



Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Robert Kerep

# **INHIBICIJA KOLINESTERAZÂ KARBAMATOM ALBUTEROLA**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog zvanja  
magistra kemije

Zagreb, 2018.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Jedinici za biokemiju i organsku analitičku kemiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, pod vodstvom mentorice dr.sc. Anite Bosak, znan. sur. i nastavnice izv. prof. dr. sc. Ines Primožič sa Zavoda za organsku kemiju na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.



Veliko hvala mentorici dr. sc. Aniti Bosak na predloženoj temi, pomoći i podršci, strpljenju, stručnom vodstvu te razumijevanju i usmjeravanju prilikom izrade diplomskog rada.

Nadalje, posebno hvala nastavnici izv. prof. dr. sc. Ines Primožič na uloženom naporu i vremenu te na susretljivosti tijekom pisanja diplomskog rada.

Hvala svim ostalim djelatnicima Jedinice za biokemiju i organsku analitičku kemiju, posebno Tamari Zorbaz, mag. med. biochem. i Antoniu Zandoni, mag. biotech., na svakodnevnoj ljubaznosti i susretljivosti.

I na kraju veliko hvala mojim roditeljima na razumijevanju i podršci tijekom mog studiranja.



# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XI</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED.....</b>	<b>3</b>
2.1. Općenito o kolinesterazama .....	3
2.2. Aktivno mjesto kolinesterazâ .....	6
2.3. Reakcije kolinesterazâ .....	9
2.3.1. Hidroliza supstrata kolinesterazama.....	9
2.3.2. Inhibicija kolinesterazâ .....	11
2.4. Interakcija kolinesterazâ i karbamata .....	13
2.4.1. Karbamati kao lijekovi u tretmanu Alzheimerove bolesti .....	14
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>16</b>
3.1. Enzimski preparati .....	16
3.2. Kemikalije i otopine .....	16
3.3. Mjerenje aktivnosti enzima.....	19
3.4. Mjerenje progresivne inhibicije.....	20
3.5. Obrada rezultata .....	20
3.6. Progresivna inhibicija.....	20
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>23</b>
4.1. Rezultati .....	23
4.1.1. Inhibicija kolinesterazâ racematom karbamata albuterola.....	26
4.1.2. Inhibicija kolinesterazâ enantiomerima karbamata albuterola .....	30
4.2. Rasprava .....	33
4.2.1. Inhibicijski potencijal karbamata albuterola .....	34
4.2.2. Selektivnost karbamilacije ljudskih kolinesterazâ.....	34
4.2.3. Selektivnost karbamilacije kolinesterazâ drugih vrsta.....	35
4.2.4. Stereoselektivnost ljudskih kolinesterazâ .....	39
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>41</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>	<b>42</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>43</b>
<b>§ 8. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>L</b>







Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### INHIBICIJA KOLINESTERAZA KARBAMATOM ALBUTEROLA

Robert Kerep

Određene su konstante brzine inhibicije dviju butirilkolinesteraza (BChE; EC 3.1.1.8) i dviju acetilkolinesteraza (AChE; EC 3.1.1.7) s racemičnim, (*R*)- i (*S*)- *N,N*-dimetilkarbamatom albuterola (4-(2-(*tert*-butilamino)-1-hidroksietil)-2-(hidroksimetil)fenol). Korištene su ljudska (hBChE) i BChE izolirana iz seruma konja (hoBChE), rekombinantna ljudska AChE (hAChE) i AChE izolirana iz električnog organa jegulje (eeAChE). Karbamat albuterola je progresivno inhibirao sve ispitivane kolinesteraze s konstantama brzine inhibicije reda veličine  $10^3$ - $10^6$   $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{min}^{-1}$ , pri čemu je najbrže inhibirao hBChE. Ispitivani karbamat se pokazao selektivnim inhibitorom koji hBChE inhibira 8 puta brže od hAChE. Također, karbamat albuterola razlikuje kolinesteraze različitih vrsta, budući da hBChE inhibira 1,7 puta brže od hoBChE, dok hAChE inhibira 34 puta brže od eeAChE. Ljudske BChE i AChE su stereoselektivni enzimi koji imaju 13, odnosno 4 puta veći afinitet prema (*R*)-karbamatu albuterola. Inhibicijski potencijal karbamata albuterola, kao i njegova selektivnost prema hBChE u odnosu na AChE, manja je od do sada ispitivanih karbamata slične strukture.

(49 stranica, 17 slika, 6 tablica, 78 literaturnih navoda, 1 shema, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: acetilkolinesteraza, brzina karbamilacije, butirilkolinesteraza, selektivnost, stereoselektivnost,

Mentor: dr. sc. Anita Bosak, zn. sur.

Nastavnik: izv. prof. dr. sc. Ines Primožič

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Ines Primožič
  2. izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
  3. doc. dr. sc. Marko Močibob
- Zamjena: doc. dr. sc. Ivan Kodrin

Datum diplomskog ispita: 26. veljače 2018.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### INHIBITION OF CHOLINESTERASES BY ALBUTEROL CARBAMATE

Robert Kerep

Inhibition rate constants of two butyrylcholinesterases (BChE, EC 3.1.1.8) and two acetylcholinesterases (AChE; EC 3.1.1.7) with racemic, (*R*)- and (*S*)- albuterol carbamate (4-(2-(tert-butylamino)-1-hydroxyethyl)-2-(hydroxymethyl)phenyl dimethylcarbamate) were determined. Human (hBChE) and BChE from the horse serum (hoBChE), recombinant human AChE (hAChE) and AChE from the eel (eeAChE) were used. Albuterol carbamate progressively inhibited all cholinesterases with inhibition rate constants ranged from  $10^3$ - $10^6$   $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{min}^{-1}$ , wherefrom inhibition of hBChE was the fastest. Tested carbamate is a selective BChE inhibitor inhibiting hBChE 8 times faster than hAChE. Also, albuterol carbamate clearly distinguishes cholinesterases of different species, since it inhibits hBChE 1.7 times faster than hoBChE, and hAChE 34 times faster than eeAChE. Human BChE and AChE are stereoselective enzymes having 13 or 4 times higher affinity to (*R*)-carbamate albuterol. The inhibitory potential of albuterol carbamate, as well as its selectivity toward hBChE relative to AChE, is lower than that of other carbamates with the similar structure.

(49 pages, 17 figures, 6 tables, 78 references, 1 scheme, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, carbamylation rate selectivity, stereoselectivity,

Mentor: Dr. Anita Bosak, Research Associate  
Supervisor: Dr. Ines Primožič, Associate Professor

Reviewers:

1. Dr. Ines Primožič, Associate Professor
  2. Dr. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor
  3. Dr. Marko Močibob, Assistant professor
- Substitute: Dr. Ivan Kodrin, Assistant professor

Date of exam: 26th February, 2018



## § 1. UVOD

Acetilkinesteraza (AChE) i butirilkolineraza (BChE) su enzimi koji se zbog svoje uloge u organizmu intenzivno istražuju unutar područja biomedicine i toksikologije. Fiziološka uloga AChE je izuzetno brza hidroliza prijenosnika živčanih impulsa, acetilkolina, u kolinergičnim sinapsama. Njenom inhibicijom dolazi do nakupljanja acetilkolina u sinapsama čime se zaustavlja daljnji prijenos živčanih impulsa. Za razliku od AChE, BChE je enzim čiji fiziološki supstrat za sada nije poznat pa tako ni njegova fiziološka funkcija nije u potpunosti razjašnjena. Poznato je da sudjeluje u regulaciji količine acetilkolina u glatkim mišićima u slučaju kada je AChE inhibirana te u biokonverziji nekolicine lijekova kakav je primjerice bambuterol.<sup>1</sup> AChE i BChE su srodni enzimi koji se podudaraju u oko 55 % aminokiselinskog slijeda.<sup>2</sup> Oba enzima se razlikuju u specifičnosti prema supstratima i osjetljivošću prema velikom broju inhibitora što je posljedica razlike u aminokiselinskim ograncima aktivnog mjesta enzima. Aktivno mjesto obiju kolinesterazâ ima oblik ždrijela i sastoji se od katalitičke trijade s oksianionskom šupljinom, kolinskog mjesta, acilnog džepa i perifernog mjesta. Katalitička trijada koju čine serin, glutamat i histidin nalazi se dnu 20 Å dubokog ždrijela unutar kojeg su smješteni kolinsko mjesto i acilni džep. Zbog asimetričnosti ždrijela i samog aktivnog mjesta obje kolinesteraze su stereoselektivni enzimi s različitim potencijalom hidrolize nekih kiralnih supstrata te inhibicije nekim kiralnim inhibitorima.<sup>3-5</sup> Alzheimerovu bolest (AD) karakterizira smanjenje koncentracije acetilkolina u neuromišićnim sinapsama, a inhibitori AChE predstavljaju najučinkovitiji pristup tretmanu AD i koriste se u ranoj i srednjoj fazi AD. Novija istraživanja o utjecaju BChE na tijek i napredovanje AD ukazala su na BChE kao novu metu u liječenju AD. Do sada je sintetizirana i ispitana nekolicina selektivnih inhibitora BChE među kojima su se kao najpotentnijima pokazali derivati karbamata kimserina.<sup>6</sup> Karbamati su esteri karbaminske kiseline koji s kolinesterazama reagiraju po mehanizmu analognom reakciji kolinesterazâ s esterima karboksilne kiseline koji su njeni supstrati.

Cilj diplomskog rada je odrediti selektivnost karbamata albuterola prema ljudskim AChE i BChE, te konjskoj BChE i AChE izoliranoj iz električne jegulje i budući da je navedeni spoj kiralni, i stereoselektivnost ispitivanih enzima prema pojedinim enantiomerima. Karbamati albuterola je nosintetizirani spoj koji je strukturno sličan

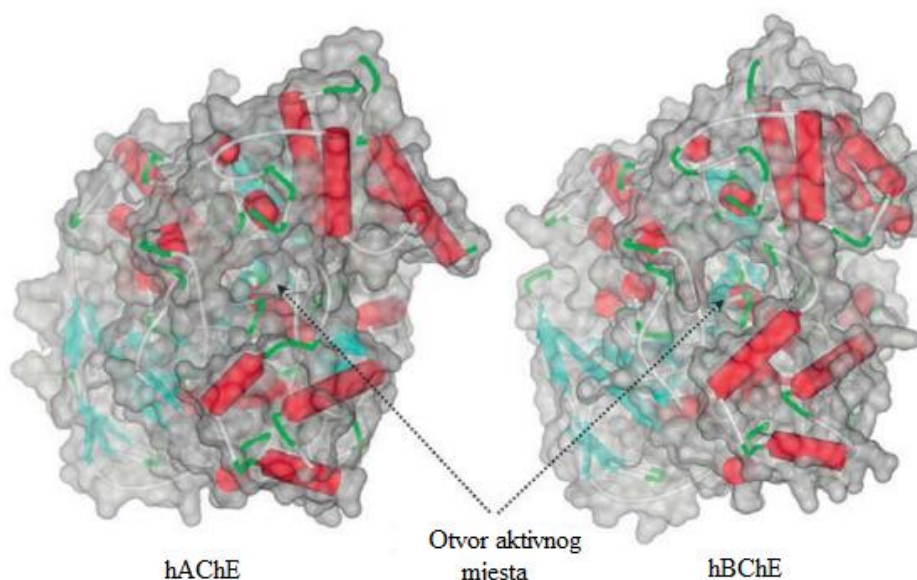
bambuterolu, selektivnom inhibitoru BChE. Na temelju razlike u dobivenim sveukupnim konstantama inhibicije diskutirana je selektivnost inhibitora i stereoselektivnost ispitivanih enzima te uloga pojedinih aminokiselina u aktivnom mjestu enzima.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Općenito o kolinesterazama

Od njihovog otkrića početkom 20. stoljeća pa sve do danas, kolinesteraze su postale predmetom istraživanja unutar područja biokemije, biomedicine, fiziologije i toksikologije.<sup>7</sup>

Kolinesteraze, acetilkolinesteraza (AChE; EC 3.1.1.7.) i butirilkolinesteraza (BChE; EC 3.1.1.8.) su prema enzimskoj nomenklaturi iz 1961. godine svrstane u skupinu hidrolaza, podskupinu esteraza i potpodskupinu hidrolaza estera karboksilnih kiselina. Kolinesteraze strukturno pripadaju grupi hidrolaza  $\alpha/\beta$  strukture budući da im osnovne građevne jedinice čine  $\beta$ -naborane ploče okružene s  $\alpha$ -uzvojnica (slika 2.1.).<sup>8</sup> Ovisno o tkivu i vrsti u kojoj se nalaze, te kao produkti različitih gena, enzimi dijele približno 55 % homologije u primarnoj sekvenci i čak 90 % u tercijarnoj strukturi.<sup>2,3</sup> Međutim, iako strukturno homologni i mogu se nalaziti u obliku monomera, dimera i tetramera, enzimi se međusobno razlikuju prema katalitičkoj aktivnosti, odnosno specifičnosti prema supstratima i inhibitorima.<sup>9,10</sup>



Slika 2.1. Kristalna struktura ljudske AChE<sup>11</sup> i ljudske BChE.<sup>12</sup> Crvenom bojom označene su  $\alpha$ -uzvojnice, plavom  $\beta$ -naborane ploče, zelenom petlje, a sivom površina enzima dostupna vodi. Preuzeto iz literaturnog izvora 13.

