

# Kinetičke značajke $\alpha$ -terpinolena kao inhibitora acetilkolinesteraze

---

Vlajčević, Dina

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:167:614304>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-26**

*Repository / Repozitorij:*

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



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

**KINETIČKE ZNAČAJKE  $\alpha$ -TERPINOLENA KAO  
INHIBITORA ACETILKOLINESTERAZE**

**ZAVRŠNI RAD**

**DINA VLAJČEVIĆ**

**Matični broj: 199**

**Split, srpanj 2016.**



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

**KINETIČKE ZNAČAJKE  $\alpha$ -TERPINOLENA KAO  
INHIBITORA ACETILKOLINESTERAZE**

**ZAVRŠNI RAD**

**DINA VLAJČEVIĆ**

**Matični broj: 199**

**Split, srpanj 2016.**

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

**KINETIC FEATURES OF ACETYLCHOLINESTERASE**  
**INHIBITOR  $\alpha$ -TERPINOLENE**  
**BACHELOR THESIS**

**DINA VLAJČEVIĆ**

**Parent number: 199**

**Split, July 2016.**

## 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 4. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

**Mentor:** dr. sc. Franko Burčul, znanstveni suradnik

**Pomoć pri izradi:**

### KINETIČKE ZNAČAJKE $\alpha$ -TERPINOLENA KAO INHIBITORA ACETILKOLINESTERAZE

Dina Vljčević, 199

**Sažetak:** Enzimi su biokatalizatori. Oni kataliziraju reakcije tako što stabiliziraju prijelazno stanje. Visoko su specifični po reakcijama koje kataliziraju kao i po supstratima, najčešće kataliziraju samo jednu reakciju ili nekoliko srodnih reakcija. Najvažniji dio enzima je aktivno mjesto u kojem se odvija specifična reakcija. Acetilkinesteraza (AChE) je enzim iz skupine hidrolaza. Katalizira reakciju hidrolize neuroprijenosnika acetilkolina na acetat i kolin. Kao izvor enzima korištena je AChE iz elektrofora električne jegulje (Tip V-S), a kao supstrat enzima korišten je acetiltiokolin-jodid (ATChI) dok je  $\alpha$ -terpinolen ispitivan na inhibiciju AChE. Inhibicija acetilkolinesteraze ima ključnu ulogu u ublažavanju simptoma kod Alzheimerove demencije. Cilj ovoga rada bio je ispitati sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze korištenjem  $\alpha$ -terpinolena kao inhibitora te odrediti vrstu inhibicije. Iz Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Wolf i Eisenthal – Cornish-Bowden prikaza te izračunatih postotaka inhibicije zaključeno je da  $\alpha$ -terpinolen pokazuje sposobnost inhibicije enzima AChE. Povećanjem koncentracije  $\alpha$ -terpinolena povećava se i postotak inhibicije, a najveća vrijednost inhibicije je postignuta pri koncentraciji  $\alpha$ -terpinolena od 0,0227 mg mL<sup>-1</sup> i iznosi 91,8 %. Također je zaključeno da se radi o inhibiciji miješanog tipa te su određeni odgovarajući kinetički parametri  $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $K_M^{app}$ ,  $V_{max}^{app}$ ,  $K_I$  i  $K_I'$ .

**Ključne riječi:** acetilkolinesteraza, inhibicija,  $\alpha$ -terpinolen, kinetika, Alzheimerova demencija.

**Rad sadrži:** 40 stranica, 34 slike, 7 tablica, 14 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:** 13. srpnja 2016.

**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. 4.

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

**Technical assistance:**

### KINETIC FEATURES OF ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITOR $\alpha$ -TERPINOLENE

Dina Vljajčević, 199

**Abstract:** Enzymes are biocatalysts. They catalyse reactions by stabilizing the transition state and are highly specific for reactions that they catalyse as well as their substrates. Enzymes usually catalyse only one or small number of similar reactions. The most important part of the enzyme is their active site where reactions take place. Acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme that belongs to the hydrolases group and catalyses the hydrolysis of the acetylcholine neurotransmitter to acetate and choline. In this study AChE from the electrophores of electric eel (type V-S) was used as a source of the enzyme and acetylthiocholine iodide (ATChI) was used as a substrate while  $\alpha$ -terpinolene was tested for AChE inhibitory activity. Inhibition of acetylcholinesterase has a crucial role in the treatment of Alzheimer's dementia. The aim of this study was to examine the ability of  $\alpha$ -terpinolene to inhibit AChE and to determine the type of inhibition. After reviewing the results using Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Wolf and Eisenthal – Cornish-Bowden plots as well as calculating the inhibition percentage it was concluded that  $\alpha$ -terpinolene shows ability to inhibit the AChE in concentration dependant manner. Maximum percentage of AChE inhibition, 91,8 %, was achieved at  $\alpha$ -terpinolene concentration of 0,0227 mg mL<sup>-1</sup>. It was, also, concluded that  $\alpha$ -terpinolene exhibits a mixed type inhibition and appropriate kinetic parameters were determined i.e.  $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $K_M^{app}$ ,  $V_{max}^{app}$ ,  $K_I$  i  $K'_I$ .

**Keywords:** acetylcholinesterase, inhibition,  $\alpha$ -terpinolene, kinetics, Alzheimer's dementia

**Thesis contains:** 40 pages, 34 pictures, 7 tables, 14 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:** July 13<sup>th</sup>, 2016.

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





*Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom znanstvenog suradnika dr. sc. Franka Burčula, u vremenskom razdoblju od svibnja do srpnja 2016. godine.*

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

*Iskreno se zahvaljujem svom mentoru dr. sc. Franku Burčulu na pomoći pri izvedbi eksperimentalnog dijela rada te na korisnim savjetima i uputama prilikom pisanja rada.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji na neizmjernoj podršci tijekom studiranja.*

*Dina Vlajčević*

## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA :

- Ispitivanje inhibicijskih svojstava  $\alpha$ -terpinolena na enzim acetilkolinesterazu metodom po Ellmanu (postotak inhibicije, vrsta inhibicije);
- Određivanje kinetičkih parametara  $K_M$ ,  $K_M^{app}$ ,  $V_{max}$ ,  $V_{max}^{app}$ ,  $K_I$  i  $K'_I$  enzima acetilkolinesteraze u prisustvu  $\alpha$ -terpinolena kao inhibitora.

## Sažetak

Enzimi su biokatalizatori. Oni kataliziraju reakcije tako što stabiliziraju prijelazno stanje. Visoko su specifični po reakcijama koje kataliziraju kao i po supstratima, najčešće kataliziraju samo jednu reakciju ili nekoliko srodnih reakcija. Najvažniji dio enzima je aktivno mjesto u kojem se odvija specifična reakcija.

Acetilkinesteraza (AChE) je enzim iz skupine hidrolaza. Katalizira reakciju hidrolize neuroprijenosnika acetilkolina na acetat i kolin. Kao izvor enzima korištena je AChE iz elektrofora električne jegulje (Tip V-S), a kao supstrat enzima korišten je acetiltiokolin-jodid (ATChI) dok je  $\alpha$ -terpinolen ispitivan na inhibiciju AChE. Inhibicija acetilkolinesteraze ima ključnu ulogu u ublažavanju simptoma kod Alzheimerove demencije.

Cilj ovoga rada bio je ispitati sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze korištenjem  $\alpha$ -terpinolena kao inhibitora te odrediti vrstu inhibicije.

Iz Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Wolf i Eisenthal – Cornish-Bowden prikaza te izračunatih postotaka inhibicije zaključeno je da  $\alpha$ -terpinolen pokazuje sposobnost inhibicije enzima AChE. Povećanjem koncentracije  $\alpha$ -terpinolena povećava se i postotak inhibicije, a najveća vrijednost inhibicije je postignuta pri koncentraciji  $\alpha$ -terpinolena od  $0,0227 \text{ mg mL}^{-1}$  i iznosi 91,8 %.

Također je zaključeno da se radi o inhibiciji miješanog tipa te su određeni odgovarajući kinetički parametri  $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $K_M^{app}$ ,  $V_{max}^{app}$ ,  $K_I$  i  $K'_I$ .

**Ključne riječi:** acetilkolinesteraza, inhibicija,  $\alpha$ -terpinolen, kinetika, Alzheimerova demencija.

## Summary

Enzymes are biocatalysts. They catalyse reactions by stabilizing the transition state and are highly specific for reactions that they catalyse as well as their substrates. Enzymes usually catalyse only one or small number of similar reactions. The most important part of the enzyme is their active site where reactions take place.

Acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme that belongs to the hydrolases group and catalyses the hydrolysis of the acetylcholine neurotransmitter to acetate and choline. In this study AChE from the electrophores of electric eel (type V-S) was used as a source of the enzyme and acetylthiocholine iodide (ATChI) was used as a substrate while  $\alpha$ -terpinolene was tested for AChE inhibitory activity. Inhibition of acetylcholinesterase has a crucial role in the treatment of Alzheimer's dementia.

The aim of this study was to examine the ability of  $\alpha$ -terpinolene to inhibit AChE and to determine the type of inhibition.

After reviewing the results using Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Wolf and Eisenthal – Cornish-Bowden plots as well as calculating the inhibition percentage it was concluded that  $\alpha$ -terpinolene shows ability to inhibit the AChE in concentration dependant manner. Maximum percentage of AChE inhibition, 91,8 %, was achieved at  $\alpha$ -terpinolene concentration of 0,0227 mg mL<sup>-1</sup>.

It was, also, concluded that  $\alpha$ -terpinolene exhibits a mixed type inhibition and appropriate kinetic parameters were determined i.e.  $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $K_M^{app}$ ,  $V_{max}^{app}$ ,  $K_I$  i  $K'_I$ .

**Keywords:** acetylcholinesterase, inhibition,  $\alpha$ -terpinolene, kinetics, Alzheimer's dementia

# Sadržaj

UVOD .....	1
1. OPĆI DIO .....	2
1.1. Enzimi .....	2
1.1.1. Klasifikacija enzima .....	3
1.1.2. Princip djelovanja enzima .....	4
1.1.3. Enzimska kinetika .....	6
1.1.4. Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Wolf i Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz .....	6
1.2. Inhibicija enzimske aktivnosti.....	11
1.3. Acetilkinolin i acetilkolinesteraza .....	18
1.3.1. Alzheimerova bolest.....	23
1.4. $\alpha$ -Terpinolen.....	25
1.5. Spektrofotometrija.....	27
1.5.1. Ellmanova metoda.....	28
2. EKSPERIMENTALNI DIO.....	29
2.1. Priprema kemikalija .....	29
2.1.1. Određivanje kinetičkih parametara i sposobnosti inhibicije AChE .....	30
3. REZULTATI.....	31
4. RASPRAVA .....	38
5. ZAKLJUČAK .....	39
6. LITERATURA.....	40

## UVOD

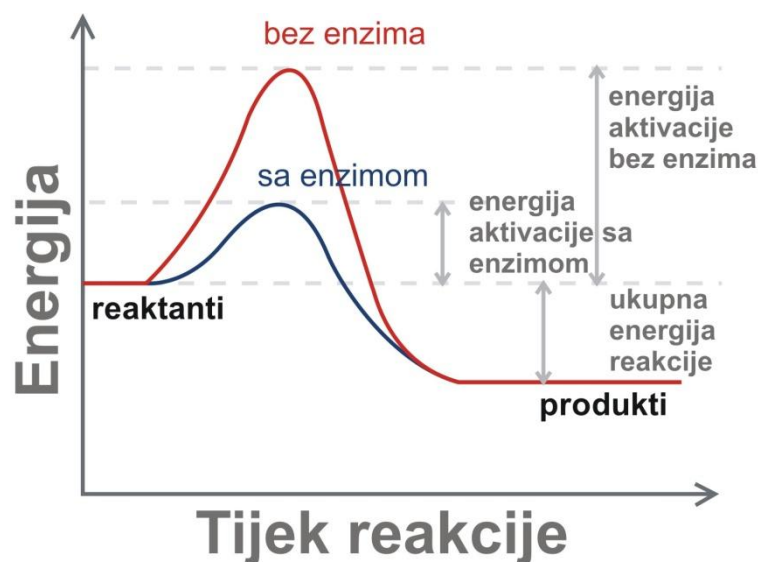
**Enzimi** su biokatalizatori bez čije se prisutnosti većina reakcija u živim organizmima ne bi odvijala ili bi tekla vrlo sporo. Oni kataliziraju reakcije tako što stabiliziraju prijelazno stanje, odnosno smanjuju energiju aktivacije. Visoko su specifični za određene reakcije koje kataliziraju kao i odgovarajuće supstrate. Najčešća podjela enzima je po reakcijama koje kataliziraju pa tako razlikujemo šest obitelji enzima: oksidoreduktaze, hidrolaze, ligaze, transferaze, izomeraze i liaze. Što se tiče strukture, najvažniji dio svakog enzima je aktivno mjesto, dio strukture u kojem se veže supstrat i odvija specifična reakcija, preko enzim-supstrat kompleksa. Za aktivnost mnogih enzima često su potrebni i kofaktori. Apoenzim predstavlja neaktivnu formu (bez kofaktora), a holoenzim je katalitički aktivan enzim (enzim + kofaktor). Aktivnost mnogih enzima može se smanjiti i/ili zaustaviti vezanjem određenih molekula i/ili iona. Inhibicija enzimske aktivnosti glavni je kontrolni mehanizam u biološkim sustavima. Kinetički parametri  $K_M$  i  $V_{max}$  važne su karakteristike enzima.  $K_M$  je koncentracija supstrata pri kojoj je popunjena polovica aktivnih mjesta i mjera je čvrstoće kompleksa enzim-supstrat (kad je  $k_{-1} \gg k_2$ ) dok  $V_{max}$  daje obrtni broj enzima.

