. Poznavanje strukture AChE temelji se na istraživanjima strukture enzima električne jegulje (*Torpedo californica*, TcAChE) budući je struktura AChE u sisavaca vrlo slična strukturi TcAChE stoga se većina *in vitro* istraživanja odvija na ovom enzimu kao modelu.

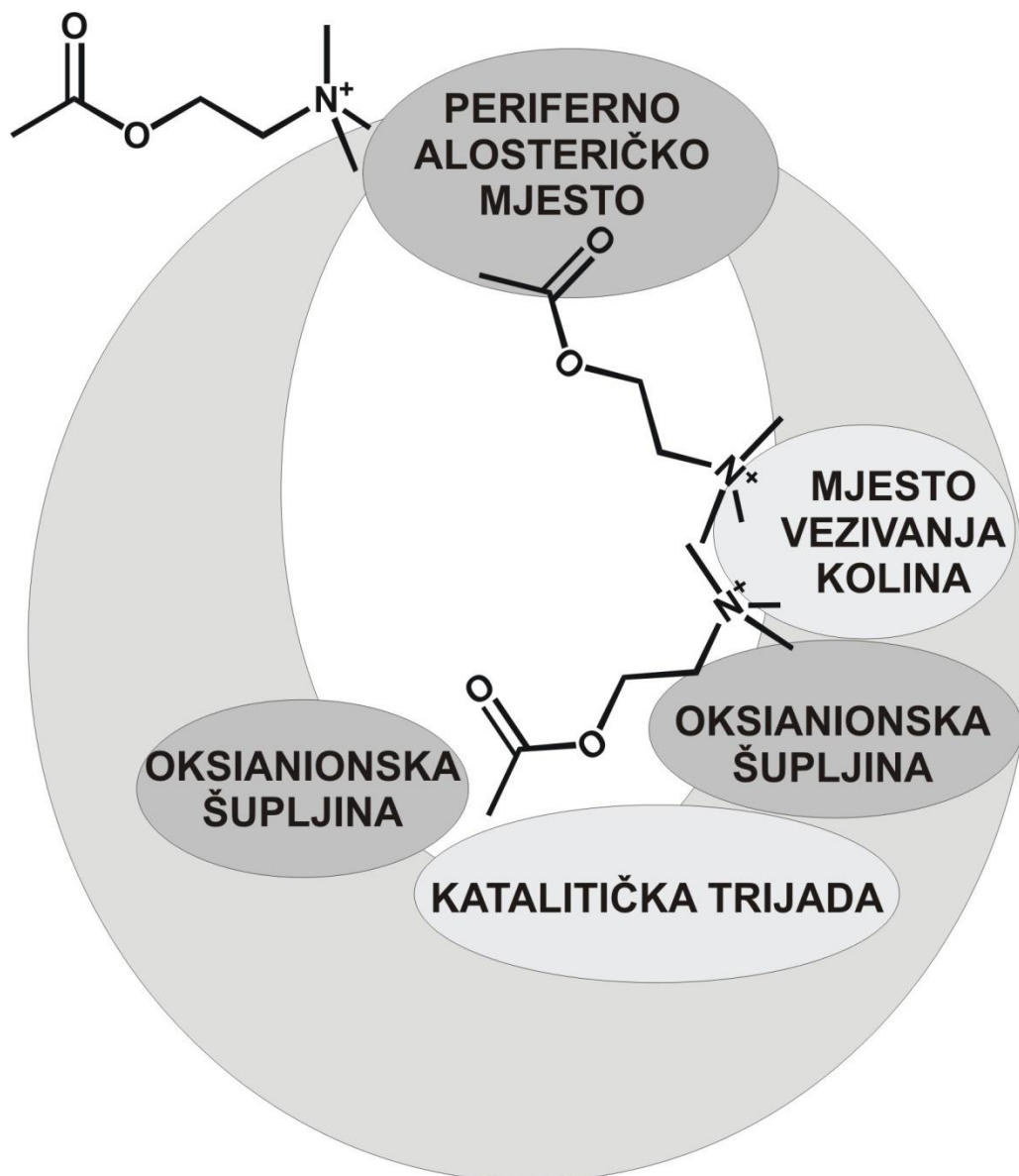
Hidroliza acetilkolina odvija se na dnu aktivnog mjesta, a mehanizam je prilično složen. Mehanizam se sastoji od tri koraka koji obuhvaćaju nastajanje Michaelisovog kompleksa, aciliranje enzima i njegovo deaciliranje vodom. ACh se prvo veže na tzv. periferno anionsko (odnosno alosteričko) mjesto te dolazi do prijenosa acilne skupine acetilkolina na serin u aktivnom mjestu uz oslobađanje kolina. Acilirani međuprodukt se hidrolizira uz oslobađanje enzima i octene kiseline.

Aktivno mjesto je 20 Å dugačko i 5 Å široko ždrijelo ili grlo (udubina).

Četiri podregije aktivnog mjesta koje sudjeluju u hidrolizi su:

- periferno mjesto smješteno na rubu ždrijela
- anionsko mjesto (mjesto vezanja kolina ili hidrofobno mjesto)
- esterazno mjesto (katalitičko mjesto, katalitička trijada s oksianionskom šupljinom) i
- acilni "džep" (odgovoran za smještanje acilnog dijela supstrata).

Katalitička trijada sastoji se od: serina, histidina i glutaminske kiseline (tj. glutamata). Slika 4. prikazuje položaj strukturnih domena aktivnog mjesta enzima dok je u tablici 1. opisana uloga pojedinih domena.