Fiziološka uloga AChE je hidroliza acetilkolina u kolinergičnoj sinapsi tijekom prijenosa živčanog impulsa u centralnom i perifernom živčanom sustavu i jedan je od najučinkovitijih enzima u prirodi zbog svoje katalitičke aktivnosti koja je blizu vrijednosti brzine difuzije.<sup>14</sup> AChE je od izrazite važnosti za očuvanje homeostaze organizma obzirom da se prijenos živčanih impulsa bitnih za kontrakciju mišića, suženje zjenica, proširenje krvnih žila, održavanje stanja svijesti i dr. odvija posredstvom acetilkolina.<sup>15,16</sup> Sinteza AChE odvija se u koštanoj srži, mišićima i mozgu, a osim u mozgu, mišićima i koštanoj srži AChE je prisutna i u krvi gdje je vezana na membrane eritrocita. Uloga AChE u eritrocitima još uvijek nije razjašnjena.<sup>15,17</sup> Međutim, pokazalo se kako je aktivnost eritrocitne AChE pouzdan pokazatelj aktivnosti sinaptičke AChE te se na toj činjenici temelji dijagnosticiranje otrovanja AChE i dijagnosticiranje nekih neurodegenerativnih bolesti u čiju patologiju je uključena i promjena aktivnosti AChE.

Za razliku od AChE koja je visokospecifična za hidrolizu acetilkolina, BChE može hidrolizirati cijeli spektar kolinskih i tiokolinskih estera (butiril(tio)kolin, propionil(tio)kolin, benzoil(tio)kolin, i dr.) uključujući i voluminozne neutralne estere (heroin, kokain, prokain i dr.) pa čak i neke negativno nabijene estere (aspirin) i to brzinama bliskima brzini hidrolize butirilkolina.<sup>18,19,20</sup> Upravo stoga, BChE djeluje kao čistač organizma od prirodnih (fizostigmin, kokain) i sintetskih anti-kolinesteraznih spojeva (organofosforovi i karbamatni pesticidi, te živčani bojni otrovi koji su po strukturi organofosfati) prije interakcije s AChE, dok u odsutnosti AChE regulira količinu acetilkolina u neuromuskularnim stanicama.<sup>1,18</sup> Nadalje, poznata je uloga BChE u diferencijaciji i rastu živčanog tkiva, metabolizmu lipida i lipoproteina, dok je pojačana ekspresija BChE dokazana kod neurodegenerativnih bolesti kakva je AD.<sup>19,21,22</sup> BChE je i farmakološki važan enzim jer sudjeluje u biokonverziji nekolicine lijekova. Primjerice, BChE hidrolizira bambuterol u terbutalin, bronhodilatator za liječenje bronhijalne astme, i na taj način ga aktivira, dok hidrolizom sukcinildikolina, spoja koji se primjenjuje za anesteziju prilikom kirurških zahvata, dolazi do njegove deaktivacije.<sup>1,21,23</sup> U velikim je koncentracijama prisutna u serumu, jetri, crijevima i gušterači, a znatne količine nalaze se i u mozgu.<sup>18,15,21,24</sup> BChE je, za razliku od AChE, visoko N-glikozilirani protein gdje glikozilacija ima ulogu u smatanju, izlučivanju i stabilnosti BChE. Smatra se da visoki stupanj glikozilacije omogućava dugotrajniju stabilnost BChE u plazmi, tj. cirkulaciji krvi, gdje je njezina aktivnost i najizraženija.<sup>25,26</sup>



Oba su enzima široko rasprostranjena u različitim organizmima, ponajviše u sisavca i riba. Kao i kod čovjeka, najviša koncentracija enzima može se pronaći u centralnom živčanom sustavu te perifernim tkivima. Tako su navedeni enzimi izolirani iz mozga ili mišića dostupnih organizama, primjerice konja (*Equus caballus*) i električne jegulje (*Electrophorus electricus*). Sposobnost hidrolize, odnosno katalitička moć oba enzima karakteristična je za pojedinu vrstu i organ iz kojega je izolirana. Katalitičke konstante koje opisuju katalitičku moć pojedinih kolinesterazâ prikazane su u tablici 2.1.<sup>14,27</sup>

**Tablica 2.1.** Vrijednosti katalitičkih konstanti ( $k_{cat}$ ) za hidrolizu acetilkolina s kolinesterazama iz različitih vrsta.

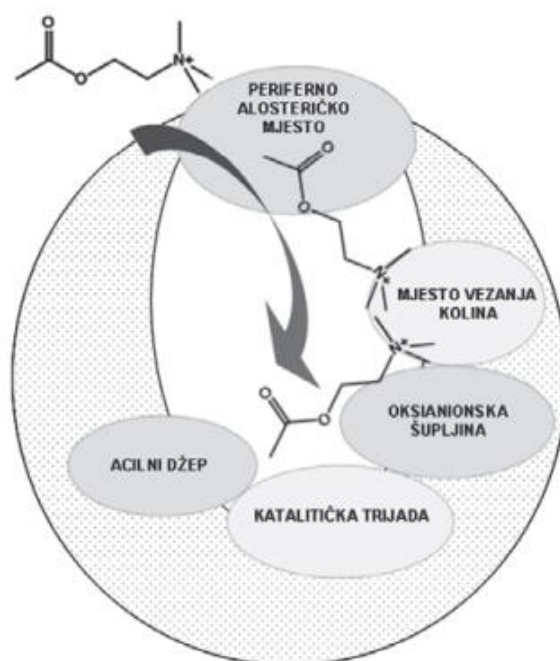
Preuzeto sa stranice <http://bioweb.ensam.inra.fr/ESTHER/general?what=index>

Enzim	$k_{cat} / \text{min}^{-1}$	Uvjeti
ljudska AChE	400000	pH = 8; 27 °C
ljudska BChE	50000	pH = 8; 27 °C
konjska BChE	760000	pH = 8; 37 °C
AChE iz električne jegulje	733333	pH = 7; 28 °C

## 2.2. Aktivno mjesto kolinesterazâ

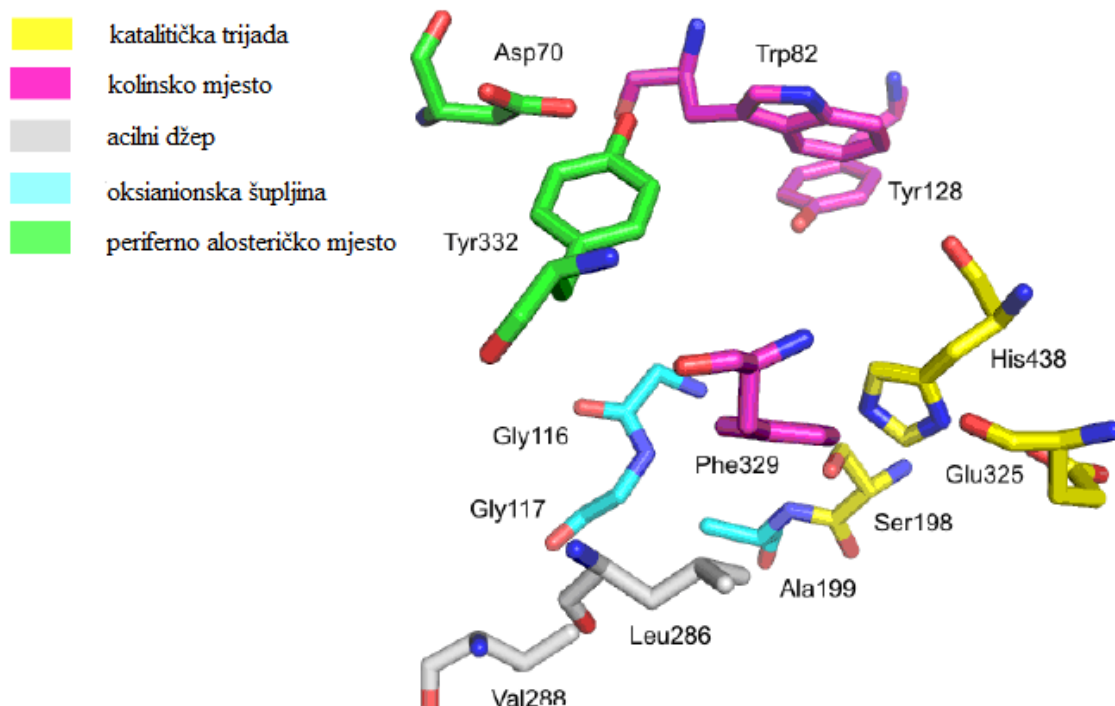
Prva AChE kojoj je bila određena trodimenzionalna struktura bila je AChE iz raže *Torpedo californica* (TcAChE) koja je kristalizirana 1991. godine, a pokazala je izrazitu homologiju s ostalim do tada poznatima serinskim esterazama.<sup>29,30</sup> Kristalna struktura ljudske AChE određena je 2000. godine i ustanovljena je visoka homologija sa strukturom TcAChE.<sup>11,30</sup> Prostor interakcije sa supstratima, ali i s drugim ligandima, kod ljudske AChE određen je s 14 aromatskih aminokiselina raspoređenih kroz aktivno mjesto enzima.<sup>15,31,32</sup> Upravo su neke od tih aminokiselina, osim u definiranju veličine prostora, svojim interakcijama sa supstratom odgovorne za iznimnu katalitičku aktivnost AChE. Kristalna struktura ljudske BChE određena je 2003. godine.<sup>12</sup> Umjesto 14 aromatskih kiselina koje nalazimo kroz aktivno mjesto AChE, kod BChE je njih 6 zamijenjeno alifatskim aminokiselinama što je uzrokovalo povećanje volumena aktivnog mjesta BChE za oko 200 Å u odnosu na aktivno mjesto AChE.<sup>9,32</sup>

Aktivno mjesto oba enzima je 20 Å dugačko i oko 5 Å široko ždrijelo.<sup>9</sup> Pomoću kristalografije, specifičnog vezanja supstrata i inhibitora te ciljane mutageneze, identificirane su četiri domene koje čine aktivno mjesto oba enzima: a) katalitičko mjesto koje čini katalitička trijada s oksianionskom šupljinom, b) mjesto za vezanje kolina (kolinsko ili kation- $\pi$  mjesto) važno za stabilizaciju pozitivno nabijenog kvaternog dijela kolinskih supstrata i nekih inhibitora, c) acilni džep odgovoran za smještanje acilnog dijela supstrata i d) periferno alosteričko mjesto koje je smješteno na rub ždrijela i odgovorno je za prepoznavanje kolinskih supstrata i njihovo daljnje usmjeravanje unutar aktivnog mjesta (slika 2.2.).<sup>30,33</sup> Iako postoje razlike u sastavu aminokiselina pojedinih domena aktivnog mjesta između AChE i BChE, sastav aminokiselina koje čine katalitičku trijadu i mehanizam hidrolize supstrata je jednak. Mutacijom bilo koje aminokiseline katalitičke trijade, obje kolinesteraze u potpunosti gube svoju katalitičku aktivnost.<sup>34</sup> Pri ulasku u aktivno mjesto kolinesteraza, pozitivno nabijeni kvaterni dušik molekule supstrata ostvaruje interakcije s aminokiselinskim ostacima u kolinskom mjestu i tako usmjerava supstrat u položaj pogodan za hidrolizu.<sup>15,31</sup> Za hidrolizu supstrata odgovorna je katalitička trijada smještena na dnu aktivnog mjesta.



Slika 2.2. Shematski prikaz aktivnog mjesta kolinesterazâ s naznačenim strukturnim domenama i supstratom acetilkolinom. Strelica označava smjer ulaska i pozicioniranje acetilkolina u aktivnome mjestu kolinesterazâ. Preuzeto iz literaturnog izvora 13.

U aktivnome mjestu ljudske AChE i ljudske BChE katalitičku trijadu čine serin, histidin i glutamat koji se u ljudskoj AChE nalaze na položajima 203, 447 i 334, dok se u ljudskoj BChE nalaze na položajima 198, 438 i 325, redom (slika 2.3.).<sup>35</sup> Tetraedarsko prijelazno stanje koje nastaje tijekom hidrolize supstrata stabilizira se stvaranjem vodikovih veza s peptidnom okosnicom aminokiselina koji tvore oksianionsku šupljinu (slika 2.3.).<sup>9</sup> Kod ljudske AChE oksianionsku šupljinu čine glicini na položajima 118 i 119 i alanin na položaju 201, dok ju kod ljudske BChE čine glicini na položajima 116 i 117 te alanin na položaju 199.<sup>9,36</sup>



Slika 2.3. Prikaz aktivnog mjesta ljudske BChE. Preuzeto i prilagođeno iz literaturnog izvora 35.