**Acetilholinesteraza (AChE)** je enzim iz skupine hidrolaza. Katalizira hidrolizu neuroprijenosnika acetilkolina na acetat i kolin. Inhibitori acetilholinesteraze su tvari koje sprječavaju razgradnju neuroprijenosnika acetilkolina i imaju utjecaj na funkciju mozga. Istraživanja tih spojeva se provode u nadi da se pronađe adekvatan lijek za neurodegenerativne poremećaje poput Alzheimerove demencije. U ovom radu je kao inhibitor AChE korišten  $\alpha$ -tepinolen. To je spoj iz grupe terpena, spojeva čija je osnovna strukturna jedinica izopren.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Enzimi

Enzimi su biokatalizatori. Bez njihove se prisutnosti reakcije u biološkim sustavima ne događaju zamjetljivim brzinama. Gotovo svi poznati enzimi su proteini, uz iznimku malog broja katalitičkih RNA molekula. Visoko su specifični po reakcijama koje kataliziraju kao i po odgovarajućim supstratima. Enzim najčešće katalizira samo jednu reakciju ili nekoliko srodnih reakcija. Za aktivnost mnogih enzima potrebni su kofaktori. Kofaktori općenito sudjeluju u izvođenju enzimskih reakcija i imaju različite uloge (npr. prijenos elektrona). U kofaktore spadaju razne vrste spojeva od metalnih iona do prostetičkih skupina. Organske molekule nazivamo koenzimima i oni najčešće potječu od vitamina, dok kofaktore koji su čvršće vezani za enzim nazivamo prostetičkim skupinama. Neaktivan enzim bez kofaktora, naziva se apoenzim, a katalitički aktivan enzim, s odgovarajućim kofaktorom, naziva se holoenzim. Enzimi ubrzavaju reakcije na način da olakšavaju nastanak prijelaznog stanja, odnosno smanjuju energiju aktivacije koju je potrebno prijeći da bi se reakcija odvila. Na taj način oni ubrzavaju postizanje ravnoteže, ali ne mijenjaju njen položaj.<sup>1</sup>



Slika 1. Reakcijski tok nekatalizirane i katalizirane reakcije



### 1.1.1. 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 6 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. Podjela enzima po klasama prikaza je u tablici 1. Prema ovoj klasifikaciji svaki enzim ima šifru od 4 broja. Prvi broj označava klasu, drugi podklasu, treći skupinu, a četvrti podskupinu.

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. → Acetilkinesteraza

**Tablica 1.** Klasifikacija enzima

KLASA	NAZIV	VRSTA REAKCIJE	PRIMJERI
1	OKSIDOREDUKTAZE	kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije	dehidrogenaze reduktaze oksidaze peroksidaze
2	TRANSFERAZE	kataliziraju prijenos metilnih, acilnih, fosfatnih, amino i drugih skupina s molekule na molekulu	kinaze transaminaze
3	HIDROLAZE	kataliziraju hidrolizu esterskih, eterskih, peptidnih, glikozidnih i drugih veza	esteraze fosfataze proteaze fosfolipaze
4	LIAZE	kataliziraju cijepanje C-C, C-O, C-N i drugih veza eliminacijom atoma uz stvaranje dvostruke veze	dekarboksilaze aldolaze
5	IZOMERAZE	kataliziraju reakcije izomerizacije, odnosno geometrijske promjene unutar molekule	izomeraze mutaze
6	LIGAZE	kataliziraju nastajanje veza C-C, C-O, C-N, C-S uz hidrolizu ATP-a	sintetaze

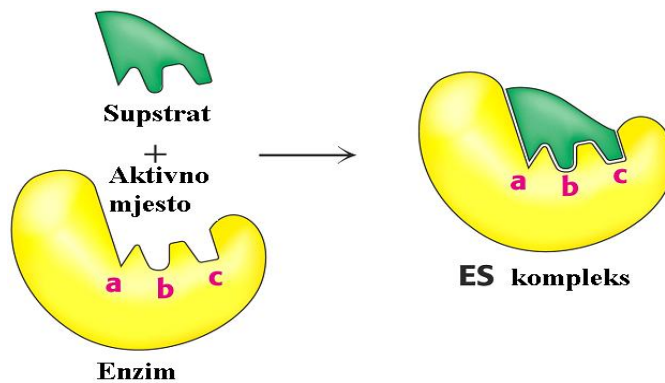
### 1.1.2. Princip djelovanja enzima

Prvi korak enzimske katalize je nastanak kompleksa enzim-supstrat (ES). Supstrati se vežu na specifični dio enzima nazvan aktivnim mjestom. Aktivno mjesto 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. Iako su enzimi različiti po svojoj strukturi, specifičnosti i načinu katalize, njihova aktivna mjesta imaju neka zajednička svojstva:

- aktivno je mjesto trodimenzionalni utor ili udubina koju čine skupine iz različitih dijelova aminokiselinske sekvencije
- aktivno mjesto zauzima relativno mali dio cjelokupne molekule enzima
- supstrati se u aktivno mjesto vežu slabim vezama (vodikove veze, hidrofobne interakcije, van der Waalsove sile).

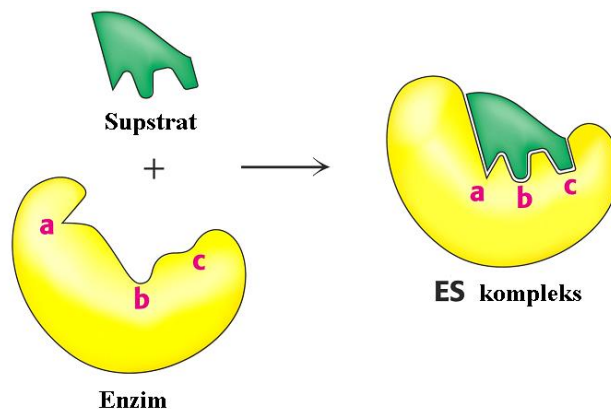
Specifičnost vezanja supstrata ovisi o strogo definiranom rasporedu atoma u aktivnom mjestu, a sam supstrat mora nužno imati prikladan oblik kako bi pristajao u aktivno mjesto. Postoje dva modela za vezanje enzima i supstrata.

1. **Model ključa i brave:** aktivno mjesto enzima komplementarno je obliku supstrata



**Slika 2.** Model ključa i brave za vezanje enzima i supstrata<sup>2</sup>

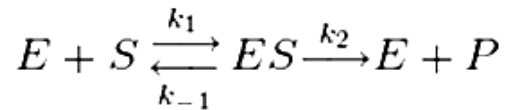
2. **Model induciranog pristajanja:** aktivno je mjesto komplementarno supstratu tek nakon njegova vezanja



**Slika 3.** Model induciranog pristajanja za vezanje enzima i supstrata<sup>2</sup>

### 1.1.3. Enzimaska kinetika

Enzimaska se kinetika bavi proučavanjem brzina enzimskih reakcija. Godine 1913. Leonor Michaelis i Maud Menten predložili su jednostavan model koji objašnjava kinetička svojstva mnogih enzima (izuzetak su alosterički enzimi koji ne podliježu kinetici Michaelis-Menten). Srž njihove zamisli bio je nastanak kompleksa enzim-supstrat.<sup>2</sup>



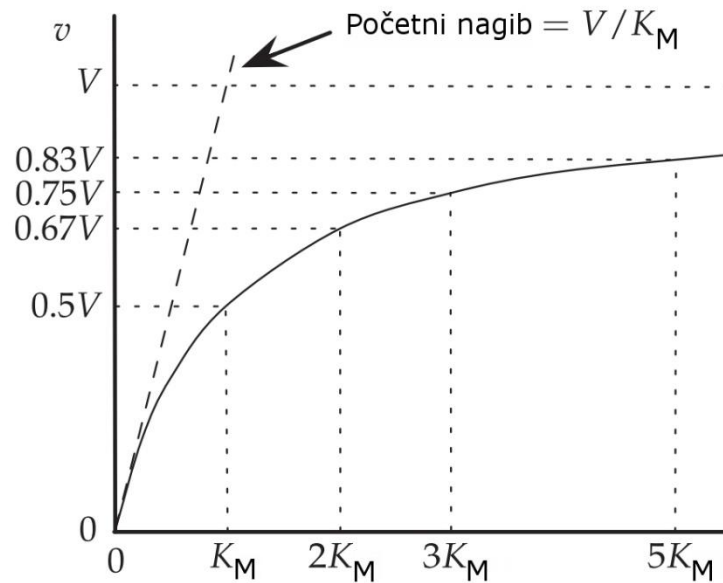
**Slika 4.** Nastajanje kompleksa ES

Supstrat (S) se veže u aktivno mjesto enzima (E) pri čemu nastaje enzim-supstrat (ES), kompleks ( $k_1$ , konstanta brzine nastajanja kompleksa ES). Kompleks ES može disociirati na enzim i supstrat (konstanta brzine  $k_{-1}$ ) ili može dati produkt (konstanta brzine  $k_2$ ).

### 1.1.4. Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Wolf i Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz

Kod enzima koji podliježu kinetici Michaelis-Menten, brzina se reakcije (V) povećanjem koncentracije supstrata (S) približava maksimalnoj brzini ( $V_{max}$ ). Koncentracija supstrata pri kojoj je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne brzine reakcije zove se Michaelisova konstanta ( $K_M$ ). Sljedeći izraz predstavlja Michaelis-Menten jednadžbu:

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot S}{K_M + S} \quad (1)$$



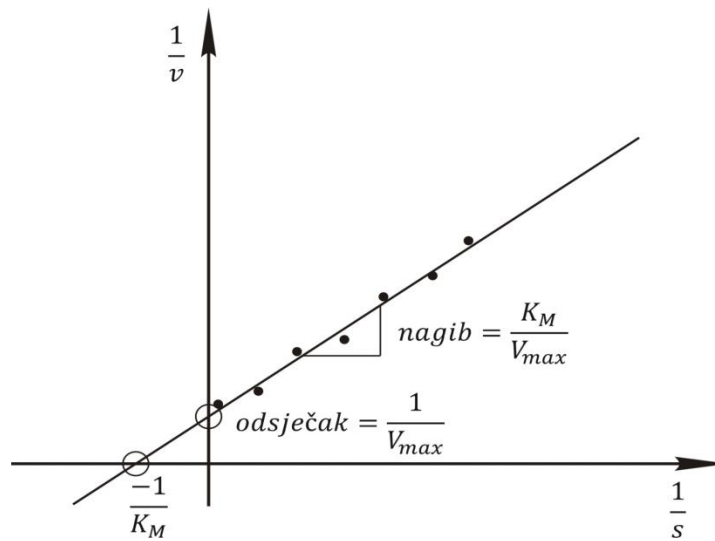
**Slika 5.** Michaelis-Menten krivulja ( $v=v_0$ ,  $V=V_{max}$ )

Vrijednosti  $K_M$  i  $V_{max}$  važne su karakteristike enzima.  $K_M$  nekog enzima ovisi o supstratu te o vanjskim utjecajima kao što su pH-vrijednost, temperatura i ionska jakost.  $K_M$  ima dva značenja. Prvo,  $K_M$  je koncentracija supstrata pri kojoj je popunjena polovica aktivnih mjesta te na taj način  $K_M$  govori o koncentraciji koja je potrebna da se postigne značajna kataliza. Drugo, kad je  $k_{-1}$  (konstanta disocijacije kompleksa ES)  $\gg k_2$  (konstanta brzine nastajanja produkta), tada je  $K_M$  jednak konstanti disocijacije kompleksa ES i pod tim je uvjetima  $K_M$  mjera čvrstoće tog kompleksa. Visoki  $K_M$  označava slabo vezanje, a niski čvrsto vezanje. Maksimalna brzina reakcije ( $V_{max}$ ) daje obrtni broj enzima. To je broj molekula supstrata koje molekula enzima pretvori u produkt u jedinici vremena, kad je enzim potpuno zasićen supstratom.

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-Wolf i Eisenthal – Cornish-Bowden linearizirani prikaz.