*Slika 4. Prikaz aktivnog mjesta AChE s naznačenim domenama i supstratom ACh.<sup>6</sup>*

**Tablica 1. Uloga strukturnih domena aktivnog mjesta acetilkolinesteraze<sup>2</sup>**

<b>DOMENE AKTIVNOG MJESTA AChE</b>	<b>ULOGA DOMENE</b>	<b>AMINOKISELINSKI OSTATCI (AChE)</b>
<b>ESTERAZNO MJESTO</b>	Sadrži katalitičku strukturu enzima koja se sastoji od katalitičke trijade čija je uloga hidroliza supstrata.	Ser200 His440 Glu327
<b>OKSIANIONSKA ŠUPLJINA</b>	Bočni lanci triju aminokiselina djeluju kao donori vodikove veze i na taj način stabiliziraju tetraedarski međuprodukt ACh koji nastaje tijekom hidrolize.	Gly118 Gly119 Ala201
<b>PERIFERNO ALOSTERIČKO MJESTO</b>	Odgovorno za alosterički mehanizam inhibicije katalitičke aktivnosti AChE pri visokim koncentracijama acetilkolina.	Tyr72 Tyr124 Trp286
<b>ANIONSKO MJESTO</b>	Mjesto vezanja kolina ili hidrofobno mjesto - uglavnom se sastoji od aromatskih aminokiselina i Glu99 za koje se smatra da stabiliziraju kvarterni amonijev ligand. Triptofan ima ulogu u orijentaciji i smještanju nabijenog dijela supstrata što ubrzava hidrolizu kolinskih supstrata.	Trp84 Phe330 Glu99
<b>ACILNI "DŽEP"</b>	Mjesto na kojem se veže acilni dio ACh, aminokiseline imaju ulogu u ograničavanju dimenzija supstrata koji mogu ući u aktivno mjesto.	Phe288 Phe290

### 1.3.3. INHIBITORI ACETILKOLINESTERAZE

Inhibicijom aktivnosti AChE dolazi do nakupljanja acetilkolina i poremećaja u prijenosu živčanih impulsa što se manifestira tzv. kolinergičkom krizom. Ova kriza uključuje mučnine, salivaciju, paralizu dišnog sustava i kao krajnji ishod smrt organizma. Inhibicija se postiže vezanjem spojeva nekovalentnim (reverzibilna inhibicija) ili kovalentnim interakcijama za serin katalitičke trijade (ireverzibilna ili progresivna inhibicija).

- Reverzibilni inhibitori su većinom prirodnog podrijetla, izolirani iz biljaka, kao npr. alkaloidi (huperzin A, solanin, solanidin) i flavonoidi (galangin). Osim njih proučavaju se i druge klase spojeva kao što su: ksantoni, kumarini, terpeni i njihovi derivati te ostali. Uključenost enzima u patologiju mnogih bolesti kao što su miastenija gravis, Alzheimerova i Parkinsonova bolest potaknule su razvoj sintetskih inhibitora. Neki od tih reverzibilnih inhibitora AChE su: donepezil (Aricept) i takrin (Cognex). Reverzibilni inhibitori vežu se ili u aktivno mjesto ili na periferno mjesto enzima ili istodobno na oba mjesta.
- Ireverzibilni inhibitori djeluju tako da se kovalentno vežu na serin katalitičke trijade. U ireverzibilne inhibitore AChE ubrajaju se karbamati i organofosforni spojevi. Prvi takav poznati inhibitor bio je karbamat fizostigmin, a koristi se u terapiji miastenije gravis, Alzheimerove bolesti, liječenju glaukoma. Sinteza ireverzibilnih inhibitora razvijena je u svrhu upotrebe ovih spojeva kao lijekova i pesticida. Nije zanemariva ni njihova primjena u obliku neurotoksičnih bojnih otrova (organofosforni spojevi: tabun, soman, sarin) te kod tradicionalnih obrednih ubojstava ili mučenja (u nekim dijelovima svijeta). Medicinska primjena podrazumijeva korištenje inhibitora AChE kako bi se ublažio nedostatak ACh.<sup>6</sup>



**Tablica 2. Kratak pregled inhibitora acetilkolinesteraze**

INHIBITORI AChE	ZNAČAJKE	PREDSTAVNICI
<b>REVERZIBILNI</b>	Vežu se nekovalentno u aktivno mjesto enzima ili na periferno mjesto na ulazu u aktivno mjesto. Također su sintetizirani inhibitori koji se mogu reverzibilno vezati na oba mjesta enzima. Većinom su prirodnog podrijetla.	Etopropazin, takrin, donepezil, huperzin A, galantamin, propidij, tubokuranin i drugi
<b>IREVERZIBILNI</b>	Djeluju tako da se kovalentno vežu na serin katalitičke trijade čime je onemogućena normalna hidroliza supstrata ACh. U njih se ubrajaju karbamati i organofosforni spojevi od kojih su najjači inhibitori kemijski bojni otrovi.	Bambuterol, ezerin, fizostigmin, soman, sarin, tabun

#### 1.4. ALZHEIMEROVA BOLEST

Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer's disease*, AD) je najučestaliji oblik demencije modernog društva. Bolest je po prvi put opisao njemački neuropatolog i psihijatar Alois Alzheimer po kojem je i dobila naziv. AD je degenerativna bolest mozga koju karakterizira oštećenje živčanih stanica, progresivno propadanje kognitivnih funkcija te pojava senilnih plakova, depozita  $\beta$ -amiloida, stvaranje neurofibrilarnih petlji u kori mozga i subkortikalnoj sivoj kori. Do degeneracije dolazi u različitim sustavima neuroprijenosnika: kolinergički, noradrenergički i serotoninergički.<sup>7</sup>