Kolinsko mjesto enzima čine ogranci aromatskih aminokiselina triptofan, tirozin i fenilalanin koji su direktno uključeni u interakciju između veznog mjesta na enzimu i liganda i koji omogućuju nastajanje interakcija kation- $\pi$  tipa. Triptofan orijentira i omogućava smještanje nabijenog dijela supstrata što dovodi do brže hidrolize kolinskih supstrata. Odustnost fenilalanina kod BChE utječe na afinitet enzima prema nekim inhibitorima. Primjerice, huperizin A ima visoki afinitet prema AChE jer njegov protonirani primarni amin stvara jaku interakciju s fenilalaninom. Kolinsko mjesto BChE nije specifično za pozitivno nabijene ligande, već taj enzim može hidrolizirati i neutralne, pa čak i neke negativne nabijene ligande (aspirin).<sup>12,33</sup>

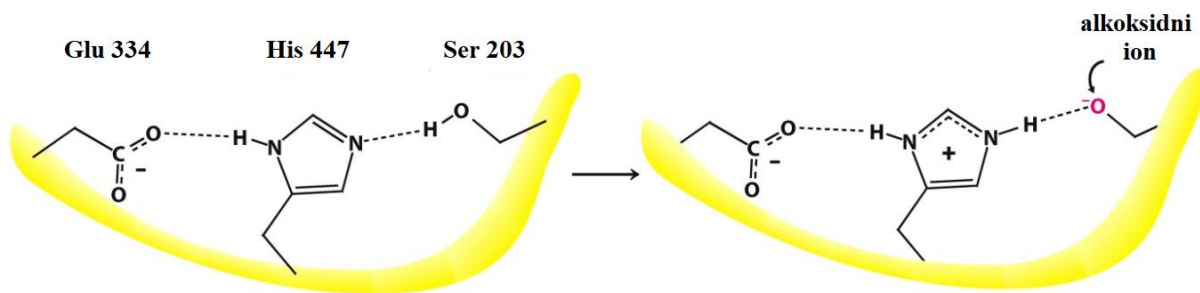
Acilni džep omogućava smještanje acilne skupine supstrata, određujući time njegovu orijentaciju prema reaktivnom serinu i ostatku enzima. Dva fenilalanina na položaju 295 i 297 definiraju dimenziju acilnog džepa aktivnog mjesta ljudske AChE ograničavajući time smještanje supstrata većih od propionilkolina. U acilnome džepu ljudske BChE umjesto aromatskih, prisutne su alifatske aminokiseline leucin 286 i valin 288 koje svojim manjim dimenzijama smanjuju selektivnost enzima te omogućavaju hidrolizu širokog spektra supstrata s obzirom na AChE.<sup>12,33,36</sup>

Periferno mjesto ljudske AChE sadrži tirozine na položajima 72 i 124 te triptofan 286 koje su važne za specifičnost inhibicije enzima pojedinim inhibitorima kao što su propidij i fascikulin.<sup>37</sup> Periferno je mjesto ključno za alosterički mehanizam inhibicije enzima pri visokim koncentracijama acetilkolina.<sup>38</sup> Kod ljudske se BChE nalaze alifatske aminokiseline aspartat, glutamin i arginin pa je stoga otvor u ždrijelo veći te BChE ima manji afinitet prema spojevima koji su specifični inhibitori AChE.<sup>33</sup> U blizini ruba ždrijela i kolinskog mjesta ljudske AChE nalazi se aspartat 74 koji također sudjeluje u stabilizaciji i prihvaćanju liganada te pravilnoj orijentaciji pri ulazu u aktivno mjesto. Kod BChE, umjesto aspartata 74, na odgovarajućem položaju imamo aspartat 70. Aspartat 70 je zaslužan za aktivaciju/inhibiciju enzima jer kod mutirane BChE koje umjesto aspartata imaju glicin (atipična inačica BChE) ili lizin nema pojave aktivacije butirilkolinom, niti inhibicije benzoilkolinom. Kod ljudske BChE aspartat 70 i tirozin 332 smještenim na ulazu ždrijela imaju ulogu perifernog mjesta.<sup>39,40</sup>

## 2.3. Reakcije kolinesterazâ

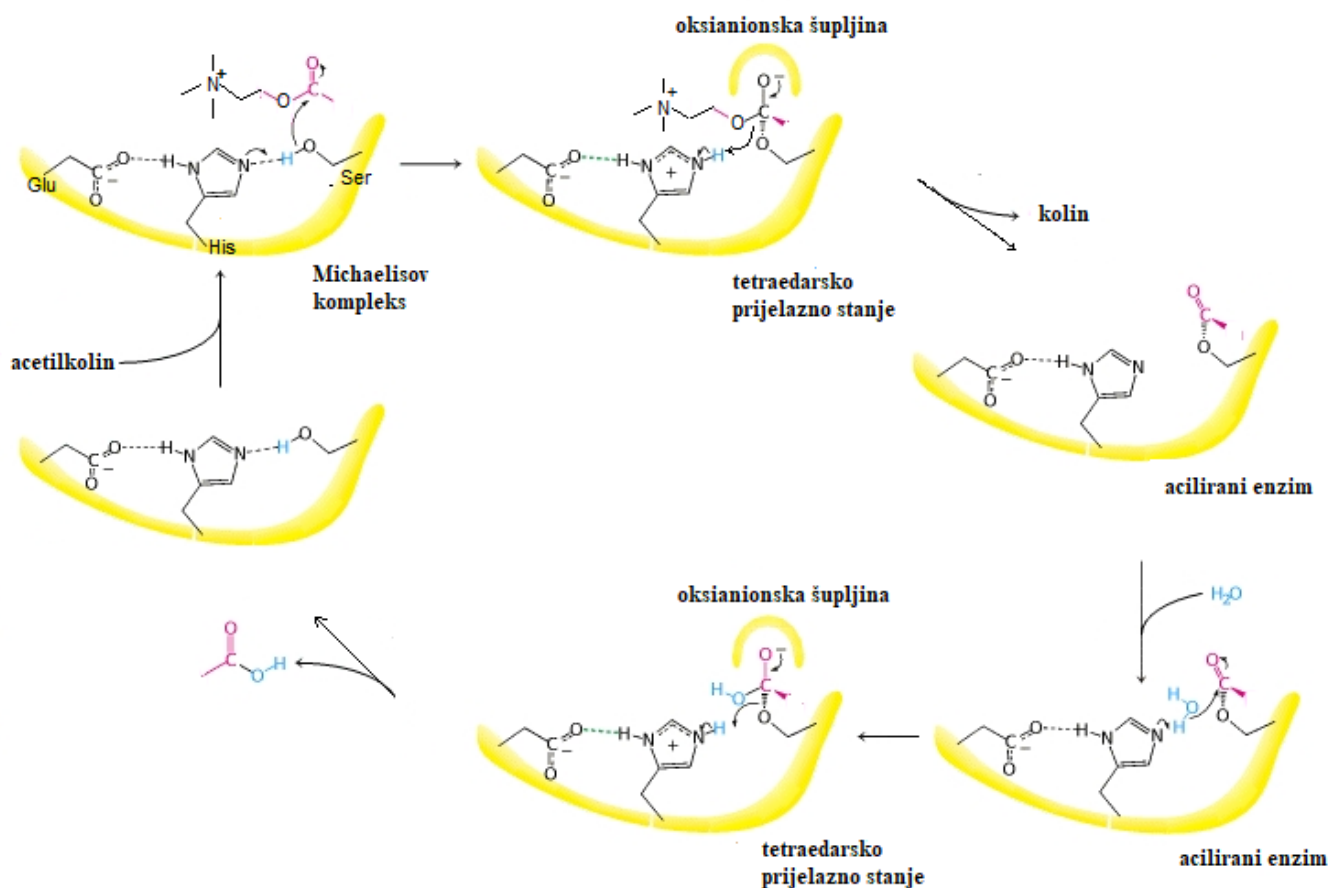
### 2.3.1. Hidroliza supstrata kolinesterazama

Unatoč razlici u sastavu aminokiselina pojedinih domena aktivnoga mjesta, reakcije kolinesterazâ odvijaju se jednakim mehanizmom. Prilikom ulaska u aktivno mjesto, pozitivno nabijeni kvaterni dušik kolinskog estera ostvaruje interakcije s aminokiselinskim ograncima u mjestu vezanja kolina koje usmjeravaju supstrat u položaj pogodan za hidrolizu. Za hidrolizu supstrata odgovorna je već spomenuta katalitička trijada (serin, histidin i glutamat) smještena na dnu aktivnog mjesta.<sup>15</sup> Ovakav razmještaj aminokiselinskih ostataka katalitičke trijade dovodi do visoke reaktivnosti katalitičkog serina, histidinski ogranak 447 (slika 2.4.) polarizira hidroksilnu skupinu katalitičkog serina, čineći ga tako podložnijim deprotonaciji od ostalih serina. Glutamatni ogranak stvaranjem vodikove veze s histidinom 447 pomaže njegovoj orijentaciji u položaj pogodan za stvaranje vodikove veze s hidroksilnom skupinom katalitičkog serina.<sup>16</sup>



Slika 2.4. Katalitička trijada ljudske AChE.

Hidroliza kolinesterazama se odvija u tri koraka koji obuhvaćaju nastajanje Michaelisovog kompleksa enzim-supstrat, aciliranje enzima i njegovo deaciliranje vodom (slika 2.5.). Procesi aciliranja i deaciliranja odvijaju se preko tetraedarskog prijelaznog stanja kojeg čine reaktivni serin i supstrat, a stabiliziraju ga vodikove veze s aminokiselinama oksianionske šupljine. Reakcijski stupnjevi u hidrolizi uključuju stvaranje intermedijera u kojemu se acilna skupin supstrata prenosi na serinski ostatak enzima.<sup>41</sup>



Slika 2.5. Hidroliza acetilkolina ljudskom AChE. Crtkane linije prikazuju vodikove veze.

Kako je ranije napomenuto, za izrazitu efikasnost hidrolize kolinskih estera kao i za razlike u specifičnostima AChE i BChE prema supstratima i inhibitorima odgovorne su interakcije s aminokiselinskim ograncima karakterističnima za pojedine kolinesteraze. Tako se hidroliza supstrata (kolinskog estera) ljudskom AChE odvija pomoću interakcija u kojima sudjeluju dva fenilalanina na položaju 295 i 297 unutar acilnog džepa, Trp86, Tyr337 i Phe338 unutar kolinskog mjesta te Tyr72, Tyr124, Tyr341 i Trp286 na perifernom alosteričkom mjestu.<sup>9,11,30,36</sup> Također, za interakciju sa supstratom značajne su i dvije alifatske aminokiseline: Asp74 koji se nalazi perifernom alosteričkom mjestu i Glu202 smješten uz katalitički serin.<sup>37,39</sup> Nasuprot tome, interakcije unutar acilnog džepa BChE određuju alifatske aminokiseline Leu286 i Val288, unutar kolinskog mjesta Ala328 i konzervirani Trp82 (ekvivalent Trp86 kod AChE) te na perifernom alosteričkom mjestu Asn68, Gln119, Ala277 i konzervirani Tyr332 (ekvivalent Tyr341 kod AChE).

### 2.3.2. Inhibicija kolinesterazâ

Općenito, aktivnost enzima može se inhibirati vezanjem malih molekula i iona. Inhibicija enzimske aktivnosti glavni je kontrolni mehanizam u biološkim sustavima, primjerice u regulaciji alosteričkih enzima. Mnogi lijekovi i otrovi inhibitori su enzima, primjerice aspirin djeluje kovalentnim vezanjem na enzim, ciklooksigenazu smanjujući time sintezu signalnih molekula u upalnome procesu.<sup>42</sup> Inhibicija nam može pružiti uvid u mehanizam djelovanja enzima, pa tako primjerice specifični inhibitori mogu poslužiti za identifikaciju aminokiselinskih ostataka ključnih za katalizu.<sup>16</sup>

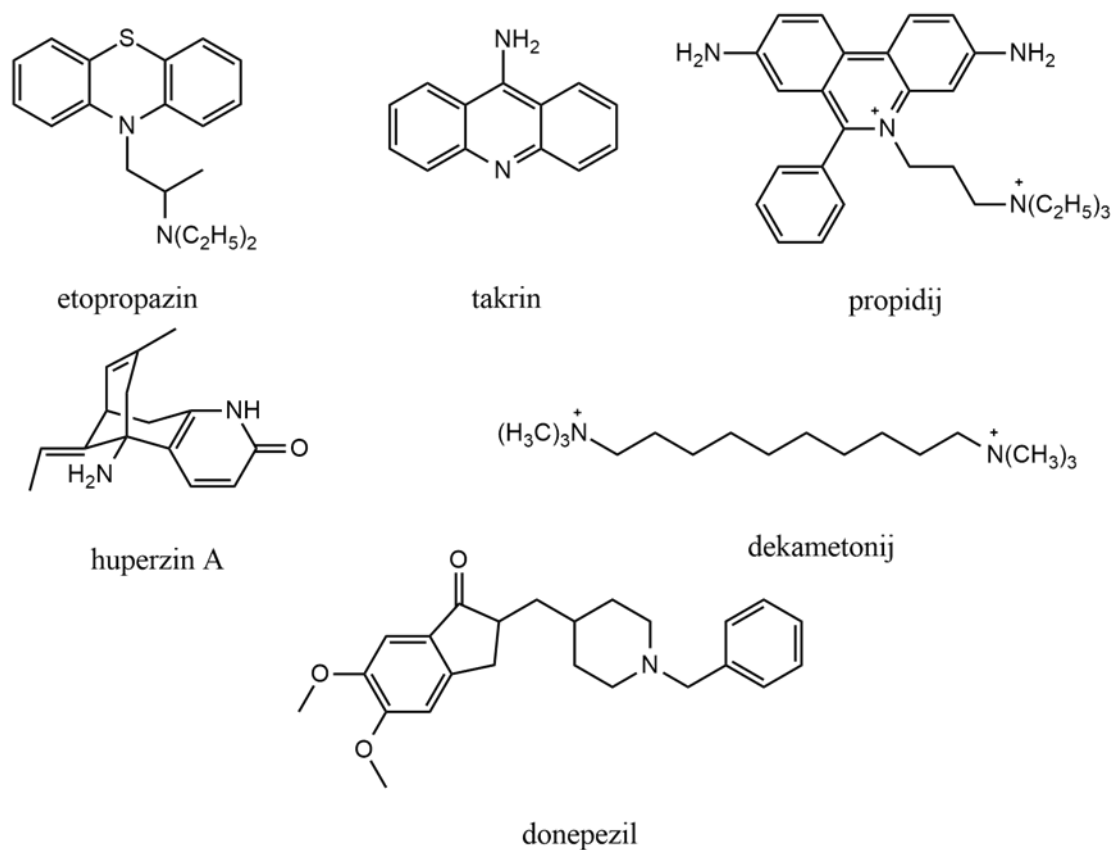
Inhibicija AChE dovodi do nakupljanja acetilkolina i poremećaja u prijenosu živčanih impulsa, što se manifestira kolinergičkom krizom. Ova kriza uključuje mučnine, salivaciju, paralizu dišnog sustava, te na kraju i smrt organizma.<sup>43,44</sup> Inhibicija AChE ima po život opasne posljedice, međutim inhibicija BChE istim spojem, koliko je do danas poznato, ne utječe na vitalne funkcije organizma.<sup>21,24</sup> Inhibicija kolinesterazâ može biti ireverzibilna (progresivna) i reverzibilna.