- **Lineweaver-Burk prikaz:**  $1/V$  nanosi se kao funkcija  $1/[S]$  i dobije se pravac sa sjecištem na ordinati  $1/V_{max}$  a na apscisi  $-1/K_M$  te nagibom pravca  $K_M/V_{max}$  (slika 6). Sljedeći izraz predstavlja Lineweaver-Burk linearizirani oblik Michaelis-Menten jednadžbe:

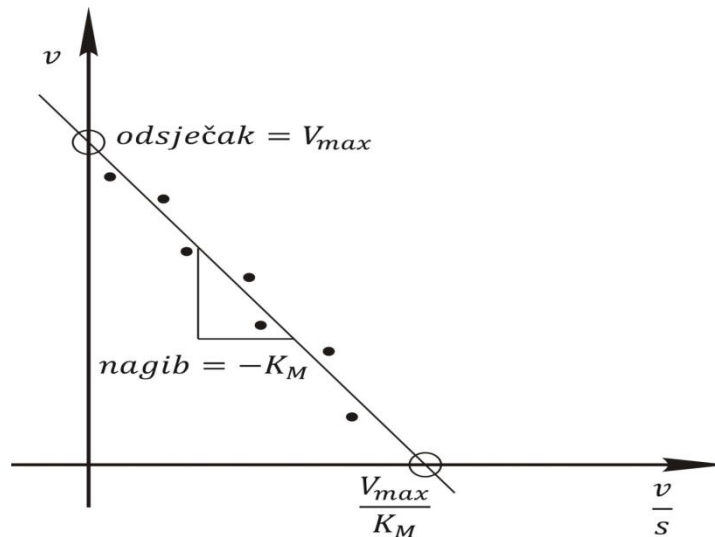
$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2)$$



Slika 6. 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 7). Sljedeći izraz predstavlja Eadie-Hofstee linearizirani oblik Michaelis-Menten jednadžbe:

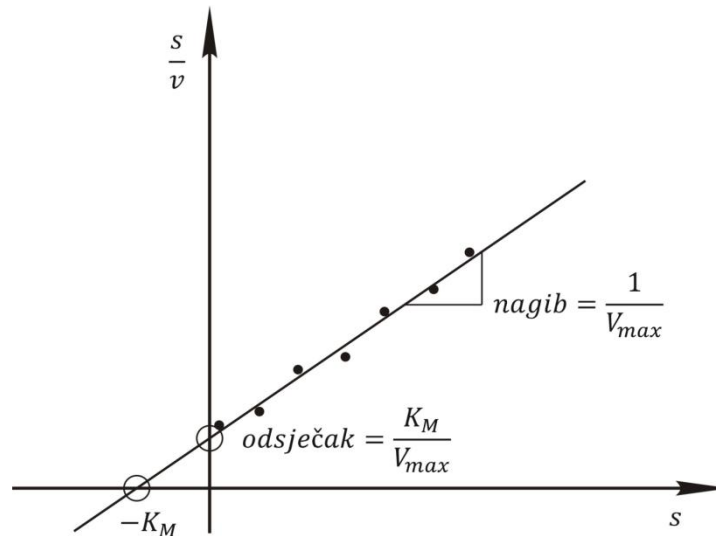
$$v_0 = V_{max} - K_M * \frac{v_0}{S} \quad (3)$$



Slika 7. Eadie-Hofstee prikaz

- **Hanes-Wolf prikaz:** na apscisu se nanosi [S], a na ordinatu [S]/V i dobije se pravac s nagibom  $1/V_{max}$  (slika 8). Sljedeći izraz predstavlja Hanes-Wolf linearizirani oblik Michaelis-Menten jednadžbe:

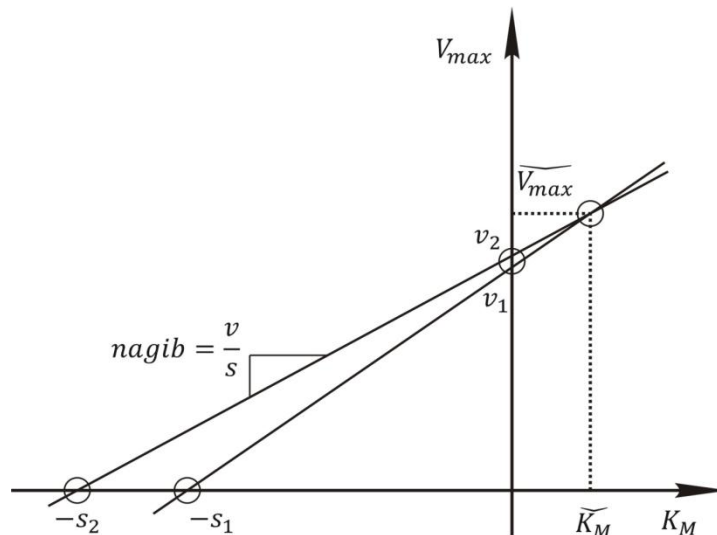
$$\frac{S}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{S}{V_{max}} \quad (4)$$



**Slika 8.** Hanes-Wolf prikaz

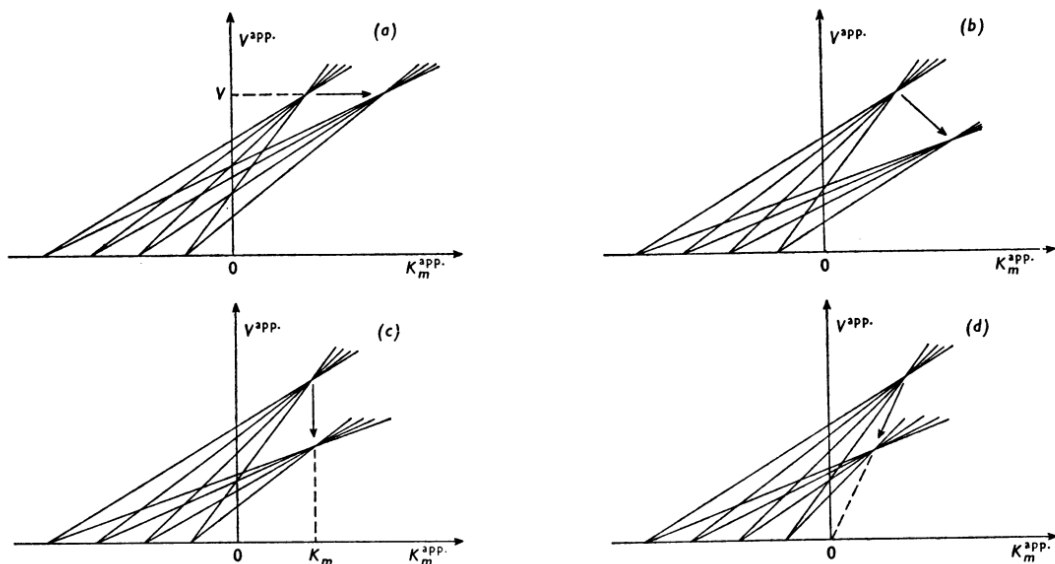
- **Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz:** na apscisu ( $K_M$  os) se nanose negativne vrijednosti [S], a na ordinatu ( $V_{max}$  os) se nanosi  $V$  i dobije se pravac s nagibom  $V/[S]$  koji se širi u prvi kvadrant (slika 9). Za više pravaca (različite konc. supstrata) dobije se sjecište sa koordinatama koje odgovaraju vrijednostima  $K_M$  i  $V_{max}$ . U realnom slučaju pravci se ne sijeku u jednoj točki, nego dobijemo više sjecišta od kojih medijan daje najbolju vrijednost  $K_M$  i  $V_{max}$ . Sljedeći izraz predstavlja Eisenthal – Cornish-Bowden linearizirani oblik Michaelis-Menten jednadžbe:

$$V_{max} = v_0 + \frac{v_0}{S} * K_M \quad (5)$$



**Slika 9.** Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz

Na slici 10 prikazan je način određivanja vrste inhibicije iz Eisenthal – Cornish-Bowden prikaza. Za različite koncentracije inhibitora dobije se skup sjecišta i ako su točke sjecišta paralelne s  $K_M$  osi radi se o kompetitivnoj inhibiciji (slika 10a), a ako su točke sjecišta paralelne s  $V_{max}$  osi radi se o nekompetitivnoj inhibiciji (slika 10c). Slučaj *c* i *d* (slika 10) prikazuju smjer točaka sjecišta za miješanu i akompetitivnu inhibiciju.



**Slika 10.** Određivanje vrste inhibicije: a) kompetitivna, b) miješana, c) nekompetitivna i d) akompetitivna. Za svaku vrstu inhibicije, strelica pokazuje smjer kretanja zajedničkog sjecišta ( $K_M^{app}$ ,  $V_{max}^{app}$ ) na grafu, koje se pomiče kako koncentracija inhibitora raste<sup>3</sup>



## 1.2. Inhibicija enzimske aktivnosti

Aktivnost mnogih enzima može se inhibirati vezanjem određenih molekula i iona koji se nazivaju inhibitorima. Inhibitori djeluju tako da usporavaju i/ili zaustavljaju enzimske reakcije. Inhibicija enzimske aktivnosti glavni je kontrolni mehanizam u biološkim sustavima.

Inhibicija može biti ireverzibilna i reverzibilna. Ireverzibilni su inhibitori vrlo čvrsto vezani na ciljani enzim pa je disocijacija kompleksa enzim-inhibitor (EI) vrlo spora. Nasuprot tomu, reverzibilnu inhibiciju karakterizira vrlo brza disocijacija kompleksa enzim-inhibitor i postoje četiri glavna slučaja: kompetitivna, akompetitivna, nekompetitivna i miješana.

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

Kod **kompetitivne** inhibicije dolazi do vezanja inhibitora u aktivno mjesto enzima pa je spriječeno vezanje supstrata. Razlog tomu je taj što kompetitivni inhibitor često nalikuje na supstrat. Kompetitivni inhibitor smanjuje brzinu katalize smanjujući broj molekula enzima koje vežu supstrat, ali pri bilo kojoj koncentraciji inhibitora, kompetitivna se inhibicija može nadvladati povećanjem koncentracije supstrata (slika 11). Kompetitivni inhibitor ne utječe na  $V_{max}$ , ali povećava  $K_M$  (slika 12).<sup>4</sup> U ovom slučaju Michaelis-Menten jednadžba poprima sljedeći oblik:

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot S}{\alpha K_M + S} \quad (6)$$

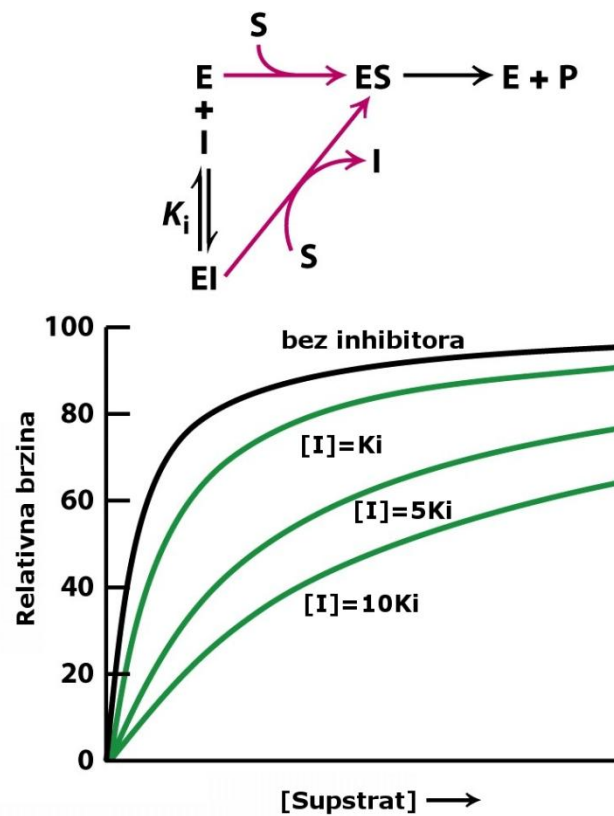
gdje je  $\alpha$  faktor za koji se povećava  $K_M$  i prikazan je sljedećim izrazom:

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad (7)$$

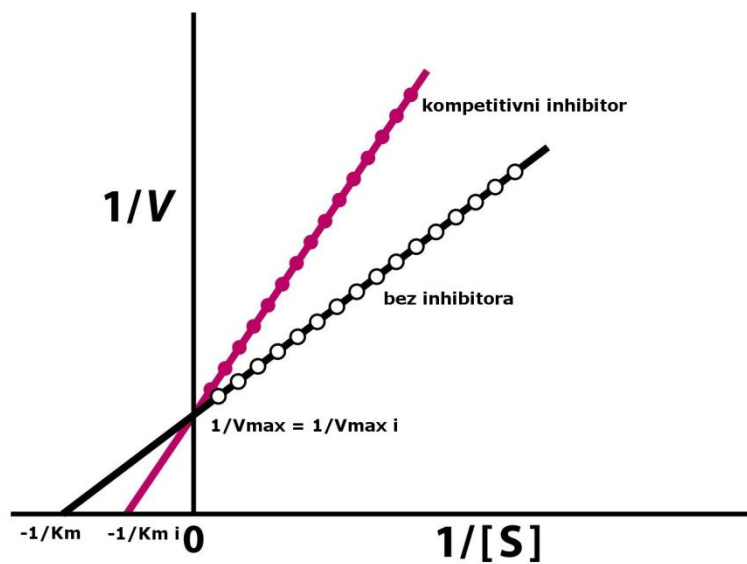
Prividni  $K_M$  iznosi:

$$K'_M = K_M^{app} = \alpha K_M = \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) * K_M \quad (8)$$

gdje je  $K_I$  konstanta nastajanja kompleksa EI.