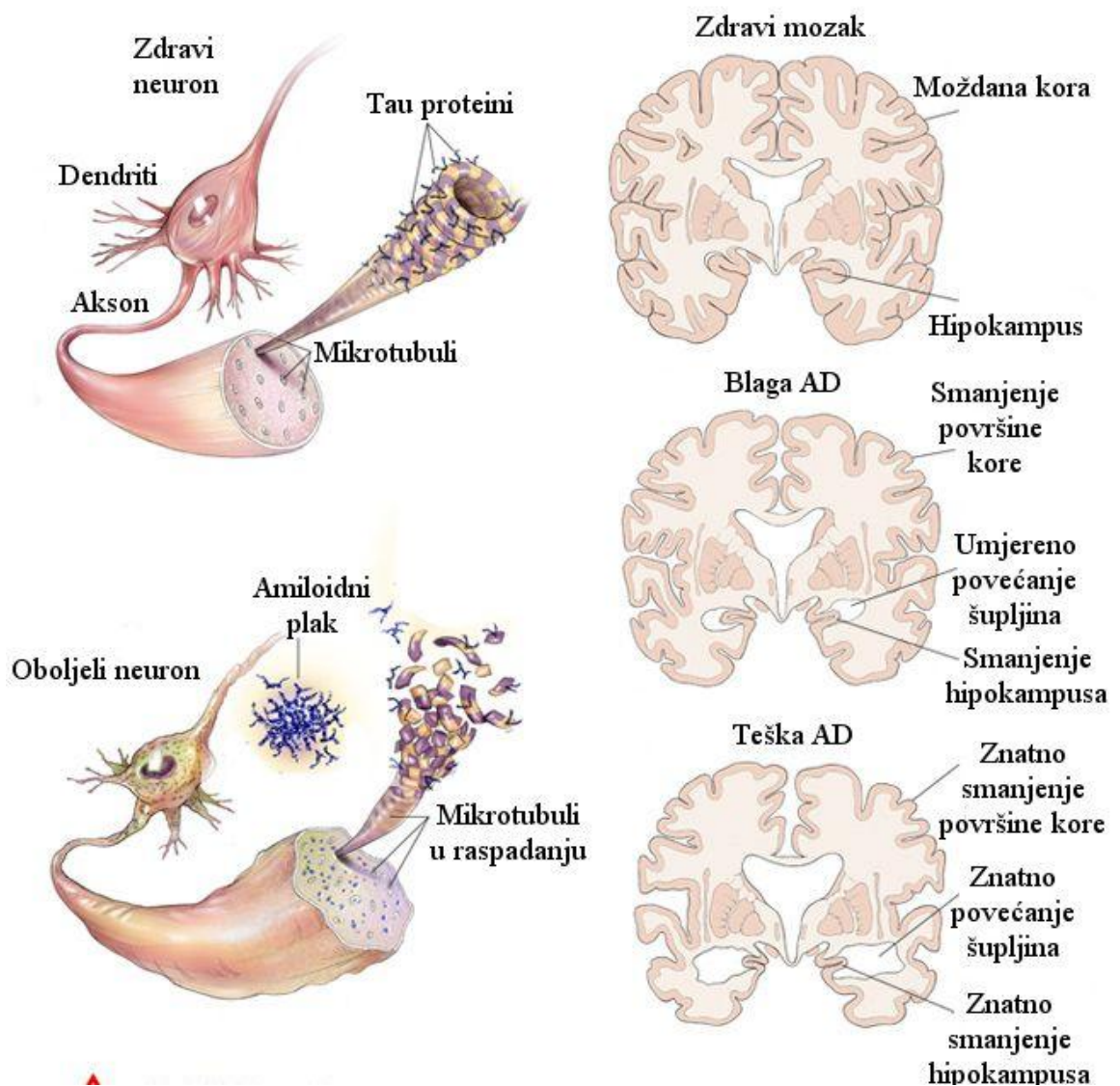
Enzimi potrebni za sintezu i razgradnju acetilkolina sniženi su za 30% kod pacijenata oboljelih od AD u odnosu na zdravu osobu. Pokazalo se da je u AD smanjen broj nikotinskih i presinaptičkih muskarinskih receptora dok je serotoninergički sustav značajno oštećen.

Najčešće se javlja u starijoj životnoj dobi: u dobi od 60 godina (učestalost oko 1%) i raste dvostruko svakih pet godina, tako da u dobi od 85 godina iznosi oko 30-40%.

Bolest je dvostruko češća kod žena u odnosu na muškarce, djelomično zato što žene imaju očekivano dulji životni vijek.

Razlikuju se dva oblika Alzheimerove bolesti: nasljedni i sporadični.

U većini slučajeva bolest nastaje sporadično ("kasni" oblik bolesti) s početkom (>60 godina) i nejasnom etiologijom. Predstavlja najčešći oblik bolesti. Ipak, u oko 5-15% javlja se obiteljski; polovica tih slučajeva imaju rani početak (<60 godina) i tipično su povezani sa specifičnim genetskim poremećajima.<sup>8</sup>



*Slika 5. Usporedba zdravog neurona i zdravog mozga s oboljelima od Alzheimerove bolesti<sup>9</sup>*

Glavne teorije koje se odnose na primarni uzrok bolesti su:

- kolinergična (propadanje kolinergičnih neurona i smanjenje sinteze ACh)
- hipoteza amiloidne kaskade (nakupljanje amiloid- $\beta$ -peptida ( $A\beta$ ) i taloženje u obliku plakova)
- $\tau$ -hipoteza (nastanak  $\tau$ -snopića ili petlji)
- oksidacijski stres i dr.

**Tablica 3. Hipoteze koje se odnose na uzrok AD<sup>2</sup>**

<p><b>KOLINERGIČNA HIPOTEZA</b></p>	<p>Temelji se na pretpostavci da je AD uzrokovana poremećajem metabolizma ACh koji utječe na učenje i pamćenje te da dolazi do manjka kolin-acetil-transferaze (zaslužne za sintezu ACh). Povećanje njegove koncentracije može ublažiti simptome bolesti. Svi se današnji lijekovi temelje na ovoj hipotezi i usmjeravaju prema očuvanju količine acetilkolina inhibicijom AChE.</p>
<p><b>AMILOIDNA HIPOTEZA</b></p>	<p>Temelji se na pretpostavci da <math>A\beta</math> tj. njegove nakupine, plakovi, pronađeni na mozgu oboljelih toksično djeluju na zdrave neurone i potiču njihovo odumiranje. Na osnovi provedenih istraživanja zaključeno je da stupanj oštećenja stanice ovisi o količini <math>A\beta</math>-peptida i njegovim karakteristikama.</p>
<p><b><math>\tau</math>-HIPOTEZA</b></p>	<p>Pretpostavlja se da dolazi do hiperfosforilacije <math>\tau</math>-proteina koja uzrokuje degradaciju citoskeleta nakon čega se spaja s drugim <math>\tau</math>-proteinima stvarajući neurofibrilarne petlje. Ne zna se da li je hiperfosforilacija uzrok ili posljedica AD budući da se <math>\tau</math>-petlje javljaju i kod drugih bolesti.</p>
<p><b>OKSIDACIJSKI STRES</b></p>	<p>SŽS je posebno osjetljiv na reaktivne kisikove vrste. Istraživanja pokazuju da slobodni radikali mogu uzrokovati odumiranje neurona. Činjenice koje podupiru hipotezu su akumuliranje oksidacijskih oštećenja tijekom života, javljanje degenerativnih bolesti u starijoj dobi.</p>

### 1.4.1. LIJEČENJE ALZHEIMEROVE BOLESTI

Liječenje AD još uvijek nije moguće, ponajprije zbog toga što još uvijek nije određen glavni uzrok bolesti. Postoje mnoge strategije i načini ublažavanja simptoma koji se ispituju i istražuju, ali nijedan od njih nije rezultirao izlječenjem. Radi se uglavnom o inhibitorima kolinesteraza, a neke od drugih strategija i načina borbe protiv Alzheimerove bolesti uključuju:

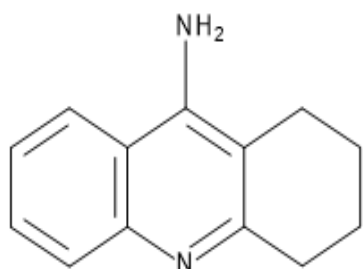
- sprječavanje nastanka  $A\beta$  pomoću inhibitora  $\gamma$ - i  $\beta$ -sekretaza
- uklanjanje  $A\beta$  pasivnom i aktivnom imunizacijom
- intravenskim imunoglobulinima
- terapije temeljene na  $\tau$ -proteinu.