Uz karboksilne estere kolinesteraze kataliziraju hidrolizu estera karbaminske kiseline, kao i estera fosfatne, fosfonske, fosfinske i sulfonske kiseline. Razlika između supstrata i potonjih spojeva je u brzini deaciliranja serina vodom koja je za karbamatne i organofosforove spojeve spora pa su stoga ti spojevi u stvari ireverzibilni inhibitori kolinesterazâ.<sup>45</sup> Da bi neki inhibitor bio ireverzibilan njegova struktura mora oponašati

strukturu prijelaznog stanja koja se javlja u enzimu tijekom katalitičkog ciklusa i kovalentno se vezati na aminokiselinu koja sudjeluje u reakciji sa supstratom. Nadalje, nakon približavanja aktivnom centru enzima ireverzibilni inhibitor formira Michaelisov tip kompleksa s katalitičkim serinom, a tijekom njihove kemijske reakcije inhibitor mora biti stabiliziran kovalentnim vezanjem s katalitičkim serinom i smještanjem fosfonilnog/karbonilnog kisika u oksianionsku šupljinu. Brzina inhibicije uvelike ovisi i o karakteristikama izlazne skupine.

Interakcije kolinesterazâ i reverzibilnih inhibitora nekovalentne je prirode. Do sada je sintetiziran velik broj takvih inhibitora kolinesterazâ, a mnogi su i prirodnog podrijetla izolirani iz biljaka, primjerice alkaloidi (huperzin A, solanin) i flavonoidi (galangin).<sup>46,47</sup> Reverzibilni inhibitori vežu se ili u aktivno mjesto (takrin) ili na periferno mjesto enzima (propidij) ili istodobno na oba mjesta (dekametnij, donepezil) (slika 2.6.).<sup>48</sup> Kako hidroliza supstrata kolinesteraza uključuje vezanje supstrata i u katalitičko mjesto i na periferno mjesto enzima tako se oba liganda, i supstrat i reverzibilni inhibitor, mogu natjecati za vezanje u ta dva mjesta. Kompeticija u katalitičkom mjestu enzima direktno sprječava hidrolizu supstrata jer se vezanje supstrata i inhibitora međusobno isključuje. Vezanje inhibitora na periferno mjesto, s druge strane, indirektno sprječava vezanje supstrata. Stoga inhibicija može biti uzrok konformacijskih promjena enzima posredovanih vezanjem inhibitora, elektrostatskih interakcija pozitivno nabijenih inhibitora s kationskim dijelom supstrata tijekom katalize ili steričkih i/ili elektrostatskih smetnji ulasku supstrata u aktivno mjesto. Prisutnost pozitivnog naboja i/ili aromatskih ili hidrofobnih supstituenata olakšava ulazak i smještanje inhibitora u aktivno mjesto jer svaka podjedinica AChE ima elektrostatski dipol kolinearan s osi koja prolazi ždrijelom aktivnog mjesta što olakšava vezanje pozitivno nabijenih spojeva.<sup>45,49,50</sup>





Slika 2.6. Prikaz struktura nekih reverzibilnih inhibitora kolinesterazâ.

## 2.4. Interakcija kolinesterazâ i karbamata

Karbamati su esteri karbaminske kiseline koji se najčešće koriste kao terapeutici i pesticidi, a mogu izazvati toksičnost zbog inhibicije AChE. Farmakološka i toksikološka svojstva nekih karbamatnih inhibitora kolinesterazâ poznata su već više od 100 godina. Prvi poznati inhibitor bio je fizostigmin iz zrna biljke *Physostigma venenosum*, dok su čisti alkaloid izolirali Jobst i Hesse 1864. nazvavši ga fizostigmin koji se uspješno koristio za liječenje glaukoma, a neke zemlje ga i dan danas koriste. Karbamatni kolinesterazni inhibitori neostigmin i piridostigmin također pokazuju farmakološko značenje, a koriste se pri liječenju autoimune bolesti *miastenije gravis*. Budući da je dekarbamilacija brža od defosforilacije, neki karbamatni inhibitori koriste se za zaštitu kolinesterazâ od fosforilirajućih inhibitora kolinesterazâ.<sup>27,51</sup> Piridostigmin je na taj način sposoban zaštititi aktivno mjesto AChE stoga je korišten u vojne svrhe kao zaštita od potencijalnog izlaganja organofosforinim bojnim otrovima.<sup>52,53</sup>

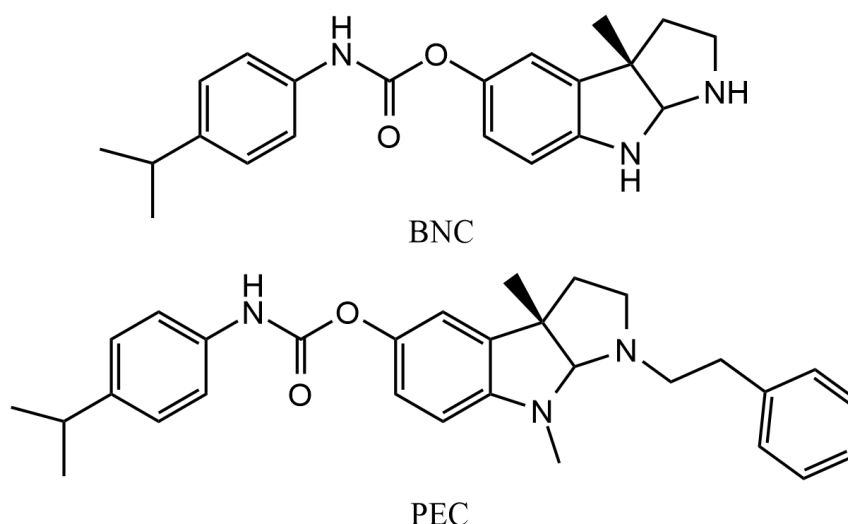
Interakcija karbamata i kolinesterazâ odvija se na isti način kao i enzima s odgovarajućim supstratom, s razlikom u brzini deacilacije koja je kod supstrata izrazito brza dok je kod karbamata brzina deacilacije (u ovom slučaju riječ je o dekarbamilaciji) jako spora. Da bi se karbamat kovalentno vezao mora se stvoriti Michaelisov tip kompleksa EI blizu katalitičkog serina. Tijekom reakcije između enzima i inhibitora, karboksilna skupina karbamata se prilagođava oksianionskoj šupljini te katalitički serin kovalentno veže karbamat. Vezanje karbamata uzrokuje orijentaciju određene izlazeće skupine i preostalih supstituenata u prijelaznom stanju, odnosno mijenja se geometrija karbamata iz trigonsko-planarne u tetraedarsku.<sup>45</sup> Zbog asimetričnosti ždrijela aktivnog mjesta enantiomeri kiralnih karbamata mogu inhibirati enzime različitim brzinama. Ljudske AChE i BChE pokazuju izrazitu stereoselektivnost prema (*R*)-enantiomerima acetatnih estera derivata kinuklidina,<sup>4,54</sup> (-)-fizostigminu, (-)-fizoveninu i (-)-kimserinu te (*R*)-enantiomerima biskarbamata bambuterola, metakarba i izokarba.<sup>3,55,56</sup>

#### 2.4.1. Karbamati kao lijekovi u tretmanu Alzheimerove bolesti

Alzheimerova bolest (AD) je progresivni neurodegenerativni poremećaj koji se javlja uglavnom u starijoj životnoj dobi, a kao najčešći uzrok sindroma demencije predstavlja značajni javnozdravstveni problem.

Brojni dokazi ukazuju na to da tijekom AD dolazi do oštećenja kolinergičkog sustava koji sudjeluje u obradi informacija u hipokampusu i neokorteksu i značajnog deficita acetilkolina, a takva opažanja govore u prilog tome da su neke od kliničkih manifestacija bolesti posljedica gubitka kolinergičke inervacije moždane kore. Inhibitori kolinesteraze su tada poželjni jer sprečavaju razgradnju acetilkolina blokirajući njihovu aktivnost. Trenutačno farmakološko liječenje AD je simptomatsko, bez mogućnosti utjecaja na uzrok bolesti. U Hrvatskoj su trenutno registrirana tri lijeka: dva inhibitora AChE (donepezil i rivastigmin) koji se koriste za liječenje blagog do umjerenog oblik bolesti i jedan antagonist *N*-metil-D-aspartat receptora (memantin) koji se koristi za liječenje umjerenog do teškog oblika bolesti. Oba inhibitora su jednako učinkovita i mogu privremeno poboljšati pamćenje jer održavaju višu razinu acetilkolina u mozgu.<sup>57,58</sup>

Prvi lijek izbora pri tretmanu AD je donepezil, selektivni inhibitor AChE. Do sada su za liječenje AD odobrena četiri inhibitora AChE: donepezil, rivastigmin i galantamin koji su podjednako efikasni, i takrin koji se rijetko koristi zbog svoje hepatotoksičnosti. Novija istraživanja o utjecaju BChE ukazala su na BChE kao novu metu u liječenju AD.<sup>61</sup> Naime, tijekom napredovanja AD aktivnost AChE se smanjuje do 33-45 % svoje normalne vrijednosti, dok aktivnost BChE progresivno raste za 40-90 %.<sup>1</sup> Također, pokazano je da selektivna inhibicija BChE, s obzirom na AChE, ima povoljan učinak na sposobnost učenja i smanjuje amiloidne nakupine u mozgu glodavaca s AD.<sup>62</sup> Do sada je sintetizirana i ispitana nekolicina selektivnih inhibitora BChE, mahom derivata tienotiazina i takrina<sup>63,64</sup> dok su se najpotentnijima pokazali derivati karbamata kimserina (slika 2.7.).<sup>5,65</sup> Sintetizirani su i bisdimetilni karbamati bronhodilatatora metaproterenola i izoproterenola koji su se pokazali vrlo potentnim inhibitorima BChE, ali znatno manje selektivnima od bambuterola, izrazito selektivnog BChE inhibitora.<sup>3</sup> Selektivnost je bila izraženija kod ljudskih nego kod mišjih kolinesterazâ.<sup>3</sup> Također je pokazano da raspored skupina na benzenskom prstenu kakav je kod bambuterola i karbamata metaproterenola osigurava tim karbamatima geometriju u aktivnom mjestu BChE optimalnu za reakciju s aktivnim serinom. Nadalje, sintetiziran je i niz analoga bambuterola kojima je mijenjana struktura i duljina aaminskog dijela molekule, međutim inhibicijska moć bambuterola nije dosegnuta.<sup>66</sup>



Slika 2.7. Strukturni prikaz nekih karbamatnih inhibitora kolinesterazâ.

BNC (*N,N*-bisnorkimserin) i PEC (*N,N*-feniletilnorkimserin) su derivati karbamata kimserina.

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Enzimski preparati

Kao izvor ljudske AChE korištena je rekombinantna ljudska AChE ( $hAChE_{rec}$ ) dobivena od dr. F. Nachona iz Département de Toxicologie, Armed Forces Biomedical Research Institute, Francuska. Nativna ljudska plazma dobivena od više donora sa Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb, Hrvatska, korištena je kao izvor ljudske BChE ( $hBChE$ ). Korišteni su uzorci  $hBChE$  koji imaju uobičajenu serumsku BChE. Fenotip BChE je određen ranije uobičajenom procedurom za fenotipiranje ljudske BChE.<sup>67</sup> Butirilkolinesteraza iz seruma konja ( $hoBChE$ ) te acetilkolinesteraza iz električnog organa jegulje ( $eeAChE$ ) nabavljene su od Sigma Chemicals Co., SAD.

Liofilizirane  $hoBChE$  i  $eeAChE$  otopljene su u fosfatnom puferu ( $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) koji je sadržavao 1 % albumina goveđeg seruma (BSA).  $hAChE_{rec}$  i  $eeAChE$  ( $2 \text{ g dm}^{-3}$ ) su razrijeđene 20 puta, a  $hoBChE$  ( $2 \text{ g dm}^{-3}$ ) 100 puta u fosfatnom puferu ( $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) koji je sadržavao 0,1 % BSA te su takva ishodna razrjeđenja enzima čuvana na  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  do mjesec dana. Daljnja razrjeđenja enzima rađena su neposredno prije izvođenja pokusa ili u  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatnom puferu, pH 7,4, u slučaju  $hBChE$  i  $hoBChE$  ili u slučaju  $hAChE_{rec}$  i  $eeAChE$  u  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatnom puferu koji je sadržavao 0,01 %-tni albumin goveđeg seruma (BSA).