Slika 11. Mehanizam i kinetika kompetitivne inhibicije



Slika 12. Lineweaver-Burk prikaz kompetitivne inhibicije

Kod **akompetitivne** inhibicije inhibitor se veže na kompleks enzim-supstrat, a vezno se mjesto za inhibitor formira tek nakon što je došlo do interakcije enzima sa supstratom. Ova se inhibicija ne može nadvladati povećanjem koncentracije supstrata (slika 13). Akompetitivni inhibitor smanjuje  $V_{max}$  i  $K_M$  (slika 14). U ovom slučaju Michaelis-Menten jednačba poprima sljedeći oblik:

$$v_0 = \frac{V_{max} * S}{K_M + \alpha' S} \quad (9)$$

gdje je  $\alpha'$  faktor za koji se smanjuju  $K_M$  i  $V_{max}$  i prikazan je sljedećim izrazom:

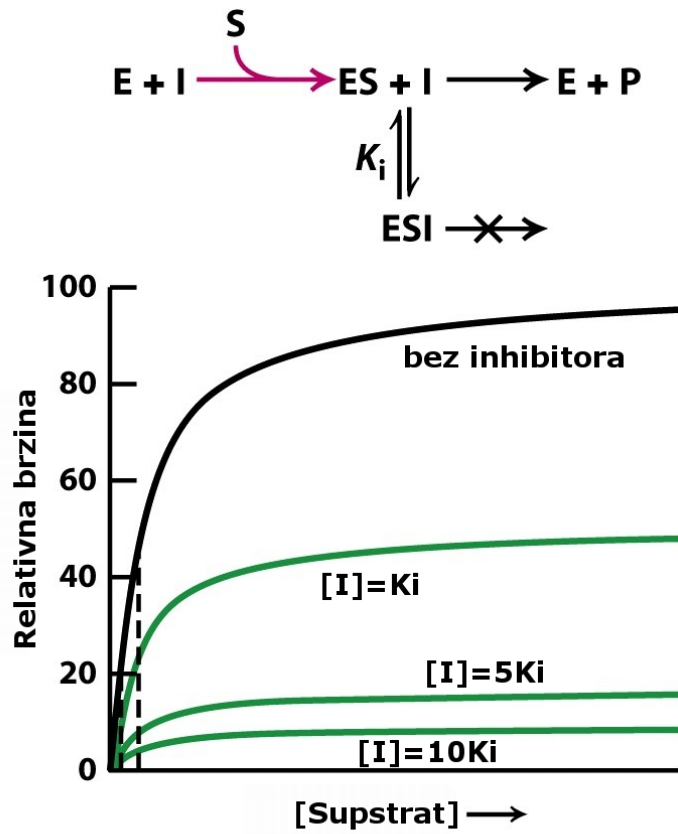
$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I} \quad (10)$$

Prividni  $K_M$  i  $V_{max}$  iznose:

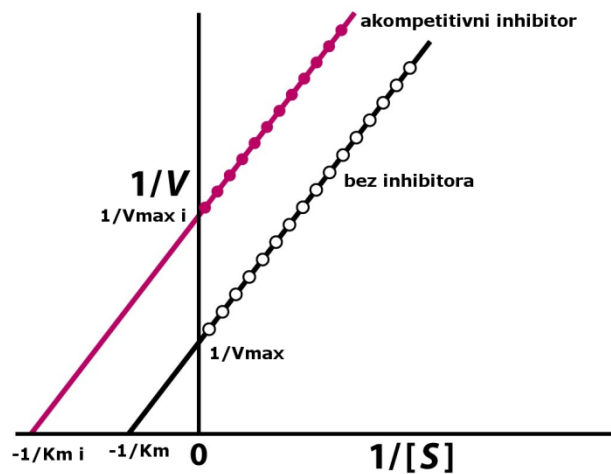
$$K'_M = K_M^{app} = \frac{K_M}{\alpha'} = \frac{K_M}{1 + \frac{[I]}{K'_I}} \quad (11)$$

$$V'_{max} = V_{max}^{app} = \frac{V_{max}}{\alpha'} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K'_I}} \quad (12)$$

gdje je  $K'_I$  je konstanta nastajanja kompleksa ESI.



Slika 13. Mehanizam i kinetika akompetitivne inhibicije



Slika 14. Lineweaver-Burk prikaz akompetitivne inhibicije

Kod **nekompetitivne** inhibicije, inhibitor i supstrat se istodobno vežu na dva različita mjesta na enzimu. Nekompetitivni inhibitor djeluje tako da smanjuje obrtni broj enzima, ali ne smanjuje broj molekula enzima koje mogu vezati supstrat. Ova se vrsta inhibicije ne može nadvladati povećanjem koncentracije supstrata (slika 15). Nekompetitivni inhibitor ne utječe na  $K_M$ , ali smanjuje  $V_{max}$  (slika 16). U ovom slučaju Michaelis-Menten jednadžba poprima sljedeći oblik :

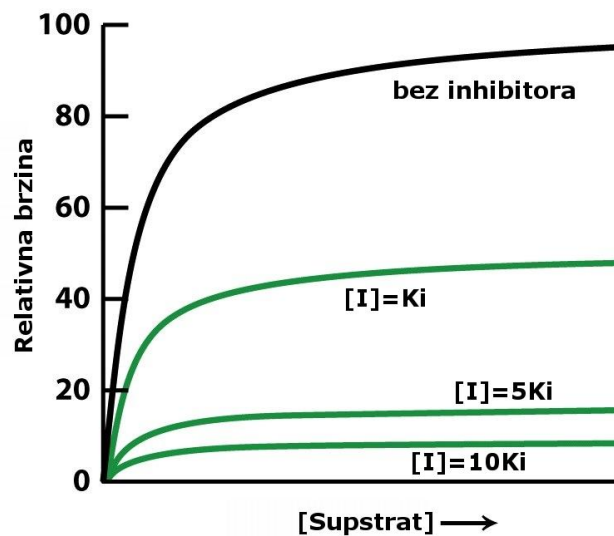
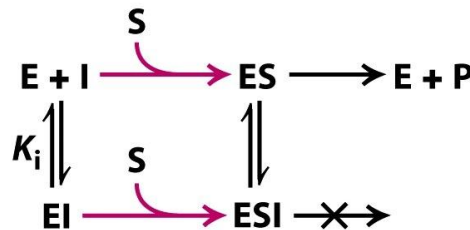
$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot S}{\alpha K_M + \alpha S} \quad (13)$$

gdje je  $\alpha$  faktor za koji se smanjuje  $V_{max}$  i prikazan je sljedećim izrazom:

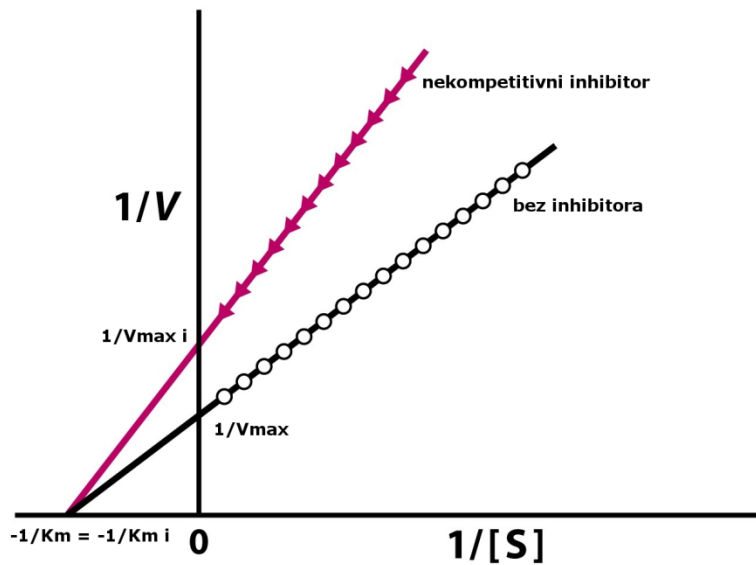
$$\alpha = \alpha' = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad (14)$$

Prividni  $V_{max}$  iznosi:

$$V'_{max} = V_{max}^{app} = \frac{V_{max}}{\alpha} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \quad (15)$$



**Slika 15.** Mehanizam i kinetika nekompetitivne inhibicije



**Slika 16.** Lineweaver-Burk prikaz nekompetitivne inhibicije

Kod **miješane** inhibicije inhibitor se može vezati i na enzim i na kompleks enzim-supstrat u takozvano drugo aktivno mjesto. Nastaju kompleksi enzim-inhibitor (EI) ili enzim-supstrat-inhibitor (ESI).  $K_I$  je konstanta nastajanja kompleksa EI, a  $K'_I$  je konstanta nastajanja kompleksa ESI (slika 17). Inhibitor otežava vezanje supstrata pa se povećava  $K_M$ , a  $V_{max}$  se smanjuje. U ovom slučaju Michaelis-Menten jednadžba poprima sljedeći oblik:

$$v_0 = \frac{V_{max} \cdot S}{\alpha K_M + \alpha' S} \quad (16)$$

faktori  $\alpha$  i  $\alpha'$  prikazani su sljedećim izrazima:

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad (17)$$

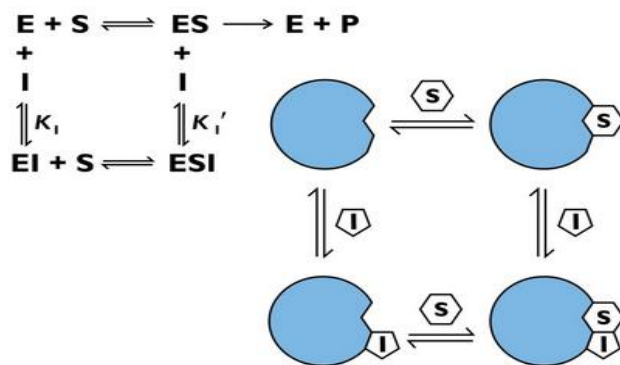
$$\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I} \quad (18)$$

Prividni  $V_{max}$  i  $K_M$  iznose:

$$V'_{max} = V_{max}^{app} = \frac{V_{max}}{\alpha'} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \quad (19)$$

$$K'_M = K_M^{app} = \frac{\alpha K_M}{\alpha'} = \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) K_M}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \quad (20)$$

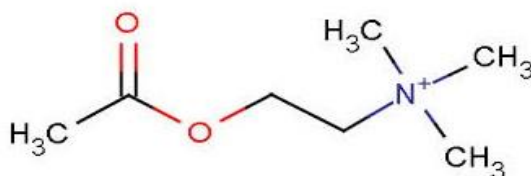
$V_{max}$  se smanjuje za faktor  $\alpha'$  dok se  $K_M$  mijenja ovisno o omjeru  $\alpha/\alpha'$ .



**Slika 17.** Mehanizam miješane inhibicije

### 1.3. Acetilolin i acetilkolinesteraza

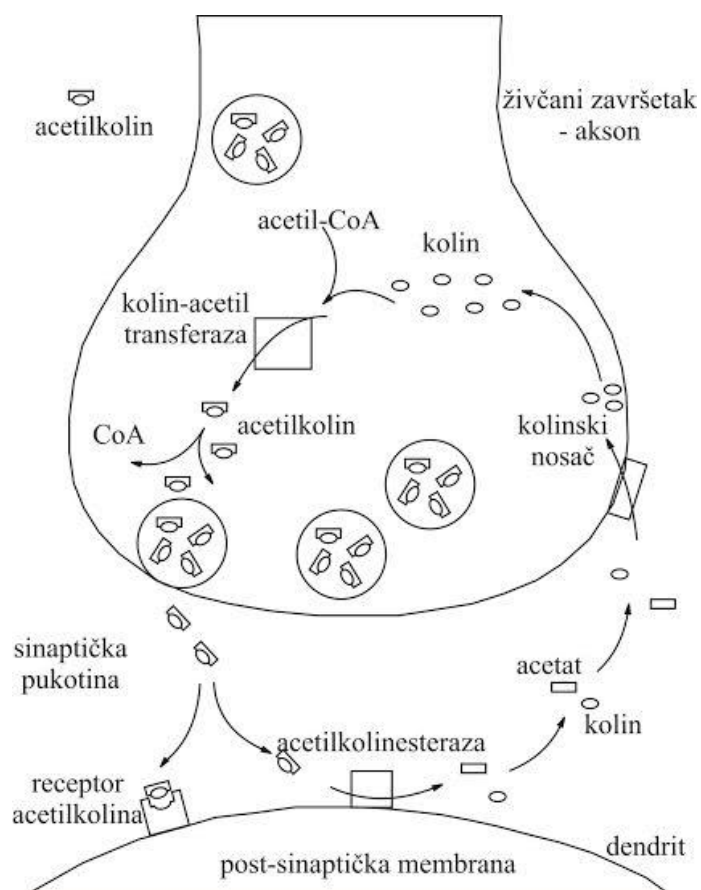
**Acetilolin (ACh)** je neuroprijenosnik neuromišićne sinapse i preganglijskih sinaptičkih te preganglijskih i postganglijskih parasinaptičkih aksona. Sintetizira se iz kolina i acetil-koenzima A uz djelovanje enzima kolin-acetil transferaze.