### 1.4.2. INHIBITORI ACETILKOLINESTERAZE U TRETMANU ALZHEIMEROVE BOLESTI

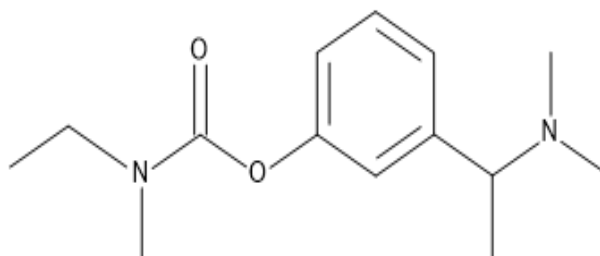
Najuspješniji pristup ublažavanju simptoma, proizašao iz kolinergične hipoteze, je korištenjem inhibitora kolinesteraza. Tako su takrin, donepezil, rivastigmin i galantamin inhibitori AChE odobreni za kliničku upotrebu kod tretiranja AD.

- Takrin - akridinski spoj, reverzibilni inhibitor i AChE i BuChE. Bio je prvi lijek u terapiji AD, danas se ograničeno koristi zbog štetnosti za jetru.
- Donepezil - piperidinski spoj, selektivni inhibitor AChE. Donedavno glavni lijek za tretman AD, nije štetan za jetra, ali uzrokuje slične simptome kao i takrin: mučninu, povraćanje, umor, anoreksiju itd.
- Rivastigmin - inhibira i AChE i BuChE u dijelovima mozga s najvećim kolinergičnim deficitom kod AD pacijenata. Nuspojave su: mučnina i povraćanje.
- Galantamin - alkaloid izoliran iz biljnih vrsta *Galanthus*, pokazuje jaku in vitro AChE inhibitornu aktivnost, lijek je za rane faze AD. Karakteristike: dugo djelovanje, selektivnost, reverzibilnost i kompetitivnost prema AChE.

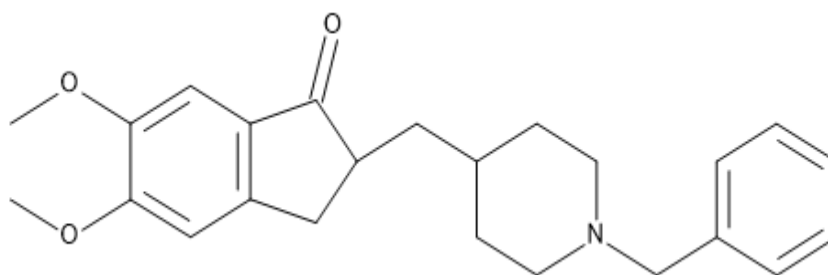
Osim toga, istraživanja su pokazala i da pojedine biljne vrste kao što su: damašćanska crnjika, crni kumin, različite vrste kadulja, čajevca i druge posjeduju inhibicijsku aktivnost prema AChE te bi se mogle primjenjivati za tretiranje AD.



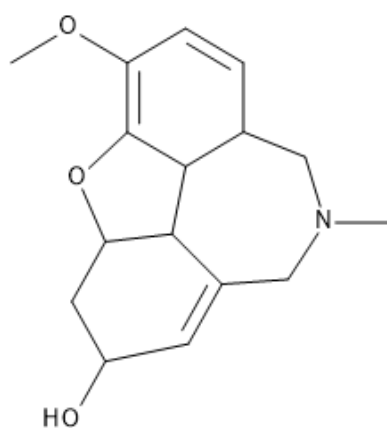
takrin



rivastigmin



donepezil



galantamin

**Slika 6.** Struktura poznatih inhibitora AChE

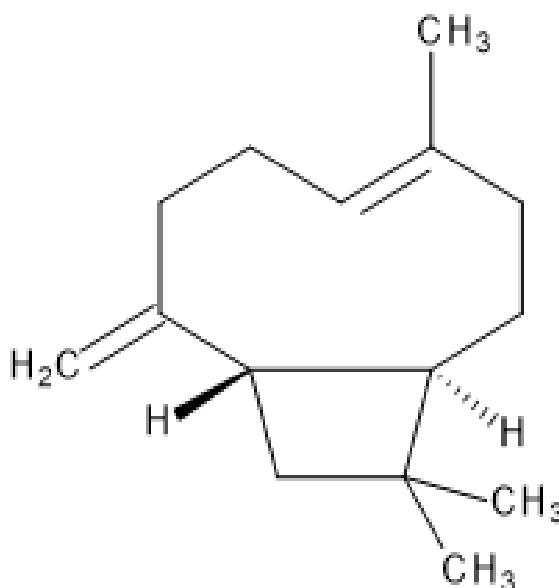
## 1.5. SESKVITERPENI

Seskviterpeni su, u odnosu na monoterpe, značajni, ali količinski manje zastupljeni sastojci eteričnih ulja.

Dijele se na acikličke i cikličke (mono-, bi- i tricikličke). Najpoznatiji primjeri acikličkih seskviterpena su farnezol i nerolidol. U skupinu monocikličkih seskviterpena spadaju:  $\beta$ -elemen, bisabolen, kurkumen i humulen, a od bicikličkih seskviterpena najzastupljeniji su:  $\alpha$ -kadinen,  $\alpha$ - i  $\beta$ -selinen, eudesmol i  $\beta$ -kariofilen. Objašnjenju strukture seskviterpena najviše je pridonio L. Ružička.