### 3.2. Kemikalije i otopine

Kao supstrat kolinesterazâ korišten je acetiltiokolinov jodid (ATCh) (Sigma-Aldrich, SAD). Kao ireverzibilni inhibitor kolinesteraza korišten je karbamat albuterola (KAb). Karbamat albuterola sintetiziran je kao racemična smjesa (KAb) te kao (*R*)-karbamat albuterol (*R*-KAb) i (*S*)-karbamat albuterol (*S*-KAb). Sve spojeve sintetizirala je dr.sc. Anamarija Knežević u Laboratoriju za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu u Zavodu za organsku kemiju i biokemiju instituta „Ruđer Bošković”. U tablici 3.1. prikazane su strukture, kemijska imena te kratice supstrata i inhibitora korištenih u ovome radu. Trodimenzijske strukture spojeva prikazuju strukture s najnižom konformacijskom energijom izračunatom pomoću

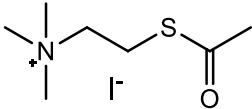
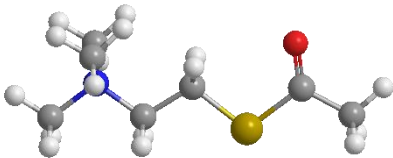
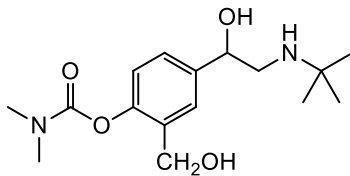
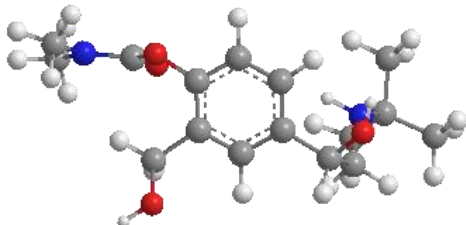
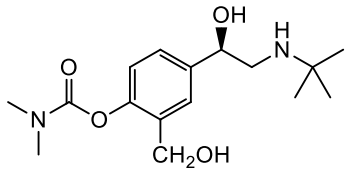
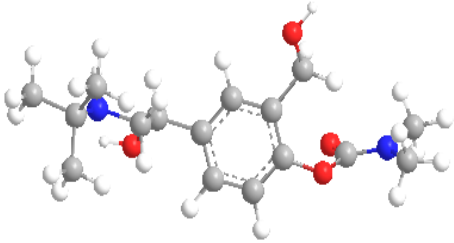
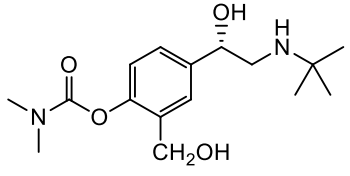
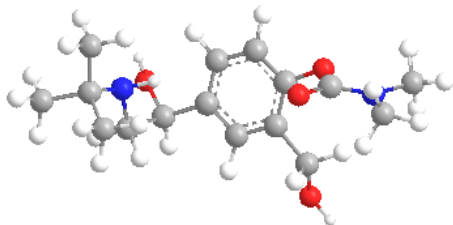
MMFF94 metode korištenjem programa CambridgeSoft Chem3D Ultra 12.0 (San Diego, SAD).

Osnovne otopine supstrata, ATCh ( $10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), KAb ( $100 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), S-KAb ( $50 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) i R-KAb ( $100 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), kao i njihova daljnja razrijeđenja pripremane su u vodi. Otopina supstrata pripremana je neposredno prije početka pokusa, dok su osnovne otopine karbamata albuterola čuvane na  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  do tri mjeseca.

U svim mjerenjima korišten je  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatni pufer pH 7,4, koji je priređen titracijom odgovarajućih soli  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  i  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Kemika, Hrvatska).

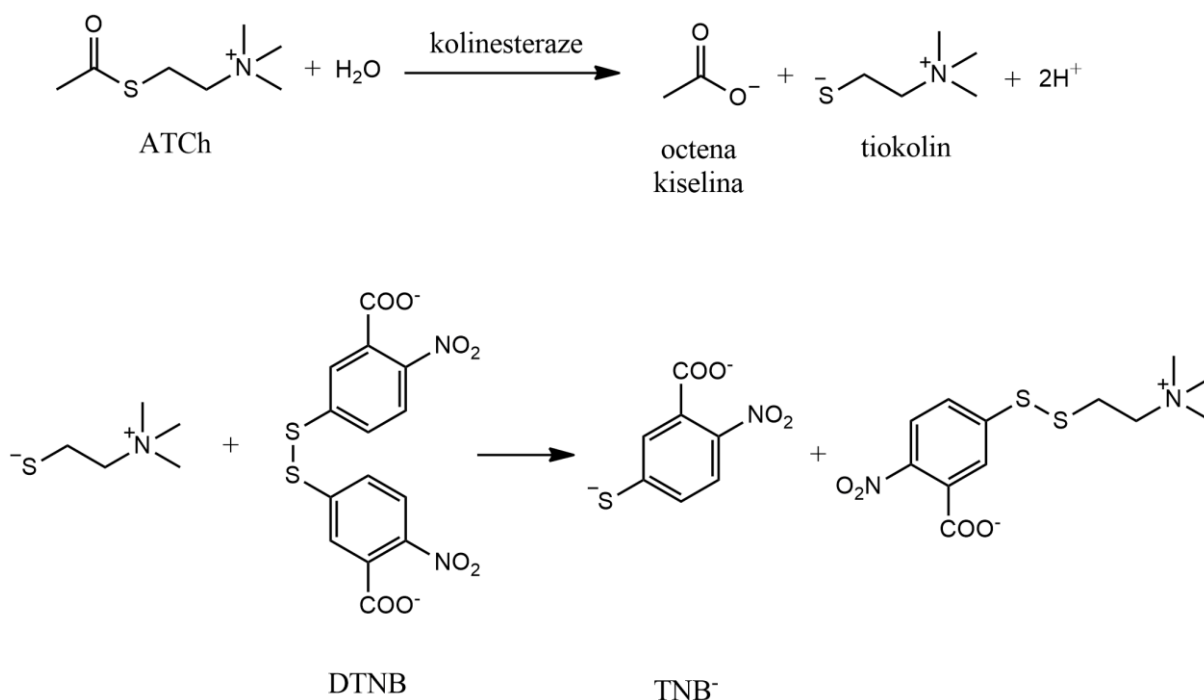
Tiolni reagens DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina) (Sigma, SAD), priređivan je kao  $6 \text{ mmol dm}^{-3}$  otopina u  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  fosfatnom puferu. Ova otopina je čuvana na  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Tablica 3.1.** Prikaz struktura i 3D formula supstrata i inhibitora korištenih u ovom radu te njihova kemijska imena i kratice.

Struktura	3D Struktura	Kemijsko ime	Kratice
		acetiltiokolinov jodid	ATCh
		4-(2-( <i>tert</i> -butilamino)-1-hidroksietil)-2-(hidroksimetil) fenil dimetilkarbamat	KAb
		( <i>R</i> )-4-(2-( <i>tert</i> -butilamino)-1-hidroksietil)-2-(hidroksimetil) fenil dimetilkarbamat	R-KAb
		( <i>S</i> )-4-(2-( <i>tert</i> -butilamino)-1-hidroksietil)-2-(hidroksimetil) fenil dimetilkarbamat	S-KAb

### 3.3. Mjerenje aktivnosti enzima

Aktivnost kolinesterazâ prema ATCh mjerena je Ellmanovom spektrofotometrijskom metodom koristeći DTNB kao tiolni reagens (slika 3.1.).<sup>68</sup> Hidrolizom oslobođeni tiokolin reagira s DTNB-om pri čemu se oslobađa žuto obojeni anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB<sup>-</sup>), a porast apsorbancije, koje odgovara aktivnosti enzima, prati se na valnoj duljini od 412 nm ( $\epsilon_M = 13,6 \cdot 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).<sup>68</sup>



Slika 3.1. Prikaz reakcija na kojima se temelji Ellman-ova metoda.

Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti enzima sadržavala je 30  $\mu\text{L}$  0,6  $\text{mmol dm}^{-3}$  DTNB-a, 770  $\mu\text{L}$  pufera i 100  $\mu\text{L}$  enzima. Mjerenje aktivnosti započeto je otprilike 10 s nakon dodatka 100  $\mu\text{L}$  supstrata u reakcijsku smjesu i trajalo je jednu minutu. Kod svih mjerenja porast apsorbancije ( $\Delta A/\text{min}$ ) bio je linearan s vremenom. Konačna koncentracija supstrata bila je 1  $\text{mmol dm}^{-3}$ , dok su konačna razrjeđenja enzima iznosila 250, 1000, 6000 i 50000 puta za hBChE, hoBChE, hAChE, eeAChE, redom.

Mjerenja su rađena na spektrofotometru CARY 300 (Varian Inc., Australija) s termostatiranim kućištem u kivetama s optičkim putem od 1 cm pri 25 °C.

### 3.4. Mjerenje progresivne inhibicije

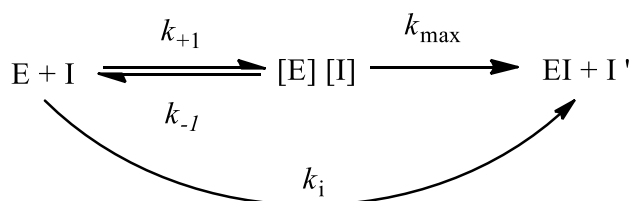
Progresivna inhibicija određivna je mjerenjem vremenskog tijeka inhibicije enzima karbamatima albuterola. U reakcijsku smjesu koja je sadržavala 30  $\mu\text{L}$  0,6  $\text{mmol dm}^{-3}$  DTNB-a, 670  $\mu\text{L}$  pufera i 100  $\mu\text{L}$  odgovarajuće razrijeđenog enzima dodavano je 100  $\mu\text{L}$  inhibitora u rasponu koncentracija od 0,5 do 1000  $\mu\text{mol dm}^{-3}$ , a nakon određenog vremena inhibicija je zaustavljena dodatkom 100  $\mu\text{L}$  10  $\text{mmol dm}^{-3}$  ATCh te je izmjerena preostala aktivnost enzima. Usporedno s inhibiranim probama mjerene su i aktivnosti kontrolnih proba koje su sadržavale sve komponente kao i odgovarajuće inhibirane probe izuzev inhibitora. Aktivnost enzima u "nultom" vremenu mjerena je tako da je enzim dodavan na kraju, odnosno u reakcijsku smjesu koju čine DTNB, pufer, inhibitor i supstrat.

### 3.5. Obrada rezultata

Za računanje svih kinetičkih parametara, kao i za izradu grafičkih prikaza korišten je statistički paket GraphPadPrism (Graph Pad Inc, San Diego, SAD). Strukturne i 3D formule supstrata i inhibitora su izrađene u programskim paketima ChemDraw Ultra 12.0 (CambridgeSoft, SAD).

### 3.6. Progresivna inhibicija

Progresivna inhibicija kolinesterazâ karbamatom albuterola odvija se prema shemi 1:<sup>70</sup>



*Shema 1.* Progresivna inhibicija kolinesteraza.

gdje E, I, [E][I] i I' označavaju slobodan enzim, inhibitor, Michaelisov tip kompleksa enzima i inhibitora, karbamilirani enzim i monokarbamat albuterola. Oznake  $k_{+1}$ ,  $k_{-1}$ , i  $k_{\max}$  predstavljaju konstante brzine pojedinačnih reakcija, dok  $k_i$  označava sveukupnu konstantu brzine inhibicije.



Shemu 1. opisuje jednadžba (1):

$$\ln \frac{[E]_0}{[E]_0 - [EI]} = \frac{k_{max} \cdot [I]}{K_i + [I]} \cdot t_i \quad (1)$$

$[E]_0$  je ukupna koncentracija enzima koja je proporcionalna aktivnosti enzima u odsutnosti inhibitora,  $v_0$ . Razlika  $[E]_0 - [EI]$  proporcionalna je preostaloj aktivnosti enzima ( $v$ ) nakon vremena inhibicije  $t_i$ . Zbog toga se jednadžba (1) može zapisati u obliku:

$$\ln \frac{v_0}{v} = \frac{k_{max} \cdot [I]}{K_i + [I]} \cdot t_i = k_{obs} \cdot t_i \quad (2)$$

Nagib pravca predstavlja konstantu inhibicije prvog reda ( $k_{obs}$ ):

$$k_{obs} = \frac{k_{max} \cdot [I]}{K_i + [I]} \quad (3)$$

Konstanta disocijacije enzim-inhibitor kompleksa,  $K_i$ , definirana je slijedećom jednadžbom:

$$K_i = \frac{k_{-1} + k_{max}}{k_{+1}} \quad (4)$$

Ako je  $k_{max} \ll k_{-1}$  tada  $K_i$  predstavlja konstantu disocijacije Michaelisova tipa kompleksa  $[E][I]$ .