**Slika 18.** Acetilolin

Dolazak živčanog impulsa uzrokuje ispuštanje acetilkolina iz sinaptičkog mjehurića predo sinaptičke membrane u sinaptičku pukotinu gdje se zatim veže na kolinergične receptore (nikotinski i muskarinski receptori) koji su vezani na postsinaptičku membranu kolinergične sinapse ili na mišićne stanice. Vežanje acetilkolina dovodi do niza procesa koji uzrokuju depolarizaciju membrane i prijenos živčanog impulsa. Brzom razgradnjom acetilkolina u sinaptičkoj pukotini djelovanjem acetilkolinesteraze ponovno se uspostavlja polarizacija postsinaptičke membrane pa prijenos impulsa prestaje (slika 19).<sup>5</sup>





**Slika 19.** Shematski prikaz kolinergične sinapse i kružnog ciklusa acetilkolina<sup>6</sup>

**Acetilkinesteraza (AChE)** je enzim iz klase hidrolaza, podklase serinskih esteraza i skupine hidrolaza karboksilnih kiselina. Fiziološka uloga AChE je hidroliza neuroprijenosnika acetilkolina, čime se omogućava normalan prijenos impulsa u živčanim i živčano-mišićnim sinapsama. Ako je hidroliza acetilkolina inhibirana, dolazi do njegova nakupljanja na postsinaptičkoj membrani čime je spriječen prolaz sljedećeg živčanog impulsa. Osim u sinapsama, AChE se nalazi i u krvi gdje je vezana na eritrocite, ali njezina uloga na eritrocitima za sada nije poznata. Prema brzini hidrolize acetilkolina, AChE je jedan od najučinkovitijih enzima u prirodi. Za ljudsku AChE konstanta brzine hidrolize acetilkolina,  $k_{cat}$ , iznosi približno  $400\ 000\ \text{min}^{-1}$  što znači da je ta hidroliza ograničena samo brzinom difuzije.<sup>6</sup>

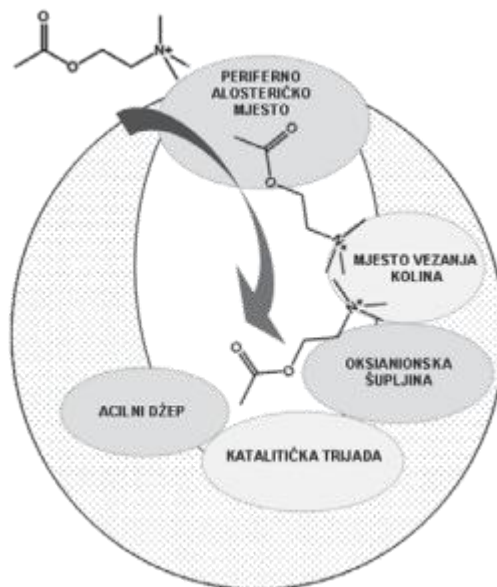
## Struktura i aktivno mjesto AChE

AChE je polimorfni enzim, vezan na membrane stanica preko kolagenske uzvojice. Sastavljen je od globularnih katalitičkih podjedinica, svake mase 70-80 kDa. Te se podjedinice grupiraju u oligomerne strukture koje se dijele u 2 skupine: globularne strukture (sastavljene od monomera, dimera ili tetramera) i asimetrične strukture (katalitičke, kolagenske i nekolagenske podjedinice). Određivanje kristalne strukture AChE 1991. godine, izolirane iz raže *Torpedo californica*, omogućilo je novi pogled na ovaj enzim. Kristalna struktura ljudske AChE određena je 2000. godine i pokazalo se da je homologna strukturi AChE iz raže. Osnovnu strukturu AChE čini 12  $\beta$ -nabranih ploča okruženih s 14  $\alpha$ -uzvojnica zbog čega je uvrštena u skupinu hidrolaza  $\alpha/\beta$ -strukture (slika 20). Kinetičkim ispitivanjima je otkriveno da je AChE alosterički enzim. Na alosterička se mjesta vežu reverzibilni inhibitori i organofosforni spojevi.<sup>7</sup>



**Slika 20.** Struktura acetilkolinesteraze

Aktivno mjesto AChE ima oblik ždrijela dubokog 20Å i širokog 5Å. Kristalografijom i specifičnošću vezanja liganda identificirano je 5 strukturnih domena aktivnog mjesta: estersko mjesto koje sadrži katalitičku trijadu, mjesto vezanja kolina, oksianionska šupljina, acilni džep i periferno alosteričko mjesto. Razriješena struktura enzima otkrila je da se katalitička trijada, slična onima u drugim serinskim hidrolazama i proteazama, sastoji od sljedećih aminokiselina: Ser, His i Glu. Na slici 21 prikazan je položaj strukturnih domena u aktivnom mjestu enzima, a u tablici 2 opisana je uloga pojedine domene.<sup>8</sup>



**Slika 21.** Prikaz aktivnog mjesta AChE s naznačenim domenama

**Tablica 2.** Uloga strukturnih domena aktivnog mjesta AChE

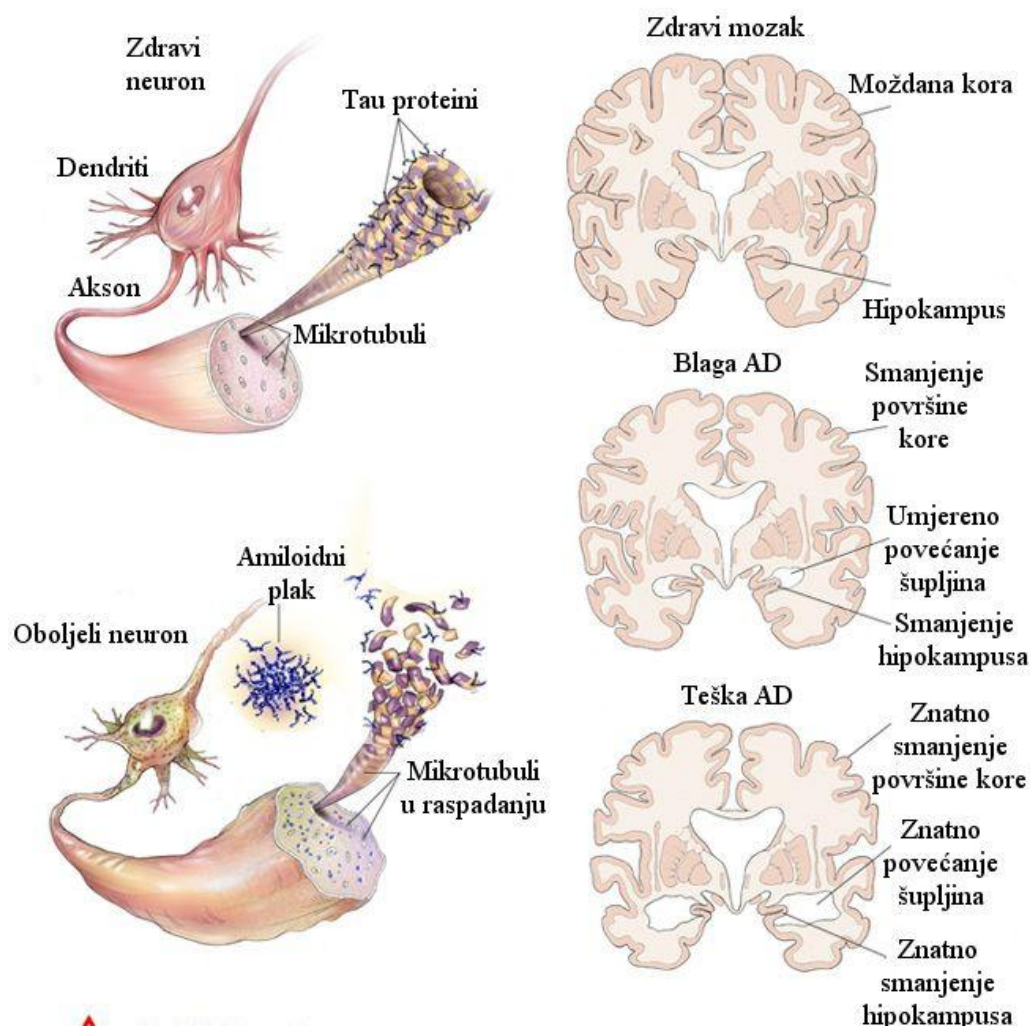
<b>DOMENE AKTIVNOG MJESTA AChE</b>	<b>ULOGA DOMENE</b>	<b>AMINOKISELINSKI OSTATCI</b>
<b>Estersko mjesto</b>	Sadrži katalitičku trijadu čija je uloga hidroliza supstrata.	Ser200 His440 Glu327
<b>Oksianionska šupljina</b>	Stabilizacija tetraedarskog međuprodukta ACh koji nastaje tijekom hidrolize (Gly i Ala su donori vodikovih veza)	Gly118 Gly119 Ala201
<b>Acilni džep</b>	Važan za smještanje acilnog dijela supstrata čime se određuje orijentacija supstrata prema katalitičkom serinu i ostatku enzima. Prisutni aminokiselinski ostatci određuju dimenzije acilnog džepa i time veličinu supstrata koji se mogu smjestiti u ždrijelo aktivnog mjesta kolinesteraza.	Phe288 Phe290
<b>Mjesto vezanja kolina</b>	Važno za stabilizaciju kvartarnog amonijeva liganda, pozitivno nabijena amonijeva grupa kod ACh može stvarati stabilnu vezu s aromatskim prstenovima. Triptofan ima ulogu u orijentaciji i smještanju nabijenog dijela supstrata što ubrzava hidrolizu kolinskih supstrata.	Trp84 Tyr330 Phe338
<b>Periferno Mjesto</b>	Uloga u selektivnoj inhibiciji kolinesteraza i inhibiciji AChE supstratom. U slučaju visoke koncentracije supstrata dolazi do njegovog vezanja na periferno mjesto AChE te do promjene konformacije enzima što onemogućava vezanje druge molekule supstrata u aktivno mjesto AChE. Time se alosteričkim mehanizmom inhibira katalitička aktivnost.	Tyr72 Tyr124 Trp286

### Mehanizam AChE

Mehanizam hidrolize acetilkolinesterazom odvija se u nekoliko koraka. Prvi korak je prenošenje acilne skupine acetilkolina na serin u aktivnom mjestu enzima, pri čemu se oslobađa kolin. Acilirani se međuprodukt zatim hidrolizira čime se oslobađaju enzim i octena kiselina.

### 1.3.1. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest je degenerativna bolest mozga koju karakterizira oštećenje živčanih stanica. Očituje se progresivnim propadanjem kognitivnih funkcija te karakterističnom pojavom senilnih plakova, depozita  $\beta$ -amiloida i stvaranjem neurofibrilarnih tračaka u kori mozga i subkortikalnoj sivoj tvari. Napredovanjem dovodi do demencije, gubitka pamćenja te promjena u ponašanju bolesnika. Bolest je prvi opisao psihijatar Alois Alzheimer 1906. godine pa je po njemu i dobila naziv. Alzheimerova demencija je najčešći oblik demencije u modernom društvu, pogađa više od 20 milijuna ljudi diljem svijeta. Uzrok bolesti još je uvijek nepoznat no postoji više teorija nastanka. Najčešće se govori o genetskom porijeklu, ali postoje teorije da je u podlozi Alzheimerove demencije moždani deficit acetilkolina i poremećaj acetilkolinskog metabolizma.<sup>9</sup> Rezultati istraživanja upućuju na poremećaj u kolinergičkoj transmisiji. Enzimi potrebni za sintezu i razgradnju acetilkolina sniženi su za 30 % u bolesnika s Alzheimerovom bolešću u odnosu na zdrave osobe. Povišenje kolinergičke neurotransmisije može se postići na više načina. Jedan od načina je povećanje sinteze acetilkolina inhibicijom kolinesteraza (AChE i BuChE). Prvi lijek koji je odobren specifično za liječenje kognitivnih simptoma u Alzheimerovoj demenciji bio je tetrahydroaminoakridin. Riječ je o nekompetitivnom reverzibilnom inhibitoru kolinesteraza. Još neki od poznatih inhibitora kolinesteraza koji se primjenjuju za liječenje Alzheimerove bolesti su donepezil, rivastigmin, galantamin i takrin.<sup>10</sup>



**Slika 22.** Razlika mozga zdrave osobe i osobe oboljele od Alzheimerove bolesti<sup>6</sup>

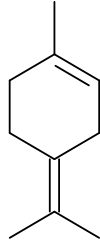
## 1.4. $\alpha$ -Terpinolen

$\alpha$ -Terpinolen je spoj iz grupe terpena. Terpeni su hlapljivi spojevi, najčešće ugodnog mirisa, ubrajaju se u jednostavne lipide i uglavnom su biljnog porijekla. Strukturno su najraznolikija skupina spojeva u prirodi, a osnovu strukture ovih spojeva čini izoprenska jedinica ( $C_5$ -jedinica). Sintetiziraju se mevalonskim biosintetskim putem čiji je središnji međuprodukt mevalonska kiselina. Prekursor mevalonskog biosintetskog puta je acetil-CoA (mevalonska kiselina nastaje iz 3 molekule acetil-CoA). Sam izopren nije uključen u biosintezu terpena, nego aktivna izoprenska jedinica – izopentenil-pirofosfat (IPP). Uobičajena je podjela terpena prema broju izoprenskih jedinica (tablica 3).