Dijele se još i na: hlapljive, nezasićene ugljikovodike, ugodna mirisa i neisparljive seskviterpenske  $\gamma$ -laktone (gorka okusa i snažne farmakološke aktivnosti). Spadaju u klasu terpena, a molekulska formula im je  $C_{15}H_{24}$ . Sastoje se od tri izoprenske jedinice i biosintetski nastaju iz farnezil-pirofosfata. Farnezil-pirofosfat izomerizira u odgovarajući alilni izomer, nerolidil-pirofosfat, što pridonosi strukturnoj raznolikosti seskviterpena.

### 1.5.1. $\beta$ -KARIOFILEN



*Slika 7.  $\beta$ -kariofilen*

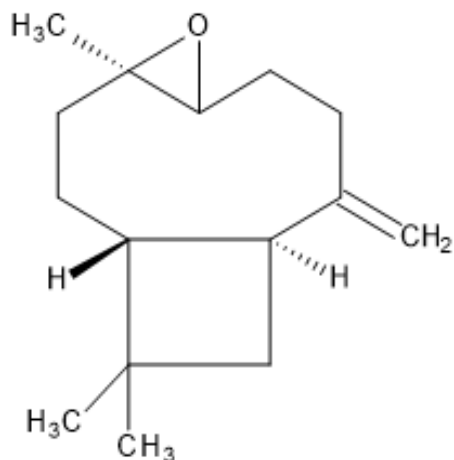
Naziv po IUPAC-u: 4,11,11-trimetil-8-metilen-biciklo [7.2.0] undek-4-en

Molekulska formula:  $C_{15}H_{24}$

Molekulska masa: 204,35106 g/mol

$\beta$ -kariofilen ili kariofilen je prirodni biciklički seskviterpen, sastojak mnogih esencijalnih ulja, posebno ulja koje se dobiva od stabljike i cvijeća biljke *Syzygium aromaticum* L. Merrill & Perry (klinčić), eteričnog ulja *Canabis sativa* L. (konoplje), *Rosmarinus officinalis* L. (ružmarina) i *Humulus lupulus* L. (hmelja). Obično se nalazi u smjesi s izokariofilenom (cis izomerom dvostruke veze) i  $\alpha$ -kariofilenom (izomerom s otvorenim prstenom). Kariofilen je karakterističan po ciklobutanskom prstenu i trans-dvostrukoj vezi u osmeročlanom prstenu koji se rijetko susreću u prirodi.<sup>10</sup> Istraživanja na miševima pokazala su da je kariofilen selektivni agonist kanabinoidnog receptora tipa-2 sa značajnim protuupalnim, anksiolitičkim i antidepresivnim učinkom. Nije poznato da li taj spoj može modulirati navedene procese i kod ljudi. Kariofilen se ne veže na kanabinoidni receptor tipa-1 pa time ne pokazuje ni psihoaktivne učinke.<sup>11</sup>

## 1.5.2. KARIOFILEN OKSID



*Slika 8. kariofilen oksid*

Naziv po IUPAC-u: 4,12,12-trimetil-9-metilen-5-oksatriciklo [8.2.0.04,6] dodekan

Molekulska formula:  $C_{15}H_{24}O$

Molekulska masa: 220,354 g/mol

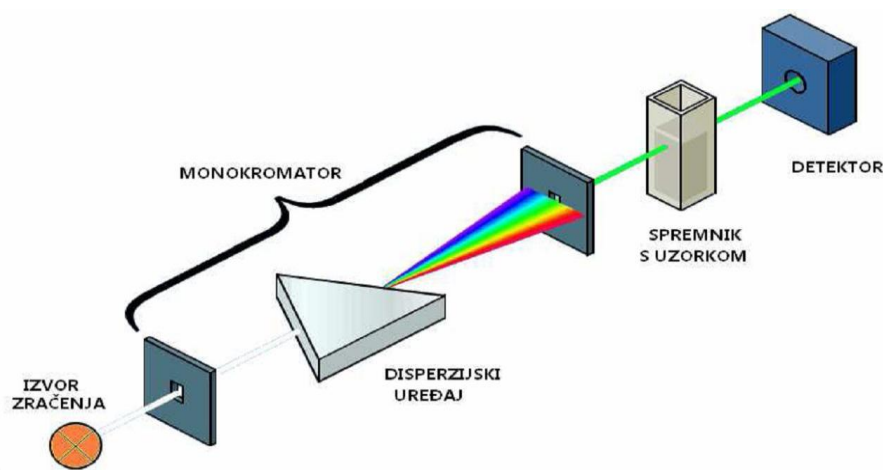
Kariofilen oksid je prirodni spoj u kojem je olefin  $\beta$ -kariofilena zamijenjen epoksidom i glavna je komponenta kojom psi tragači mogu identificirati kanabis putem njuha. Također je i odobrena aroma hrane.<sup>11</sup>



## 1.6. ODREĐIVANJE INHIBICIJSKE SPOSOBNOSTI ACETILKOLINESTERAZE METODOM PO ELLMANU

### 1.6.1. SPEKTROFOTOMETRIJA

Spektrofotometrija je tehnika koja mjeri apsorpciju emitiranog elektromagnetskog zračenja do koje dolazi kada se određeni uzorak podvrgne samom zračenju. Uređaj za mjerenje apsorpcije naziva se spektrofotometar.



*Slika 9. Shematski prikaz spektrofotometra*

Osnovni pojmovi u spektrofotometriji su: transmitacija i apsorbancija.

Transmitacija otopine (T) definira se kao dio upadnog zračenja koji je prošao kroz otopinu:

$$T = P / P_0 \quad (1)$$

gdje je  $P_0$  ulazna snaga zračenja, a  $P$  snaga zračenja nakon apsorpcije.