Sveukupna konstanta brzine inhibicije ( $k_i$ ) određuje se iz ovisnosti konstante brzine inhibicije prvog reda ( $k_{obs}$ ) o koncentraciji inhibitora. Kada ta ovisnost nije linearna, progresivna inhibicija slijedi jednadžbu (2) te se  $k_{max}$  i  $K_i$  konstante određuju prema jednadžbi (3), a njihov omjer daje sveukupnu konstantu inhibicije:

$$k_i = \frac{k_{max}}{K_i} \quad (5)$$

Kada je  $[I] \ll K_i$ , koncentracija Michaelisovog kompleksa je zanemarivo mala, pa se jednačba (2) može pojednostaviti:

$$\ln \frac{v_0}{v} = \frac{k_{\max} \cdot [I]}{K_i} \cdot t_i = k_i \cdot [I] \cdot t_i \quad (6)$$

Nagib pravca predstavlja konstantu brzine inhibicije prvog reda ( $k_{\text{obs}}$ ). Tada nije moguće izračunati pojedinačne konstante  $k_{\max}$  i  $K_i$  te vrijedi relacija:

$$k_{\text{obs}} = k_i \cdot [I] \quad (7)$$

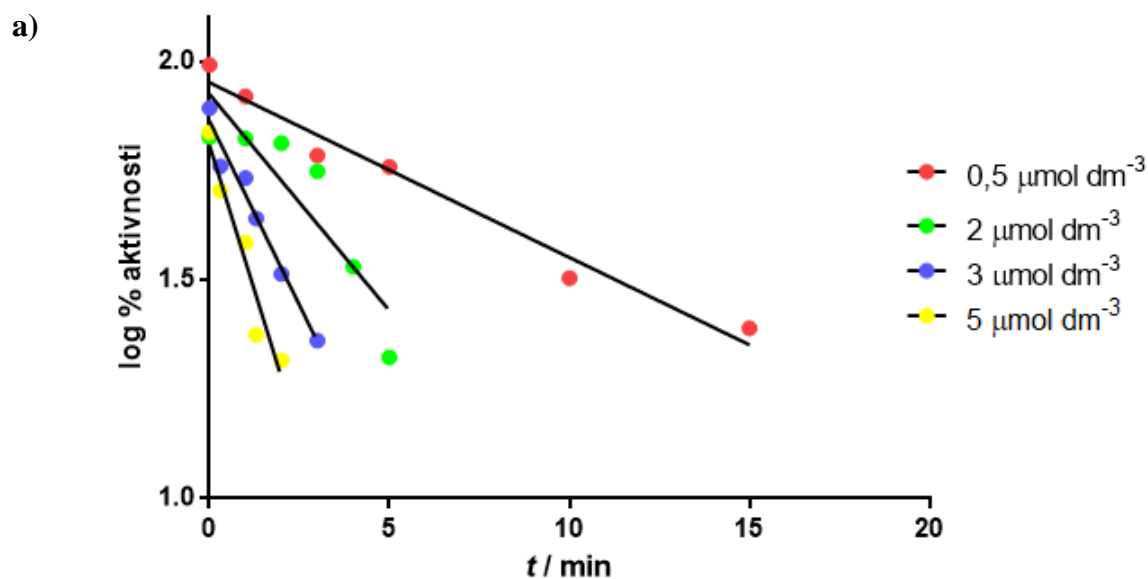
iz koje se računa konstanta  $k_i$ .

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

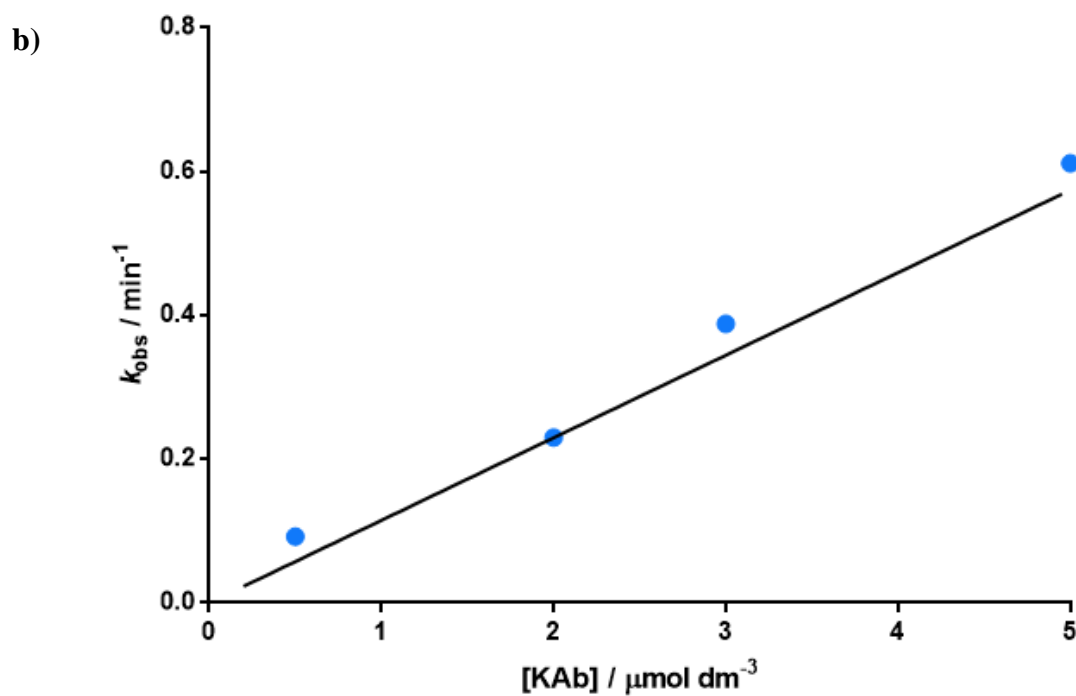
### 4.1. Rezultati

Mjerena je vremenska ovisnost inhibicije ljudske rekombinantne AChE, AChE iz električne jegulje, BChE iz ljudskog i BChE iz konjskog seruma s karbamatima albuterola.

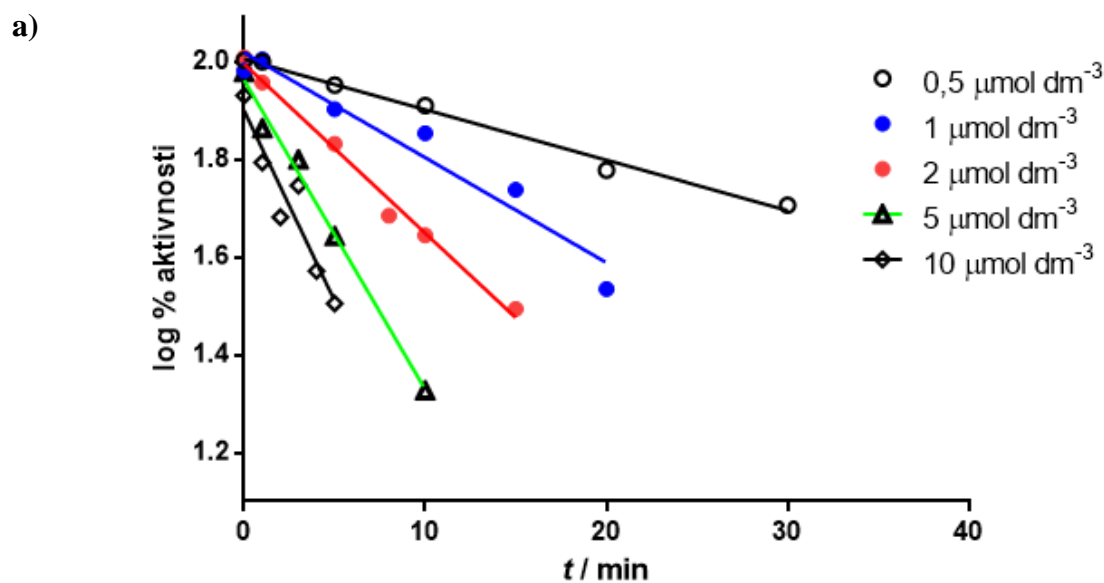
Za svaki pokus korištene su najmanje tri različite koncentracije inhibitora, a za svaku koncentraciju inhibitora mjerena je preostala aktivnost enzima u najmanje pet različitih vremena inkubacije enzima s inhibitorom u reakcijskoj smjesi. Inhibicija je pratila kinetiku prvog reda za sve koncentracije karbamata albuterola, tj. logaritam postotka preostale aktivnosti bio je linearna funkcija vremena inhibicije te su konstante inhibicije prvog reda ( $k_{\text{obs}}$ ) određene linearnom regresijskom analizom pri čemu je korištena jednadžba (2) (slike 4.1.a i 4.2.a). Sveukupne konstante brzine inhibicije ( $k_i$ ) određene su iz ovisnosti konstanti inhibicije prvog reda ( $k_{\text{obs}}$ ) o koncentraciji inhibitora karbamata albuterola ( $[I]$ ) (slike 4.1.b i 4.2.b). U tablici 4.1. prikazane su vrijednosti konstanti brzine inhibicije za pojedine enzime.



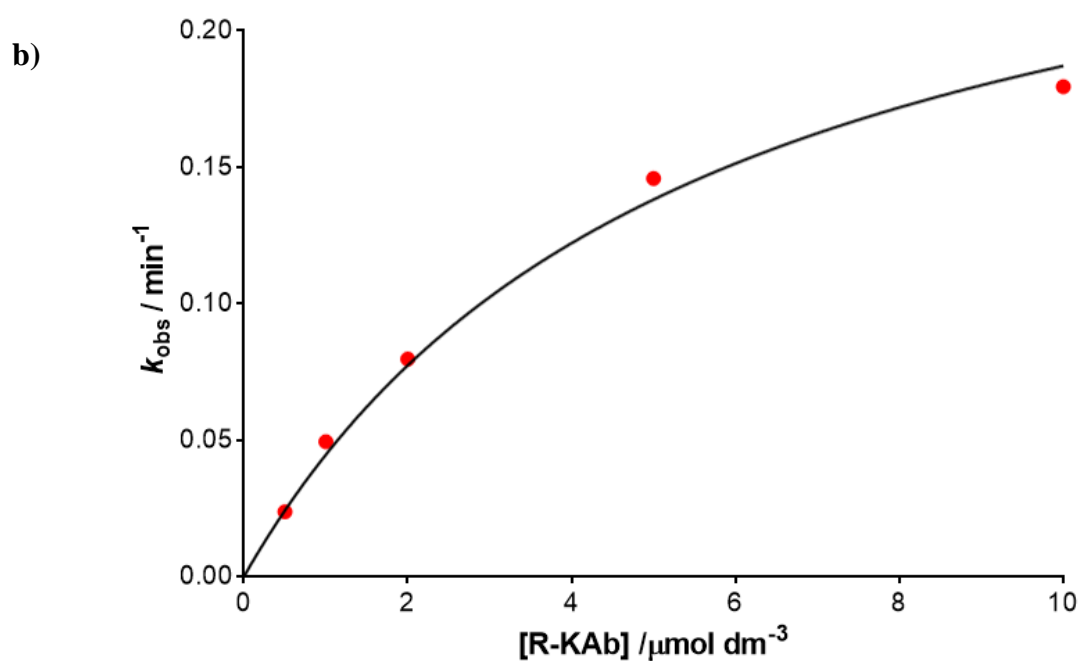
### hBChE



Slika 4.1. Reprezentativni pokus progresivne inhibicije hBChE s racematom karbamata albuterola (KAb). Slika pod a) prikazuje ovisnost logaritma preostale aktivnosti enzima o vremenu inhibicije. Nagib pravca odgovara konstanti inhibicije prvog reda ( $k_{\text{obs}}$ ). Slika pod b) prikazuje ovisnost  $k_{\text{obs}}$  o koncentraciji inhibitora [KAb] iz koje je izračunata sveukupna konstanta inhibicije ( $k_i$ ) pomoću jednadžbe (6).



### hBChE

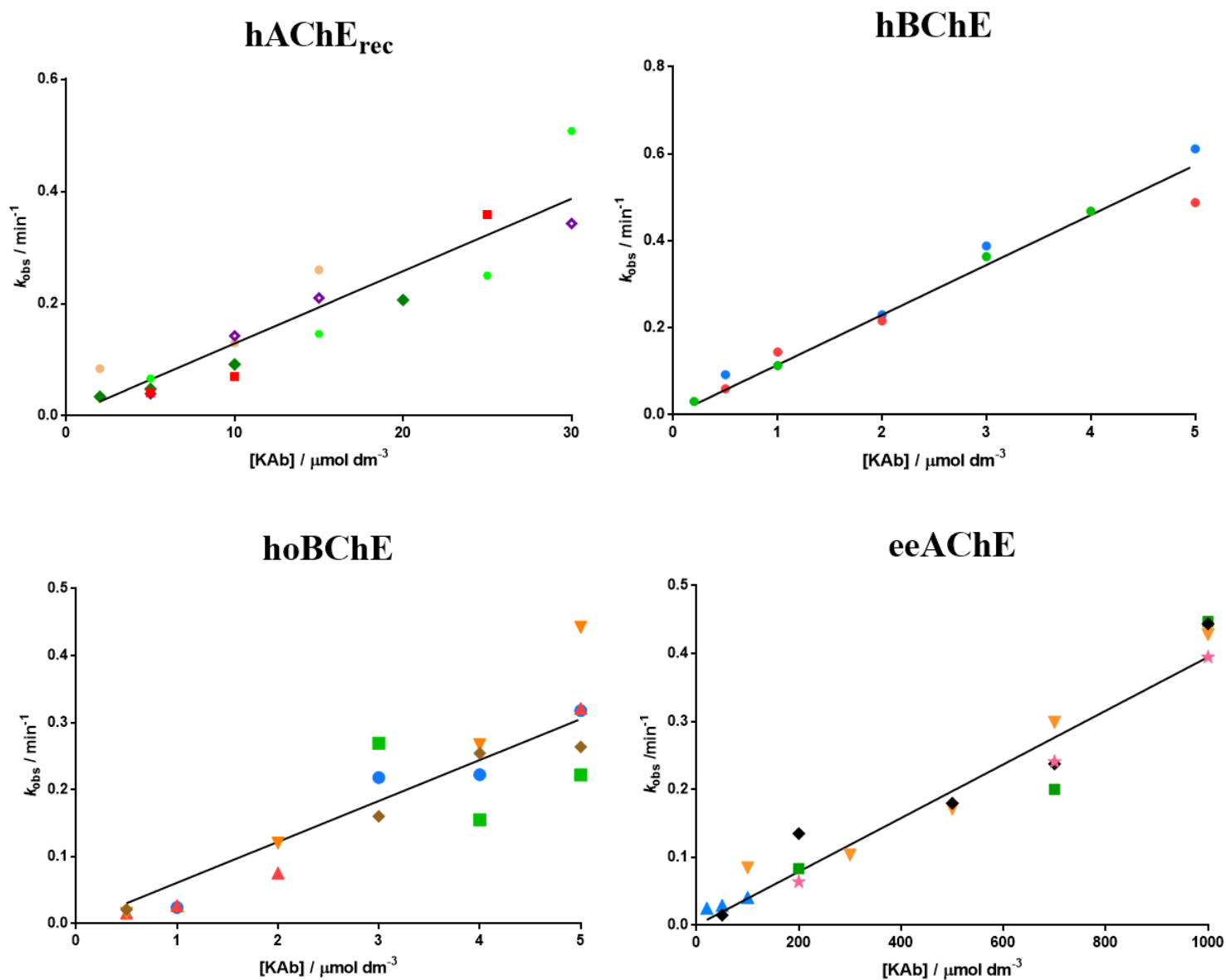


Slika 4.2. Reprezentativni pokus progresivne inhibicije hBChE sa (*R*)-karbamatom albuterola (R-KAb). Slika pod a) prikazuje ovisnost logaritma preostale aktivnosti enzima o vremenu inhibicije. Nagib pravca odgovara konstanti inhibicije prvog reda ( $k_{\text{obs}}$ ). Slika pod b) prikazuje ovisnost  $k_{\text{obs}}$  o koncentraciji inhibitora [R-KAb] iz koje su određene maksimalna konstanta brzine inhibicije ( $k_{\text{max}}$ ) i konstanta disocijacije enzim-inhibitor kompleksa ( $K_i$ ) korištenjem jednadžbe (3). Sveukupna konstanta inhibicije ( $k_i$ ) izračunata je pomoću jednadžbe (5).