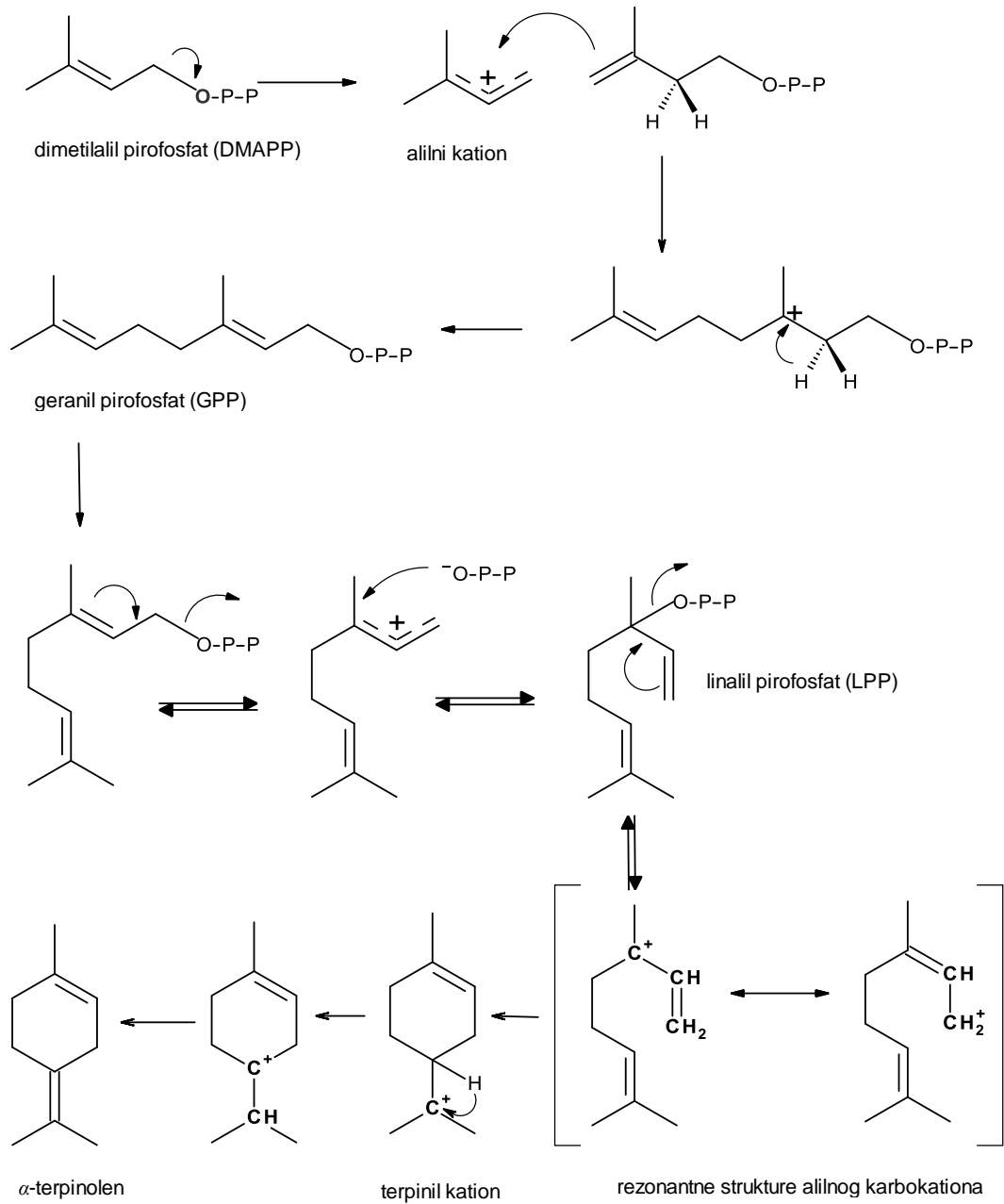
**Tablica 3.** Klasifikacija terpena

	broj C atoma	broj izoprenskih jedinica
<b>SEMITERPENI</b>	C5	1
<b>MONOTERPENI</b>	C10	2
<b>SESKVITERPENI</b>	C15	3
<b>DITERPENI</b>	C20	4
<b>TRITERPENI</b>	C30	6
<b>TETRATERPENI</b>	C40	8
<b>POLITERPENI</b>	$(C_5)_n$	N

$\alpha$ -Terpinolen je monoterpen koji se prvenstveno nalazi u eteričnom ulju lista kurkume, a još neke biljke koje sadrže  $\alpha$ -terpinolen su komorač, lavanda, limun, neven, menta, čajevac i valerijana. Posjeduje antibakterijsko (usporava rast bakterija) i antitumorsko (inhibira produkciju alfatoksina) djelovanje. Pokazuje i antioksidacijsko djelovanje te ima sedativni učinak ako se udiše.<sup>11</sup> Na slici 23 prikazana je struktura, a na slici 24 sinteza  $\alpha$ -terpinolena.



Slika 23.  $\alpha$ -terpinolen

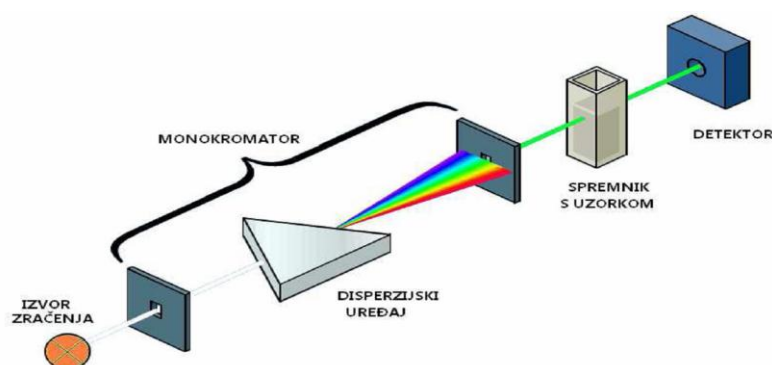


Slika 24. Sinteza  $\alpha$ -terpinolena<sup>12</sup>



## 1.5. Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je analitička metoda kojom se mjeri apsorbancija emitiranog elektromagnetskog zračenja do koje dolazi kada se određeni uzorak podvrgne samom zračenju. Uređaj za mjerenje apsorbancije naziva se spektrofotometar. Shematski prikaz spektrofotometra prikazan je na slici 25.



Slika 25. Shematski prikaz spektrofotometra

Najvažniji pojmovi u spektrofotometriji jesu transmitacija i apsorbancija. **Transmitacija** ( $T$ ) otopine definira se kao dio upadnog zračenja koji je prošao kroz otopinu:

$$T = P / P_0 \quad (21)$$

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

**Apsorbancija** ( $A$ ) otopine definira se kao logaritam odnosa zračenja koji je prošao kroz otopinu ( $P_0$ ) i upadnog zračenja ( $P$ ):

$$A = \log (P_0 / P) \quad (22)$$

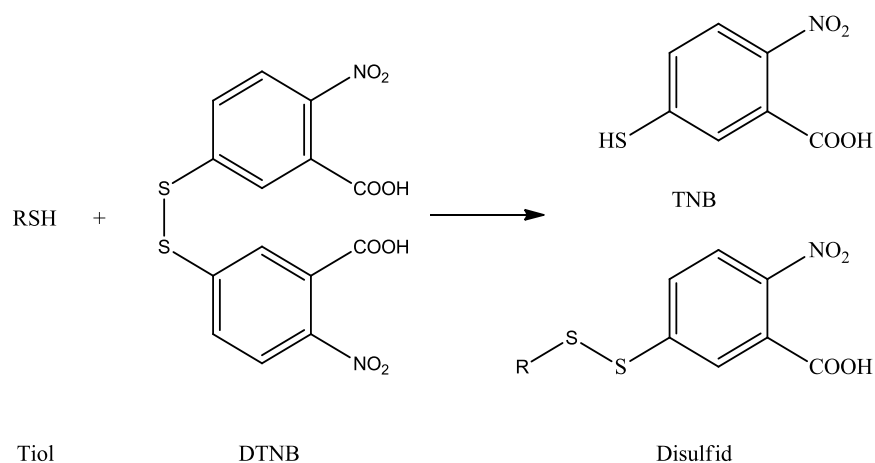
Funkcijski odnos između kvantiteta apsorbancije i koncentracije vrste koja apsorbira elektromagnetsko zračenje poznat je kao Beerov zakon:

$$A = \log (P_0 / P) = abc \quad (23)$$

gdje je  $a$  apsorptivnost (apsorpcijski koeficijent),  $b$  duljina puta zračenja kroz uzorak, a  $c$  koncentracija apsorbirajuće vrste.<sup>13</sup>

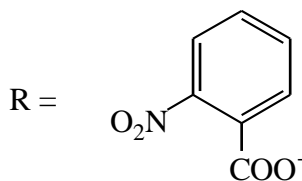
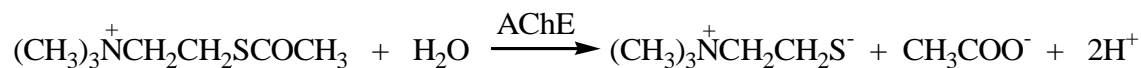
### 1.5.1. Ellmanova metoda

**Ellmanova metoda** je jednostavna spektrofotometrijska metoda koja se koristi za mjerenje aktivnosti enzima AChE. Metoda se temelji na reakciji Ellmanovog reagensa, DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina) s tiolnim skupinama supstrata koje nastaju djelovanjem AChE. Reakcijom nastaje 2-nitro-5-merkaptobenzojeva kiselina (TNB), koja dalje u vodi ionizira u  $\text{TNB}^-$  anion kod neutralnog ili alkalnog pH. Oslobođeni  $\text{TNB}^-$  ion ima intenzivno žutu boju. Apsorpcijski maksimum DTNB-a je pri valnoj duljini od 320 nm, dok se količina oslobođenog  $\text{TNB}^-$  mjeri pri duljini od 412 nm.<sup>14</sup>



**Slika 26.** Ellmanova reakcija za određivanje tiola

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



## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

Kao izvor enzima korištena je acetilkolinesteraza (AChE) iz elektrofora električne jegulje (Tip V-S), kao supstrat enzima korišten je acetilolkolin jodid (ATChI), a kao inhibitor enzima korišten je  $\alpha$ -terpinolen. Za određivanje kinetičkih parametara i za ispitivanje sposobnosti inhibicije AChE korištena je modificirana spektrofotometrijska metoda po Ellmanu koristeći DTNB kao tiolni reagens.

### 2.1. Priprema kemikalija

Za potrebe mjerenja pripremljene su sljedeće otopine :

- enzim AChE otopljen u puferu pH=8, koncentracije 0,03 U/mL
- otopine supstrata (ATChI) koncentracija u sustavu: 0,1 mM; 0,2 mM; 0,3 mM; 0,4 mM i 0,5 mM
- DTNB otopljen u puferu pH=7 + 0,12 mM NaHCO<sub>3</sub>
- otopine uzorka (inhibitora)  $\alpha$ -terpinolena u etanolu, koncentracija u sustavu: 0,0227 mg mL<sup>-1</sup>; 0,0045 mg mL<sup>-1</sup>; 0,0023 mg mL<sup>-1</sup> i 0,0011 mg mL<sup>-1</sup>

### 2.1.1. Određivanje kinetičkih parametara i sposobnosti inhibicije AChE

Tablica 4. Shema otopina

	Kontrola	BL <sub>1</sub>	BL <sub>2</sub>	Uzorak M	Uzorak BL
<b>Pufer</b>	190	200	200	180	190
<b>DTNB</b>	10	10	10	10	10
<b>Uzorak</b>	/	/	/	10	10
<b>AChE</b>	10	/	10	10	/
<b>ATChI</b>	10	10	/	10	10

Uzorci se otpipetiraju u jažice, prema shemi iz tablice 4, s tim da se supstrat, ATChI, dodaje neposredno prije početka mjerenja budući da se njime započinje reakcija. Neenzimska 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.

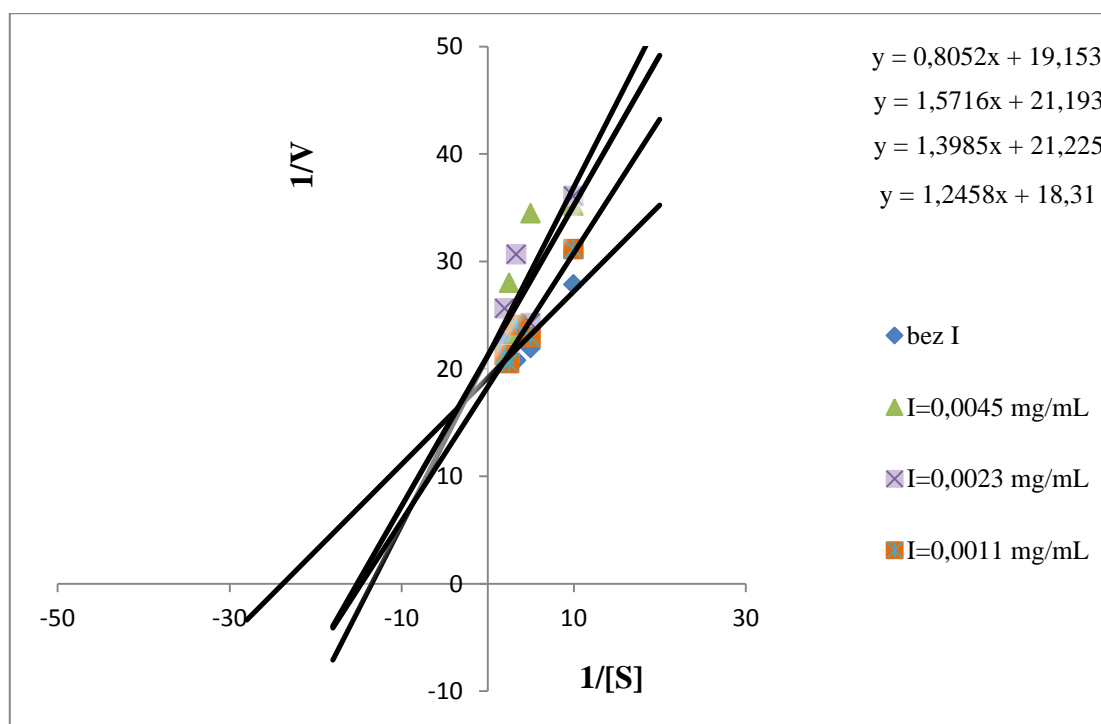
Mjerenje se vršilo pomoću višekanalnog čitača mikrotitarskih pločica "Sunrise" (Tecan, GmbH, Austrija) uz automatsko miješanje i pohranjivanje podataka na računalo.