Apsorbancija otopine (A) definira se kao logaritamski odnos zračenja koje je prošlo kroz otopinu ( $P_0$ ) i upadnog zračenja (P):

$$A = \log (P_0 / P) \quad (2)$$

Beerov zakon predstavlja funkcijski odnos kvantiteta apsorbancije i koncentracije vrste koja apsorbira elektromagnetsko zračenje:

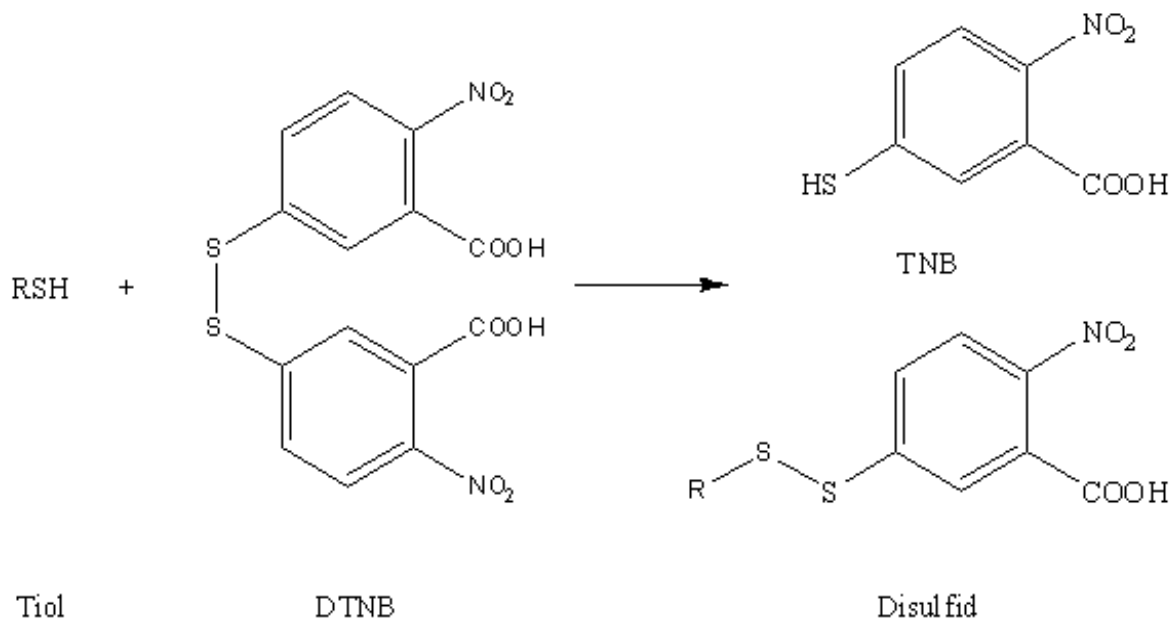
$$A = \log (P_0 / P) = abc \quad (3)$$

gdje je a apsorptivnost (apsorpcijski koeficijent), b duljina puta zračenja kroz uzorak, a c koncentracija apsorbirajuće vrste.<sup>12</sup>

## 1.6.2. ELLMANOVA METODA

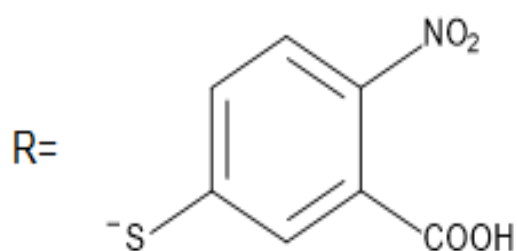
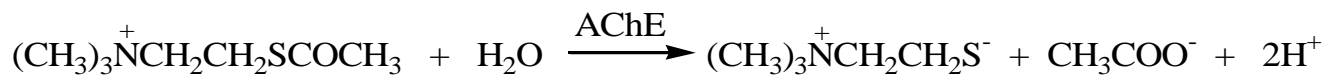
Određivanje inhibicijske sposobnosti kolinesteraza može se vršiti *in vivo* i *in vitro*. Uglavnom se radi o spektrofotometrijskim metodama od kojih je najpoznatija metoda po Ellmanu (*in vitro*).

Ellmanova metoda je jednostavna spektrofotometrijska metoda za mjerenje aktivnosti acetilkolinesteraze (AChE), a temelji se na reakciji između tzv. Ellmanovog reagensa, DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva) kiselina) s tiolnom skupinom (oslobađa se u reakciji sintetskog supstrata acetilkolina (ACh) i enzima AChE). Reakcijom nastaje 2-nitro-5-merkaptobenzojeva kiselina (TNB). TNB ionizira u vodi u  $\text{TNB}^-$  anion kod neutralnog ili alkalnog pH. Nastali anion je intezivno žute boje. Porast apsorbancije aniona (TNB-a) prati se na valnoj duljini od 412 nm, dok je apsorpcijski maksimum DTNB-a pri 320 nm. Ellmanova metoda je brza metoda kod koje se dodatkom jednog mola tiola oslobađa jedan mol  $\text{TNB}^-$ .<sup>13</sup>



*Slika 10. Ellmanova reakcija za određivanje tiola<sup>2</sup>*

Ellmanova reakcija za određivanje inhibicijske sposobnosti enzima AChE se odvija prema sljedećim reakcijama:



## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. ISPITIVANJE SPOSOBNOSTI INHIBICIJE ENZIMA AChE METODOM PO ELLMANU

Kemikalije:

1. enzim acetilkolinesteraza (Tip V-S, iz elektrofora električne jegulje)
2. acetiltiokolin jodid (ATChI)
3. 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina) – DTNB

Kao izvor enzima korištena je acetilkolinesteraza, (AChE) iz elektrofora električne jegulje (Tip V-S), a kao supstrat enzima korišten je acetiltiokolin jodid, (ATChI). Za ispitivanje sposobnosti inhibicije AChE korištena je modificirana spektrofotometrijska metoda po Ellmanu koristeći DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva) kiselina) kao tiolni reagens. Enzimskom hidrolizom supstrata nastaje tiokolin koji reagira s DTNB - om pri čemu se oslobađa žuto obojeni anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline, a porast apsorbanције aniona mjeri se pri valnoj duljini  $\lambda = 412 \text{ nm}$ .