#### 4.1.1. Inhibicija kolinesterazâ racematom karbamata albuterola

Kod svih enzima koji su bili inhibirani racematom karbamata albuterola ovisnost  $k_{\text{obs}}$  o koncentraciji inhibitora je bila linearna (slika 4.3.) te su sveukupne konstante brzine inhibicije ( $k_i$ ) računane prema modelu u kojemu je zanemareno stvaranje kompleksa enzim-inhibitor (jednadžba (7)).

U tablici 4.1. prikazane su vrijednosti konstanti brzine inhibicije za pojedine enzime. Pojedinačne vrijednosti  $k_{\text{obs}}$  konstanti dobivene za koncentracije inhibitora kojima su enzimi bili inhibirani, kao i pripadne  $k_i$  konstante, prikazane su u tablici 4.2.



Slika 4.3. Sumarni grafovi linearne ovisnosti konstante inhibicije prvog reda ( $k_{obs}$ ) kolinesteraza o koncentraciji inhibitora, racemata karbamata albuterola, (KAb). Svaki pokus je označen drugom bojom.

**Tablica 4.1.** Inhibicija kolinesterazâ s racematom karbamata albuterola, (KAb). Sveukupne konstante brzine inhibicije ( $k_i$ ) kolinesterazâ s KAb izračunate su pomoću jednadžbe (6).

Enzim	Racemat
	$k_i / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$
eeAChE	$(0,395 \pm 0,018) \cdot 10^3$
hAChE	$(13,3 \pm 1,3) \cdot 10^3$
hBChE	$(109 \pm 6) \cdot 10^3$
hoBChE	$(64,0 \pm 3) \cdot 10^3$

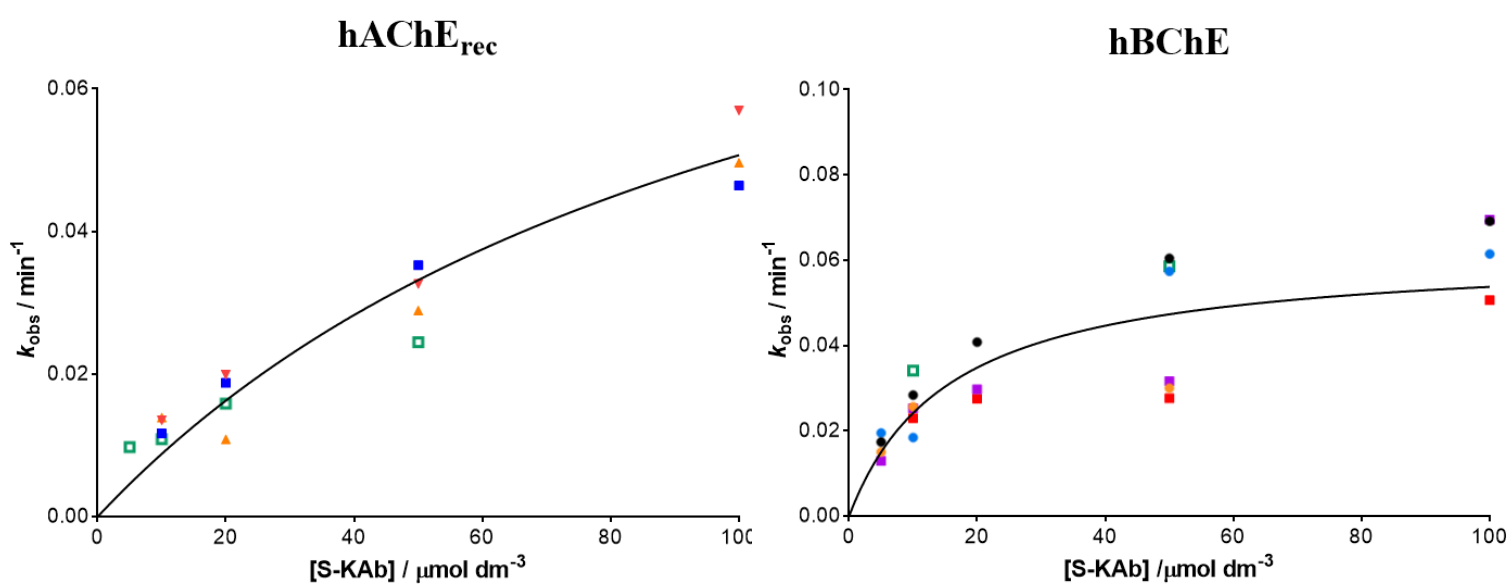


**Tablica 4.2.** Inhibicija ljudske AChE i BChE, eeAChE i hoBChE s racematom karbamata albuterola, (KAb). Konstante inhibicije prvog reda ( $k_{obs}$ ) enzima uz odgovarajuću koncentraciju karbamata albuterola, [I], izračunate su pomoću jednadžbe (2). Za konstante  $k_{obs}$  koje su dobivene iz više pokusa (n) prikazane su srednje vrijednosti pojedinačnih konstanti. Sveukupne konstante brzine inhibicije ( $k_i$ ) izračunate su pomoću jednadžbe (7).

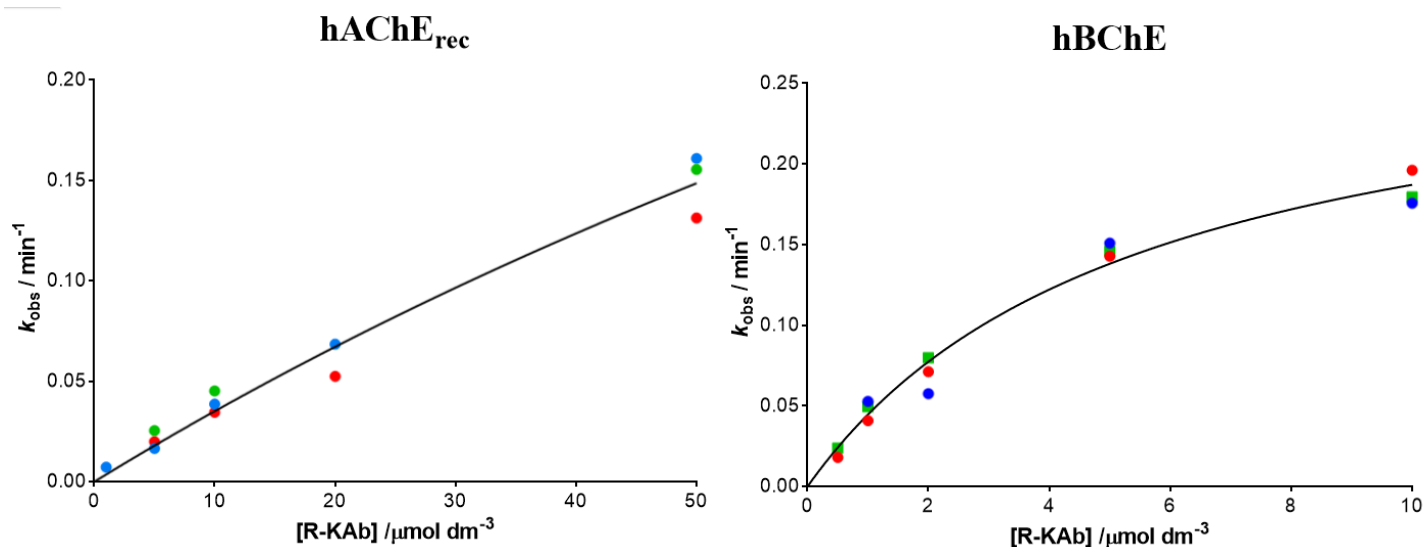
Enzim	[I] / $\mu\text{mol dm}^{-3}$	n	$k_{obs} / \text{min}^{-1}$	$k_i / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$
hAChE <sub>rec</sub>	2	2	0,0590	29500
	5	4	0,0488	9760
	10	4	0,109	10900
	15	3	0,205	13700
	20	1	0,207	10400
	25	2	0,305	12200
	30	2	0,425	14200
hBChE	0,2	1	0,0306	153000
	0,5	2	0,0706	141000
	1	2	0,129	129000
	2	2	0,223	112000
	3	2	0,376	125000
	4	1	0,468	117000
	5	2	0,550	110000
hoBChE	0,5	3	0,0175	35000
	1	2	0,0256	25600
	2	2	0,0979	48900
	3	2	0,189	63000
	4	3	0,248	62000
	5	4	0,337	67400
eeAChE	20	1	0,0252	1260
	50	2	0,0222	444
	100	2	0,0630	630
	200	2	0,0738	369
	300	2	0,120	400
	500	2	0,176	352
	700	3	0,247	353
	1000	4	0,429	429

#### 4.1.2. Inhibicija kolinesterazâ enantiomerima karbamata albuterola

Kod inhibicije ljudskih AChE i BChE enantiomerima karbamata albuterola (R-KAb i S-KAb) primjećuje se smanjenje konstanti prvog reda s povećanjem koncentracije inhibitora. Kod tih enzima i inhibitora uočena je inhibicija u nultom vremenu koja je iznosila do 54 % pri najvećim koncentracijama inhibitora. Ta inhibicija se pripisuje stvaranju reverzibilnog kompleksa enzima i karbamata albuterola. Stoga ovisnost konstante brzine inhibicije prvog reda o koncentraciji inhibitora nije bila linearna (slike 4.4. i 4.5) te su se mogle odrediti maksimalne konstante brzine inhibicije ( $k_{max}$ ) i konstante disocijacije enzim-inhibitor kompleksa ( $K_i$ ) pomoću jednadžbe (3), a vrijednosti  $k_i$  prema jednadžbi (5) (tablica 4.3.). Konstante inhibicije prvog reda ( $k_{obs}$ ) enzima uz odgovarajuću koncentraciju enantiomera karbamata albuterola, [I] prikazane su u tablici 4.4..



Slika 4.4. Sumarni grafovi nelinearne ovisnosti konstante inhibicije prvog reda ( $k_{obs}$ ) hAChE<sub>rec</sub> i hBChE o koncentraciji (*S*)-karbamata albuterola, (S-KAb). Svaki pokus je označen drugom bojom.



Slika 4.5. Sumarni grafovi nelinearne ovisnosti konstante inhibicije prvog reda ( $k_{\text{obs}}$ ) hAChE<sub>rec</sub> i hBChE o koncentraciji (*R*)-karbamata albuterola, (R-KAb). Svaki pokus je označen drugom bojom.

**Tablica 4.3.** Inhibicija ljudskih AChE i BChE s enantiomerima karbamata albuterola; R-KAb i S-KAb. Sveukupne konstante brzine inhibicije ( $k_i$ ) kolinesteraza s R-KAb i S-KAb izračunate su pomoću jednadžbe (5). Odgovarajuće maksimalne konstante brzine inhibicije ( $k_{\text{max}}$ ) te konstante disocijacije enzim-inhibitor kompleksa ( $K_i$ ) izračunate su pomoću jednadžbe (3).

		<b>(R)-</b>		
<b>Enzim</b>	$k_{\text{max}} / \text{min}^{-1}$	$K_i / \mu\text{mol dm}^{-3}$	$k_i / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$	
hAChE <sub>rec</sub>	$0,775 \pm 0,465$	$211 \pm 152,4$	$(3,67 \pm 3,45) \cdot 10^3$	
hBChE	$0,290 \pm 0,021$	$5,49 \pm 0,840$	$(52,8 \pm 8,94) \cdot 10^3$	
		<b>(S)-</b>		
<b>Enzim</b>	$k_{\text{max}} / \text{min}^{-1}$	$K_i / \mu\text{mol dm}^{-3}$	$k_i / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$	
hAChE <sub>rec</sub>	$0,107 \pm 0,023$	$112 \pm 37,76$	$(0,955 \pm 0,382) \cdot 10^3$	
hBChE	$0,0622 \pm 0,0069$	$15,72 \pm 5,35$	$(3,96 \pm 1,42) \cdot 10^3$	

**Tablica 4.4.** Inhibicija ljudske AChE i BChE s enantiomerima karbamata albuterola. Sveukupne konstante inhibicije prvog reda ( $k_{\text{obs}}$ ) enzima uz odgovarajuću koncentraciju karbamata albuterola, [I], izračunate su pomoću jednadžbe (2).