### 3. REZULTATI

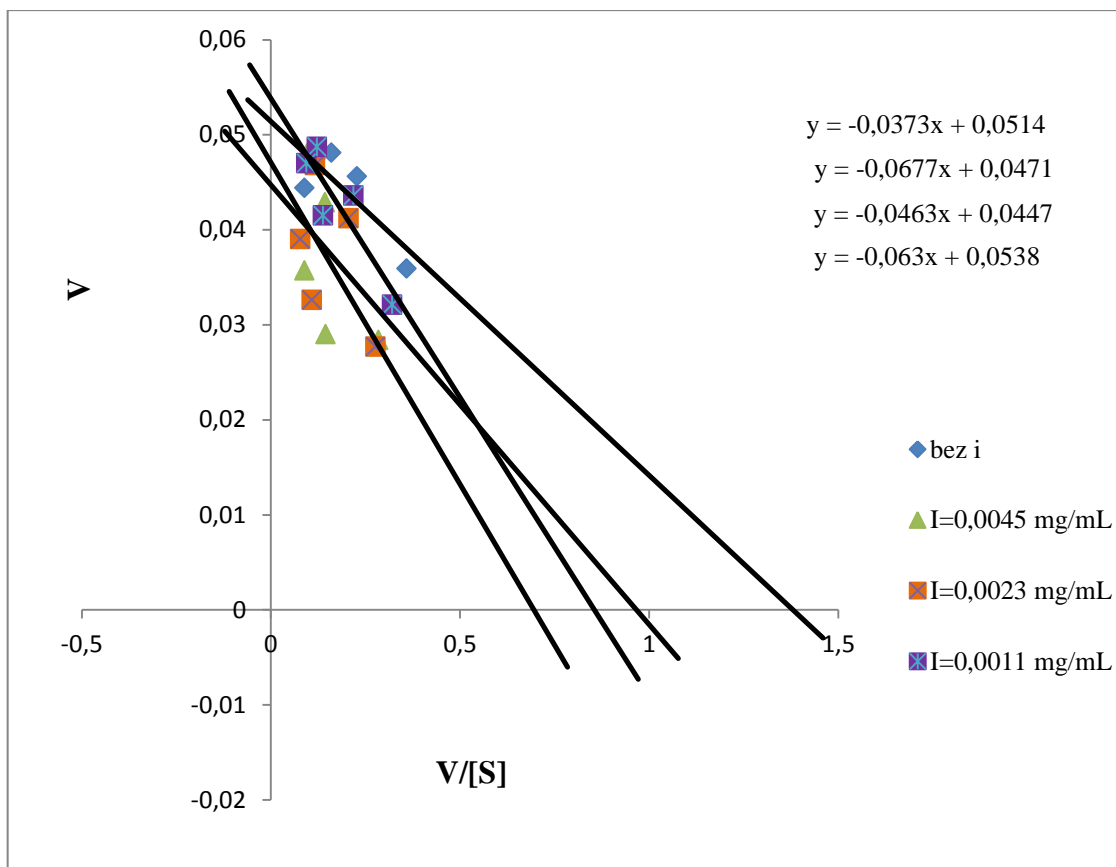
U ovom radu ispitana je sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze uz inhibitor  $\alpha$ -terpinolen. Određeni su i kinetički parametri  $K_M$ ,  $K_M^{app}$ ,  $V_{max}$  i  $V_{max}^{app}$  te vrsta inhibicije.

Kako bi se što preciznije odredili kinetički parametri načinjeni su različiti prikazi iz kojih su na temelju odgovarajućih sjecišta ili iz jednadžbe pravca određene vrijednosti navedenih kinetičkih parametara. Korišteni prikazi su: Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Wolf i Eisenthal – Cornish-Bowden.

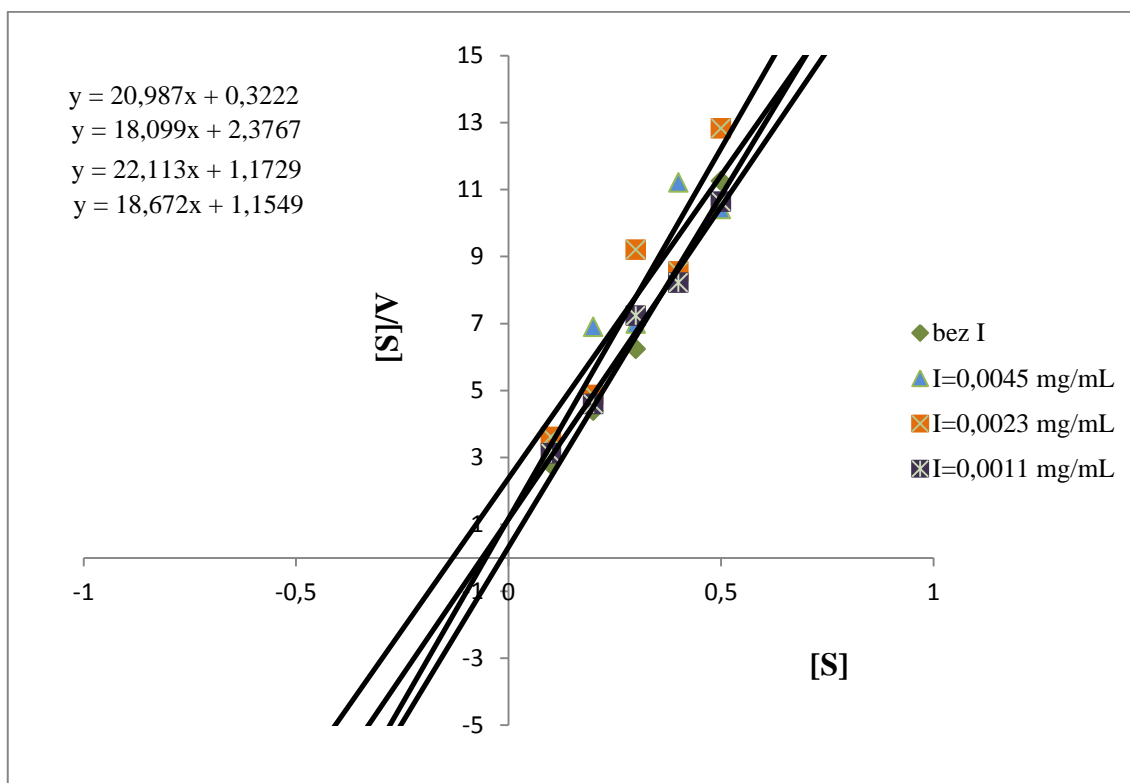
Dobiveni rezultati prikazani su slikama 27.-34., a određeni kinetički parametri sumarno su prikazani u tablici 5.



**Slika 27.** Lineweaver-Burk prikaz ovisnosti brzine hidrolize ATChI o njegovoj koncentraciji

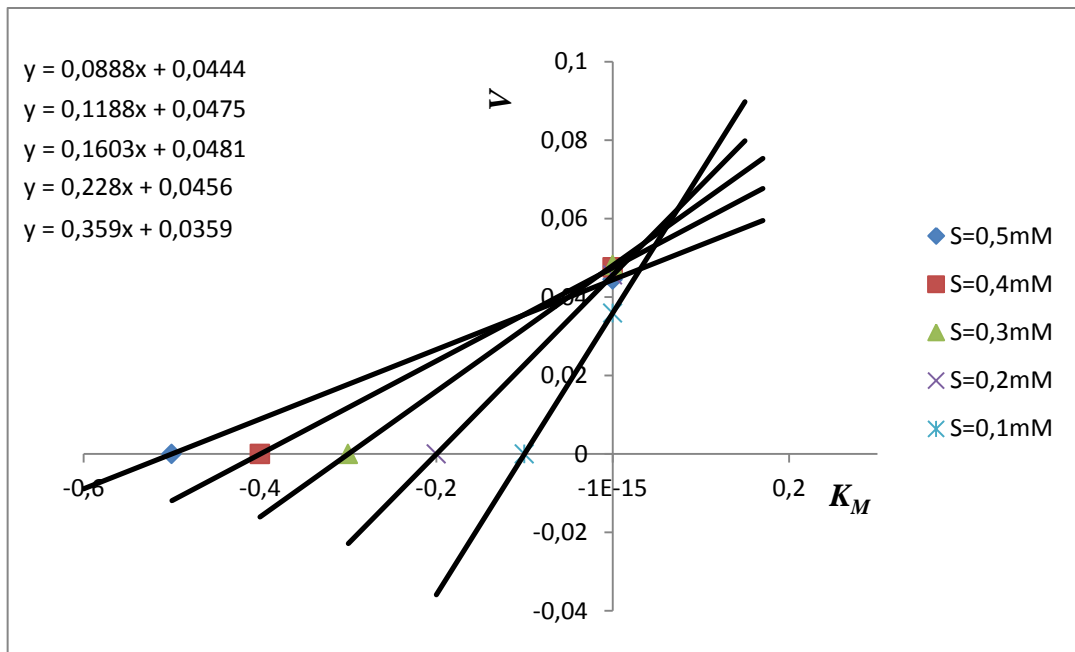


**Slika 28.** Eadie-Hofstee prikaz ovisnosti brzine hidrolize ATChI o njegovoj koncentraciji

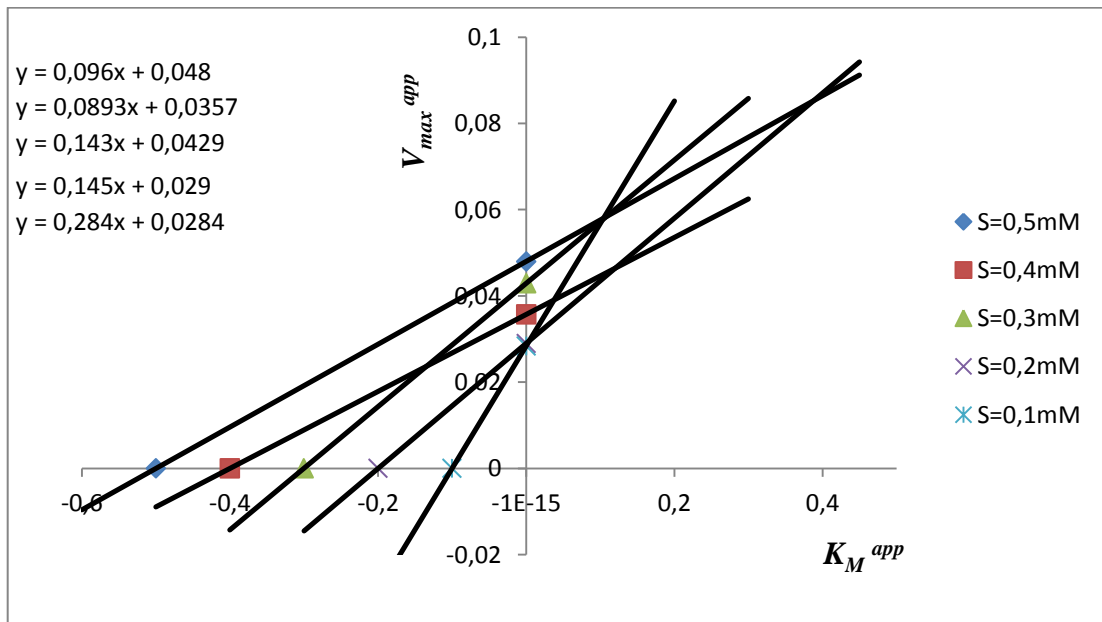


**Slika 29.** Hanes-Wolf prikaz ovisnosti brzine hidrolize ATChI o njegovoj koncentraciji

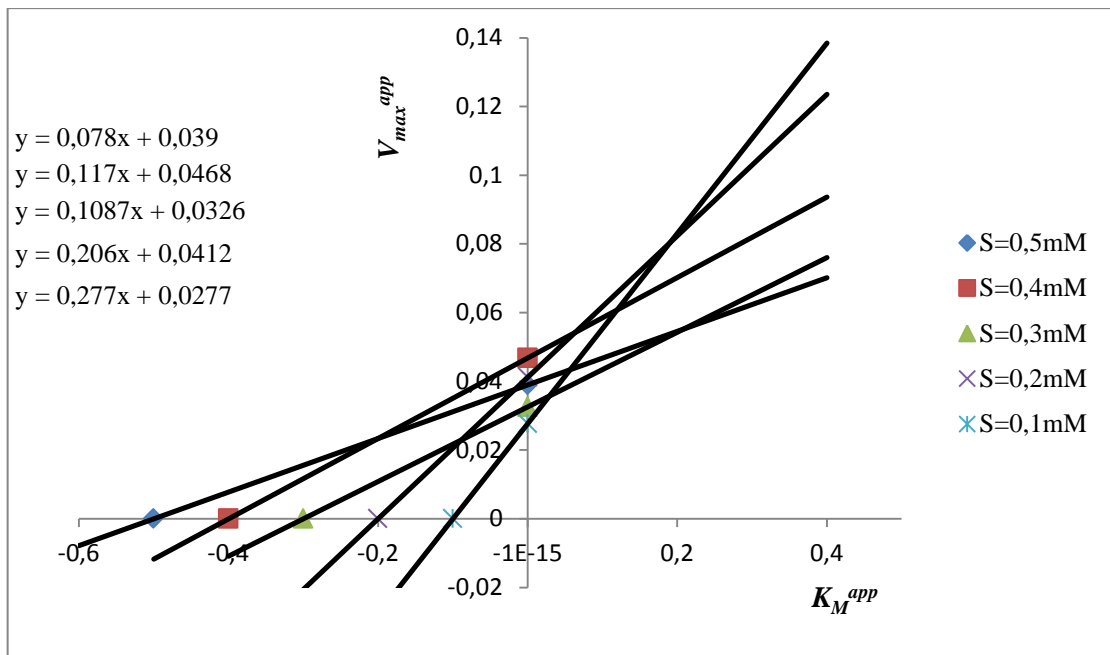
Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz je radi preglednosti konstruiran posebno za sve koncentracije inhibitora kao i bez inhibitora.