#### 2.1.1. PRIPREMA KEMIKALIJA

Za potrebe mjerenja pripremljene su sljedeće otopine:

- fosfatni pufer (0,1 M; pH=7 i pH=8)
- enzim AChE otopljen u puferu pH=8, finalne koncentracije u sustavu  $0,03 \text{ U mL}^{-1}$
- otopine supstrata (ATChI) finalne koncentracije u sustavu 0,5 mM; DTNB otopljen u puferu pH=7 + 0,12 mM  $\text{NaHCO}_3$
- otopine uzorka (inhibitora)  $\beta$ -kariofilena i kariofilen oksida u etanolu, koncentracija u sustavu:  $4,54 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $11,36 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $22,73 \mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $34,09 \mu\text{g mL}^{-1}$  i  $45,45 \mu\text{g mL}^{-1}$

*Tablica 4. Priprava kemikalija za rad*

KEMIKALIJE	OSNOVNA OTOPINA	KONAČNA KONCENTRACIJA	VOLUMEN/ $\mu\text{L}$
PUFER		$0,1 \text{ mmol L}^{-1}$	$190 \mu\text{L}$
DTNB	13,079 mg u 5 mL pufera (pH 7)	$0,3 \text{ mmol L}^{-1}$	$10 \mu\text{L}$
ATChI	15,9 mg u 5 mL pufera (pH 8)	$0,5 \text{ mmol L}^{-1}$	$10 \mu\text{L}$
AChE	$6,6 \mu\text{L}$ u 5 mL pufera (pH 8)	$0,03 \text{ U mL}^{-1}$	$10 \mu\text{L}$
UZORAK/EtOH		različite konc./96 %	$10 \mu\text{L}$



*Slika 11. Priprava kemikalija za eksperimentalni dio rada*

## 2.1.2. POSTUPAK

U svakoj jažici reakcijska smjesa sadrži:

- 180  $\mu\text{L}$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  fosfatnog pufera pH=8
- 10  $\mu\text{L}$  5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzojeve kiseline)–DTNB, čija koncentracija iznosi 0,3 mmol  $\text{L}^{-1}$  (početna otopina pripremljena u 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  fosfatnom puferu pH=7 s dodatkom 0,12 mol  $\text{L}^{-1}$  natrij-bikarbonata radi stabilnosti DTNB-a)
- 10  $\mu\text{L}$  acetilkolinesteraze - AChE, čija koncentracija u smjesi iznosi 0,03 U  $\text{mL}^{-1}$
- 10  $\mu\text{L}$  acetiltiokolinjodida - ATChI, čija koncentracija u smjesi iznosi 0,5 mmol  $\text{L}^{-1}$  (početne otopine AChE i ATChI pripremljene su koristeći 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  fosfatni pufer pH=8)
- 10  $\mu\text{L}$  uzorka određene koncentracije otopljenog u etanolu ili samog etanola u slučaju kontrolnog mjerenja

*Tablica 5. Shema otopina u eksperimentu*

	KONTROLA	BL <sub>1</sub>	BL <sub>2</sub>	UZORAK M	UZORAK BL
PUFER	180	190	190	180	190
DTNB	10	10	10	10	10
UZORAK/EtOH	0/10	0/10	0/10	10/0	10/0
AChE	10	/	10	10	/
ATChI	10	10	/	10	10

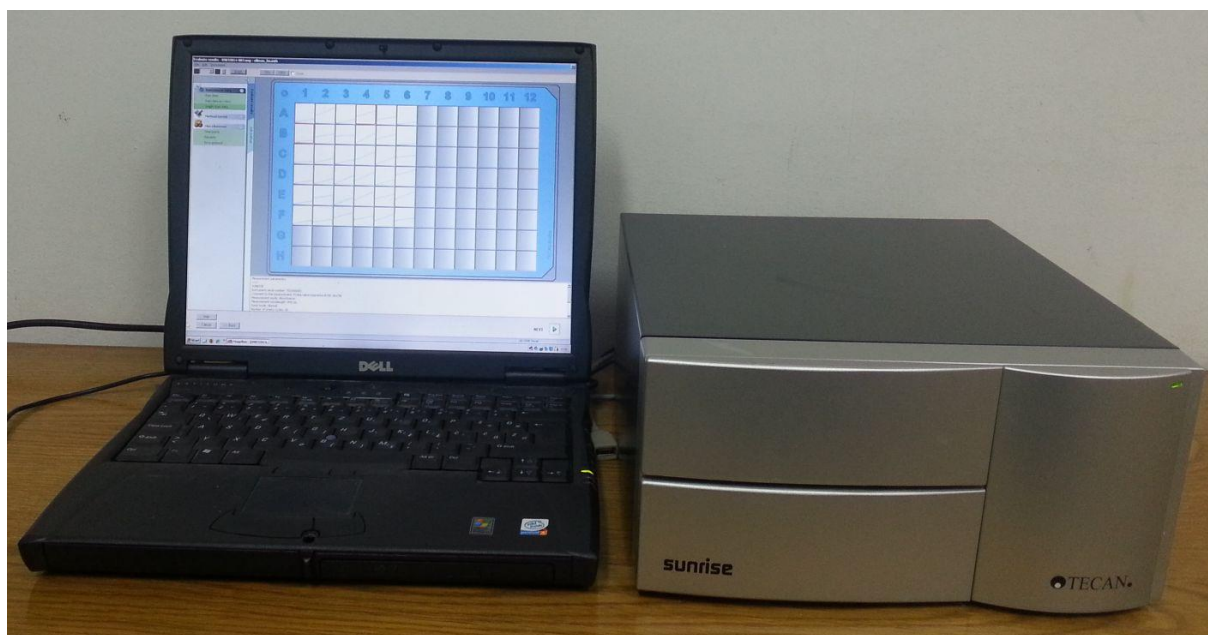


*Slika 12. Automatska mikropipeta i otopine različitih koncentracija inhibitora*

Konačni volumen smjese iznosi 220  $\mu\text{L}$ . Uzorci se otpipetiraju u jažice, prema shemi iz tablice 5. s tim da se supstrat ATChI dodaje neposredno prije početka mjerenja budući da njime započinje reakcija. Kod mjerenja kontrole (E) koristi se etanol (krajnja koncentracija etanola u sustavu nije prelazila 4,4 %). Ne-enzimska hidroliza praćena je tzv. "blank" mjerenjima, odnosno slijepim probama. U jednoj slijepoj probi izostavljena je AChE, a u drugoj ATChI koji se zamijeni jednakim volumenom pufera (umjesto 180  $\mu\text{L}$  dodaje se 190  $\mu\text{L}$  pufera).

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.





*Slika 13. Višekanalni čitač mikrotitarskih pločica Sunrise (Tecan, GmbH, Austria)*



*Slika 14. Dodavanje ATChI neposredno prije mjerenja na višekanalnom čitaču mikrotitarskih pločica Sunrise*

Sposobnost inhibicije enzima (postotci inhibicije) računaju se prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije AChE} = [(A_K - A_A / A_K)] \times 100 \quad (4)$$

gdje je:

$A_K$  – apsorbancija test otopine,

$A_A$  – apsorbancija kontrolnog uzorka.

### 3. REZULTATI

U ovom radu ispitana je inhibicijska sposobnost  $\beta$ -kariofilena i kariofilen oksida na enzim acetilkolinesterazu (AChE). Određen je postotak inhibicije za različite koncentracije svakog od ova dva spoja pri koncentraciji supstrata ATChI 0,5 mM.

Rezultati inhibicijskog djelovanja različitih koncentracija  $\beta$ -kariofilena na enzim AChE pri koncentraciji supstrata ATChI 0,5 mM prikazani su u tablici 6.

Iz izračunatih postotaka inhibicije (tablica 6.) može se zaključiti da  $\beta$ -kariofilen pokazuje sposobnost inhibicije enzima AChE i da povećanjem koncentracije inhibitora raste i postotak inhibicije. Maksimalna inhibicija AChE postignuta je pri koncentraciji  $\beta$ -kariofilena od 45,45  $\mu\text{g mL}^{-1}$  i iznosi 96,13 %.

Kariofilen oksid nije pokazao inhibicijsku aktivnost na enzim AChE pri različitim koncentracijama (najveća testirana koncentracija: 45,45  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**Tablica 6.** Postotci inhibicije za različite koncentracije  $\beta$ -kariofilena

[I]/ $\mu\text{g mL}^{-1}$	% inhibicije
4,54	19,52
11,36	45,86
22,73	91,2
34,09	92,24
45,45	96,13

Iz dobivenih rezultata može se izračunati IC<sub>50</sub> vrijednost tj. koncentracija inhibitora potrebna da bi se postigla inhibicija enzima od 50%.

$$\text{IC}_{50} (\beta\text{-kariofilen}) = 12,39 \mu\text{g mL}^{-1}$$

## 4. RASPRAVA

Brojna istraživanja su pokazala da pojedine biljne vrste i njihovi sastojci posjeduju inhibicijsku aktivnost na enzim acetilkolinesterazu (AChE) te bi se mogle primjenjivati kao potencijalni lijekovi za tretiranje Alzheimerove bolesti.

Cilj ovog rada bio je ispitati potencijalnu sposobnost inhibicije enzima AChE korištenjem različitih koncentracija prirodnih bicikličkih seskviterpena:  $\beta$ -kariofilena i kariofilen oksida izoliranih iz eteričnog ulja klinčića, ružmarina ili hmelja. Inhibicijska sposobnost AChE određena je spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu praćenjem porasta apsorbancije žuto obojenog aniona (DTNB + tiokolin).

Iz izračunatih postotaka inhibicije za različite koncentracije  $\beta$ -kariofilena (tablica 6.) vidljivo je da  $\beta$ -kariofilen pokazuje sposobnost inhibicije AChE, povećanjem koncentracije raste i postotak inhibicije. Najveća inhibicija enzima AChE postignuta je pri koncentraciji inhibitora od  $45,45 \mu\text{g mL}^{-1}$  i iznosi 96,13 %, dok  $IC_{50}$  vrijednost iznosi  $12,39 \mu\text{g mL}^{-1}$

Isti postupak proveden je i s različitim koncentracijama kariofilen oksida međutim eksperimentalni rezultati pokazali su da on nema sposobnost inhibicije AChE. Najveća korištena koncentracija je bila  $45,45 \mu\text{g mL}^{-1}$

## 5. ZAKLJUČAK

- Inhibicijska sposobnost  $\beta$ -kariofilena na enzim acetilkolinesterazu ispitana je metodom po Ellmanu. Zaključeno je da  $\beta$ -kariofilen pokazuje sposobnost inhibicije enzima.
- Povećanjem koncentracije  $\beta$ -kariofilena povećava se i postotak inhibicije. Maksimalna inhibicija enzima postignuta je pri koncentraciji  $\beta$ -kariofilena od  $45,45 \mu\text{g mL}^{-1}$  i iznosi 96,13 %.  $\text{IC}_{50}$  vrijednost iznosi  $12,39 \mu\text{g mL}^{-1}$ .
- Kariofilen oksid se nije pokazao kao inhibitor enzima AChE (nije postignuta inhibicija pri različitim koncentracijama ovog spoja). Najveća korištena koncentracija bila je  $45,45 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

## 6. LITERATURA

1. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Poglavlje 8. Enzimi: osnovne zamisli i kinetika iz Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
2. F. Burčul, *Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae*, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2014.
3. A. Đulović, *Usporedba dviju metoda za određivanje inhibicijske sposobnosti na kolinesteraze*, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2014.
4. URL:<http://www.medicinskileksikon.info/znacenje/acetilkolinesteraza.html>, 4.08.2016.
5. M. L. Raves, M. Harel, Y.-P. Pang, I. Silman, A. P. Kozikowski, J. L. Sussman, *Structure of acetylcholinesterase complexed with the nootropic alkaloid, (-)- huperzin A*. *Nat.Struct.Biol.* 4 (1997) 57-63
6. A. Bosak, M. Kalinić, Z. Kovarik, *ArhHig Rada Toksikol*, 62 (2011), 175-190
7. URL: [http://neuron.mefst.hr/docs/medicina/medicineengl/katedra fiziologija/Zdravstveni studiji/prezentacije/Sredisnjizivcani sustav ZDRAV STUD2013.pdf](http://neuron.mefst.hr/docs/medicina/medicineengl/katedra_fiziologija/Zdravstveni_studiji/prezentacije/Sredisnjizivcani_sustav_ZDRAV_STUD2013.pdf), 5.08.2016.
8. URL: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/neurologija/delirij-i-demencija/alzheimerova-bolest>, 5.8.2016
9. A. Radanović, *Ispitivanje sposobnosti inhibicije acetilkolinesteraze i određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenog ekstrakta mirisne ljubice (Viola odorata L.)*, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2015.
10. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Caryophyllene>, 7.8.2016.
11. URL: <http://www.leafscience.com/2014/07/08/b-caryophyllene-terpene-anxiety-depression/>, 7.8.2016..
12. D.A.Skoog, West, Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999.

13. G. L. Ellman, D. K. Courtney, V. Andres, R. M. Featherstone, *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*, *Biochem. Pharmacol.* 7, 1961. 88-95