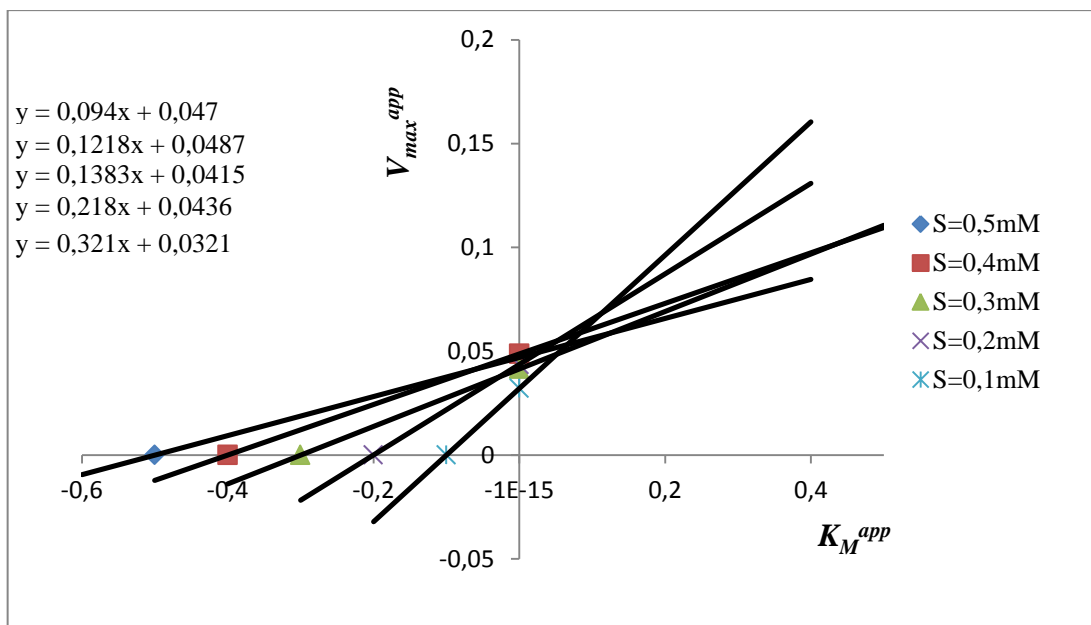
Slika 30. Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz bez inhibitora



Slika 31. Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz za koncentraciju inhibitora  $0,0045 \text{ mg mL}^{-1}$



**Slika 32.** Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz za koncentraciju inhibitora 0,0023 mg mL<sup>-1</sup>



**Slika 33.** Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz za koncentraciju inhibitora 0,011 mg mL<sup>-1</sup>



U tablici 5. prikazane su vrijednosti kinetičkih parametara određenih na temelju prethodnih grafova.

**Tablica 5.** Određeni kinetički parametri

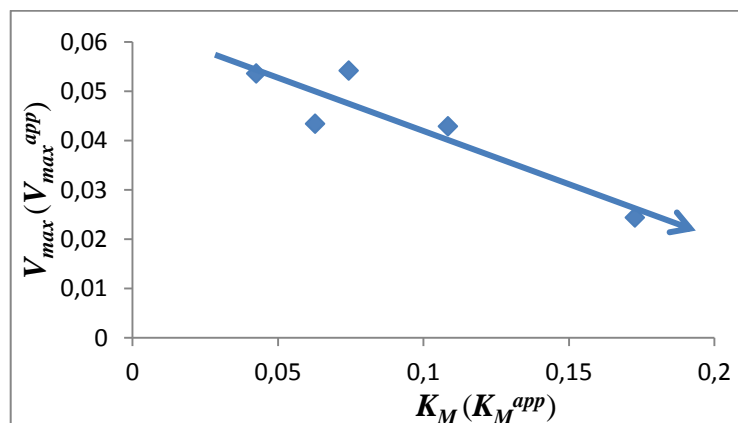
<b>LINEWEAVER-BURK</b>				
	Bez I	[I]=0,0045mg/mL	[I]=0,0023mg/mL	[I]=0,0011mg/mL
$K_M$	0,04	/	/	/
$K_M^{app}$	/	0,074	0,066	0,068
$V_{max}$	0,052	/	/	/
$V_{max}^{app}$	/	0,047	0,047	0,055
<b>EADIE-HOFSTEE</b>				
	Bez I	[I]=0,0045mg/mL	[I]=0,0023mg/mL	[I]=0,0011mg/mL
$K_M$	0,04	/	/	/
$K_M^{app}$	/	0,067	0,046	0,063
$V_{max}$	0,051	/	/	/
$V_{max}^{app}$	/	0,047	0,045	0,054
<b>HANES-WOLF</b>				
	Bez I	[I]=0,0045mg/mL	[I]=0,0023mg/mL	[I]=0,0011mg/mL
$K_M$	0,02	/	/	/
$K_M^{app}$	/	0,070	0,053	0,062
$V_{max}$	0,05	/	/	/
$V_{max}^{app}$	/	0,055	0,045	0,054
<b>EISENTHAL - CORNISH-BOWDEN</b>				
	Bez I	[I]=0,0045mg/mL	[I]=0,0023mg/mL	[I]=0,0011mg/mL
$K_M$	0,04	/	/	/
$K_M^{app}$	/	0,109	0,063	0,074
$V_{max}$	0,054	/	/	/
$V_{max}^{app}$	/	0,043	0,043	0,054

Na temelju prikaza Eisenthal - Cornish-Bowden određene su konstante inhibicije  $K_I$  i  $K'_I$  za pojedinu koncentraciju inhibitora.

**Tablica 6.** Određene  $K_I$  i  $K'_I$  vrijednosti

[I]/mg mL <sup>-1</sup>	$K_I$	$K'_I$
0,0045	0,39	0,4
0,0023	0,19	0,21
0,0011	0,10	/

Iz prikaza Eisenthal – Cornish-Bowden određena je i vrsta inhibicije. Slika 34 priložena je kao dokaz na temelju kojega je zaključeno da se radi o inhibiciji miješanog tipa. Iz prikaza Eisenthal – Cornish-Bowden određeni su kinetički parametri  $K_M$ ,  $K_M^{app}$ ,  $V_{max}$  i  $V_{max}^{app}$  iz kojih je konstruiran graf prikazan na slici 34. Vrijednosti  $K_M$  odnosno  $K_M^{app}$  nanese su na apscisu, a  $V_{max}$  odnosno  $V_{max}^{app}$  na ordinatu kako bi se dobio smjer kretanja točaka sjecišta. Dobiveni smjer ukazuje za inhibiciju miješanog tipa (usporedba sa slikom 10b).



**Slika 34.** Smjer kretanja točaka sjecišta na ECB prikazu

Postotci inhibicije enzima AChE izračunati su prema sljedećoj formuli :

$$\% \text{ inhibicije AChE} = [ (A_K - A_A) / A_K ] \times 100, \quad (24)$$

$A_A$  je apsorbancija test otopine

$A_K$  je apsorbancija kontrolnog uzorka.

Rezultati inhibicijskog učinka različitih koncentracija  $\delta$ -terpinena pri koncentraciji supstrata ATChI 0,5 mM prikazani su u tablici 7.

**Tablica 7.** Postotci inhibicije za različite koncentracije inhibitora

[I]/ mg mL <sup>-1</sup>	% inhibicije
0,0227	91,8
0,0045	61,1
0,0023	44,2
0,0011	10,2

Iz dobivenih podataka može se izračunati i  $IC_{50}$  vrijednost - tj. ona koncentracija inhibitora potrebna da bi se postigla inhibicija enzima od 50 %.

$$IC_{50}=0,0025 \text{ mg mL}^{-1}$$

## 4. RASPRAVA

Cilj ovoga rada bio je ispitati sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) korištenjem  $\alpha$ -terpinolena kao inhibitora. Grafovi Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Wolf i Eisenthal – Cornish-Bowden prikazani su slikama 27-33. Iz ovih prikaza i izračunatih postotaka inhibicije (tablica 7) vidljivo je da  $\alpha$ -terpinolen pokazuje sposobnost inhibicije enzima AChE. Povećanjem koncentracije  $\alpha$ -terpinolena povećava se postotak inhibicije. Maksimalna inhibicija AChE postignuta je pri koncentraciji  $\alpha$ -terpinolena od  $0,0227 \text{ mg mL}^{-1}$  i iznosi 91,8 %.

Iz prikaza Eisenthal – Cornish-Bowden zaključuje se da je riječ o inhibiciji miješanog tipa. Kao dokaz za to priložena je slika 34 s odgovarajućim objašnjenjem. I drugi prikazi također upućuju na miješani tip inhibicije (slike 27-29).

Iz jednadžbi pravaca izračunati su kinetički parametri  $K_M$  i  $V_{max}$  za reakciju hidrolize acetiltiokolin-jodida (ATChI), enzimom AChE te  $K_M^{app}$  i  $V_{max}^{app}$  za istu reakciju u funkciji različitih koncentracija inhibitora. Kako bi se što preciznije odredili, kinetički parametri su se izračunali iz svih korištenih prikaza što je sumarno prikazano u tablici 5.

## 5. ZAKLJUČAK

- Ispitivanjem sposobnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze zaključeno je da  $\alpha$ -terpinolen pokazuje sposobnost inhibicije enzima.
- Povećanjem koncentracije  $\alpha$ -terpinolena povećava se postotak inhibicije, maksimalna inhibicija AChE postignuta je pri koncentraciji  $\alpha$ -terpinolena od  $0,0227 \text{ mg mL}^{-1}$  i iznosi 91,8 %.
- Na temelju prikaza Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Wolf i posebno Eisenthal – Cornish-Bowden vidljivo je da se radi o inhibiciji miješanog tipa.

## 6. LITERATURA

1. URL:<http://www.bionet-skola.com/w/Enzimi> (30.5.2016.)
2. *J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer*, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
3. *R. Eisenthal, A. Cornish-Bowden*, The Direct Linear Plot - A New Graphical Procedure For Estimating Enzyme Kinetic Parameters, *Biochemistry Journal*, **139** (1973) 715-720
4. URL:[https://sh.wikipedia.org/wiki/Inhibicija\\_enzimskih\\_reakcija](https://sh.wikipedia.org/wiki/Inhibicija_enzimskih_reakcija) (30.5.2016.)
5. URL:[http://neuron.mefst.hr/docs/medicina/medicine\\_engl/katedra\\_fiziologija/Zdravstveni\\_studiji/prezentacije/Sredisnji\\_zivcani\\_sustav\\_ZDRAV\\_STUD\\_2013.pdf](http://neuron.mefst.hr/docs/medicina/medicine_engl/katedra_fiziologija/Zdravstveni_studiji/prezentacije/Sredisnji_zivcani_sustav_ZDRAV_STUD_2013.pdf) (13.6.2016.)
6. *F. Burčul*, Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae, Doktorski rad, Zagreb, 2014.
7. *Goran Šinko*, Inhibicija kolinesteraza enantionerima etopropazina, doktorska disertacija, Zagreb, 2007.
8. *A. Bosak, M. Kalinić, Z. Kovarik*, Kolinesteraze: struktura, uloga, inhibicija, Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, 2011.
9. URL:<http://neuron.mefst.hr/docs/katedre/neurologija/medicina/Demencije.pdf> (13.6.2016.)
10. URL:<http://nootriment.com/hr/acetylcholinesterase-inhibitors/> (2.6.2016.)
11. URL:<http://theleafonline.com/c/science/2015/01/terpene-profile-terpinolene/> (10.6.2016.)
12. *P. M. Dewick*, Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, U.K. 2009.
13. *Skoog, West, Holler*, Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
14. *G. L. Ellman, D. K. Courtney, V. Andres, R. M. Featherstone*, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* **7** (1961)