(R)-		
Enzim	[I]/ $\mu\text{mol dm}^{-3}$	$k_{\text{obs}} / \text{min}^{-1}$
hAChE <sub>rec</sub>	5	0,0199
	10	0,0346
	20	0,0525
	50	0,1313
hBChE	0,5	0,0238
	2	0,0797
	5	0,1459
	10	0,1795
(S)-		
Enzim	[I]/ $\mu\text{mol dm}^{-3}$	$k_{\text{obs}} / \text{min}^{-1}$
hAChE <sub>rec</sub>	10	0,0117
	20	0,0188
	50	0,0353
	100	0,0464
hBChE	5	0,0174
	20	0,0408
	50	0,0604
	100	0,0691

## 4.2. Rasprava

Karbamati reagiraju s AChE i BChE po mehanizmu analognom reakciji kolinesterazâ s esterima karboksilne kiseline koji su njeni supstrati, ali za razliku od izrazito brze hidrolize supstrata, hidroliza karbamata je spora reakcija te stoga karbamati djeluju kao inhibitori kolinesterazâ. Inhibicija AChE ili inhibicija AChE i BChE predstavlja do sada najučinkovitiji pristup tretmanu simptoma neurodegenerativnih poremećaja povezanih s kolinergičnom neurotransmisijom, a neki od lijekova koji se u tu svrhu koriste su karbamati. Međutim, novija istraživanja upućuju na BChE kao na novu metu u tretmanu takvih poremećaja te je sve veći broj istraživanja usmjerenih ka pronalaženju selektivnih inhibitora BChE. Karbamat albuterola je nosintetizirani spoj sintetiziran po uzoru na bambuterol, prolijevak kojeg serumska kolinesteraza hidrolizira u bronhodilatator terbutalin. Bambuterol je i vrlo selektivan inhibitor koji ljudsku BChE inhibira oko 20 000 puta, a mišju BChE oko 8600 puta brže od AChE.<sup>5,70,71</sup> Po uzoru na bambuterol, do sada su sintetizirani i karbamatni derivati bronhodilatatora metaproterenola i izoproterenola kao potencijalni selektivni inhibitori BChE.<sup>3</sup> Sinteza karbamata albuterola predstavlja nastavak istraživanja novih kandidata za lijekove strukturnim modificiranjem već postojećih lijekova kako bi se ili smanjili njihovi neželjeni učinci, povećala učinkovitost ili pronašao novi terapeutski učinak.

U ovom radu određen je inhibicijski potencijal nosintetiziranog karbamata albuterola prema ljudskim kolinesterazama i kolinesterazama izoliranima iz različitih vrsta. Mjerena je brzina inhibicije ljudske rekombinantne AChE i ljudske BChE, kao i brzina inhibicije AChE izolirane iz električnog organa jegulje te BChE izolirane iz seruma konja. Budući da je karbamat albuterola kiralni spoj, ispitivana je i stereoselektivnost ljudskih kolinesterazâ prema pojedinim enantiomerima.

#### 4.2.1. Inhibicijski potencijal karbamata albuterola

Karbamat albuterola progresivno inhibira sve ispitivane kolinesteraze s konstantama brzine inhibicije reda veličine  $10^3$ - $10^6$   $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$  što navedeni spoj čini brzim inhibitorom kolinesterazâ. Karbamat albuterola najbrže je inhibirao ljudsku BChE s konstantom brzine inhibicije  $109 \cdot 10^3 \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$ , dok je najsporija bila inhibicija eeAChE. Konstante brzine inhibicije ljudskih kolinesterazâ mogu se usporediti s onima za inhibiciju bambuterolom te karbamatima metaproterenola i izoproterenola kao spojevima koji se mogu smatrati strukturnim analogima ispitivanom karbamatu albuterola. Brzina inhibicije ljudske BChE karbamatom albuterola je 43, 20 odnosno 2 puta sporija od one bambuterolom, karbamatom metaproterenola i karbamatom izoproterenola, redom. Takav rezultat u skladu je sa zaključkom u Bosak i sur., 2012. da brzinu karbamilacije određuje raspored hidroksilnih skupina na benzenskom prstenu, pri čemu raspored skupina na benzenskom prstenu kakav je kod bambuterola i karbamata metaproterenola osigurava tim karbamatima geometriju u aktivnom mjestu BChE optimalnu za reakciju s aktivnim serinom. Tome u prilog govori i činjenica da je najmanja razlika u brzini inhibicije (samo dva puta) utvrđena između karbamata albuterola i karbamata izoproterenola koji su strukturno najbliži. Nadalje, karbamat albuterola se, u usporedbi s ostalim spomenutim karbamatima, pokazao najbržim inhibitorom ljudske AChE koju je inhibirao čak 60 puta brže od bambuterola, odnosno 5 puta brže od karbamata metaproterenola i karbamata izoproterenola.

#### 4.2.2. Selektivnost karbamilacije ljudskih kolinesterazâ

Selektivnost karbamata albuterola određena je iz omjera konstanti brzine inhibicije za BChE i AChE. Generalno uspoređujući, inhibicija BChE bila je 5-276 puta brža u odnosu na inhibiciju AChE što upućuje da je karbamat albuterola selektivni inhibitor BChE. Da je zaista riječ o selektivnom inhibitoru BChE potvrđuje odnos konstanti brzine inhibicije kolinesterazâ iz iste vrste. Naime, inhibicija ljudske BChE je 8 puta brža u usporedbi sa ljudskom AChE. Ako se selektivnost karbamata albuterola usporedi sa selektivnošću bambuterola, karbamata metaproterenola i karbamata izoproterenola, vidljivo je da selektivnost pada 2500, 120, odnosno 10 puta, redom. Za takav pad selektivnosti najvećim je djelom odgovorno povećanje brzine inhibicije AChE s karbamatom albuterola koje je opisano u prethodnom odlomku.

Ranije je pokazano da selektivnost karbamilacije bambuterolom, karbamatom metaproterenola i karbamata izoproterenola određuju povoljne interakcije s Gln124 u BChE koje ubrzavaju inhibiciju u odnosu na brzinu inhibicije AChE (w.t.).<sup>3</sup> U slučaju bambuterola ubrzanje karbamilacije BChE doprinosi i Ala337 iz kolinskog mjesta BChE, dok za ostala dva karbamata dominantan utjecaj ima Leu295 iz acilnog mjesta. Na temelju strukturne sličnosti navedenih karbamata s ispitivanim karbamatom, za očekivati je da navedene aminokiseline određuju i selektivnost ispitivanog karbamata albuterola.

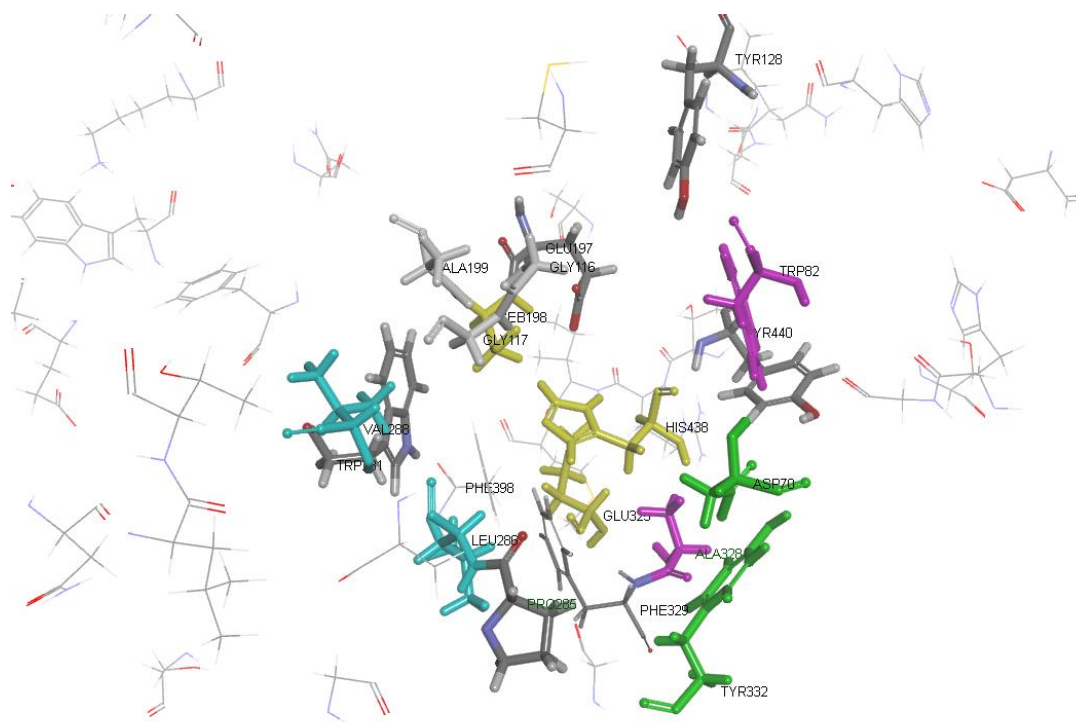
#### 4.2.3. Selektivnost karbamilacije kolinesterazâ drugih vrsta

Karbamat albuterola inhibirao je BChE konja oko dva puta sporije u usporedbi sa ljudskom BChE. Sličan trend pokazan je ranije za bambuterol koji je konjsku BChE inhibirao oko 25 puta sporije od ljudske.<sup>72</sup> Usporedba primarnih sljedova aminokiselina u ljudskoj i konjskoj BChE pokazala je da se ta dva proteina podudaraju u 90 % aminokiselinskog slijeda (slika 4.6.). Usporedba je također pokazala da se enzimi razlikuju u 57 aminokiselina, od kojih se samo Phe398 (slika 4.7.) nalazi u blizini aminokiselina za koje je pokazano da doprinose stabilizaciji prijelaznog stanja karbamata izoproterenola i ljudske BChE, Glu325 i Phe329, te može biti uzrokom pokazane razlike u brzini inhibicije.<sup>3</sup>

<a href="#">NP_001075319</a>	1	MQSWGTTICI RILLRFLLLW VLIGNSHTEE DIIITTKNGK VRGMNLPVLG GTVTAFLGIP YAQPPLGRLR FKKPQSLTKW	80
<a href="#">2PM8_A</a>		-----ED DIIITATKNGK VRGMQLTVFG GTVTAFLGIP YAQPPLGRLR FKKPQSLTKW	52
<a href="#">NP_001075319</a>	81	SNIWNATKYA NSCYQNTQS FPGFLGSEM NPNTELSEDC LYLNWVWIPAP KPNATVMIW IYGGGFQTGT SSLPVYDGKF	160
<a href="#">2PM8_A</a>	53	SDIWNATKYA NSCCQNTQS FPGFHGSEM NPNTDLSEDC LYLNWVWIPAP KPNATVLIW IYGGGFQTGT SSLHVDYDGKF	132
<a href="#">NP_001075319</a>	161	LARVERVIVV SMNYRVGALG FLALSENPEA PGNMGLFDQQ LALQWVQKNI AAFGGNPRSV TLFGESAGAA SVSLHLLSPR	240
<a href="#">2PM8_A</a>	133	LARVERVIVV SMNYRVGALG FLALPGNPEA PGNMGLFDQQ LALQWVQKNI AAFGGNPKSV TLFGESAGAA SVSLHLLSPG	212
<a href="#">NP_001075319</a>	241	SQPLFTRAIL QSGSSNAPWA VTSLYEARNR TLTAKRMGC SRDNETEMIK CLRDKDPQEI LLNEVFVVPY DTLSNINFGP	320
<a href="#">2PM8_A</a>	213	SLSLFTRAIL QSGSFNAPWA VTSLYEARNR TLNLAKLTGC SRENETEIIK CLRNKDPQEI LLNEAFVVPY GTPSNINFGP	292
<a href="#">NP_001075319</a>	321	TVDGDFLTDV PDLTLLQGGF KRTQILVGVN KDEGTFLV GAPGFSKDNV SIITRKEFQE GLKIFFPVRV EFGRESILFH	400
<a href="#">2PM8_A</a>	293	TVDGDFLTDV PDILLELGGF KKTQILVGVN KDEGTFLV GAPGFSKDNV SIITRKEFQE GLKIFFPGRV FGKESILFH	372
<a href="#">NP_001075319</a>	401	YMDWLDDQRA ENYREALDDV VGDYNIICPA LEFTKKFSEL GNDAFFYYFE HRSTKLPWPE WGMVMHGYEI EYVFGPLPLR	480
<a href="#">2PM8_A</a>	373	YTDWVDDQRP ENYREALGDV VGDYNFICPA LEFTKKFSEW GNNAFFYYFE HRSSKLPWPE WGMVMHGYEI EYVFGPLPLR	452
<a href="#">NP_001075319</a>	481	RVNYTKAEEI LRSRIMKRWA NFAKYGNPNG TQSNSTRWPV FKSTEQKYLT LNTESPKVYT KLRAQQCRFW TLFFPKVLEL	560
<a href="#">2PM8_A</a>	453	RDQYTKAEEI LRSRIVKRWA NFAKYGNPQE TQNQSTSWPV FKSTEQKYLT LNTESTRIMT KLRAQQCRFW TSFFPKVLEM	532
<a href="#">NP_001075319</a>	561	TGNIDEAERE WKAGFHRWNN YMMDWKNQFN DYTSKKESCS DF	602
<a href="#">2PM8_A</a>	533	TGNIDEAEWE WKAGFHRWNN YMMDWKNQFN DYTSKKESCV GL	574

Slika 4.6. Aminokiselinski slijed ljudske BChE<sup>73</sup> (NCBI proteina: NP 001075319) i BChE izolirane iz seruma konja.<sup>74</sup> Usporedba je načinjena korištenjem algoritma BasicLocalAlignmentSearch Tool<sup>75</sup> (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, pristup 07.02.2018.). Plava slova označavaju aminokiseline u kojima se BChE ljudi i konja razlikuju. Žutom bojom su označene aminokiseline koje se tvore periferno mjesto, zelenom kolinsko a plavom acilni džep. Zvezdicom su označene aminokiseline koje tvore katalitičku trijadu.



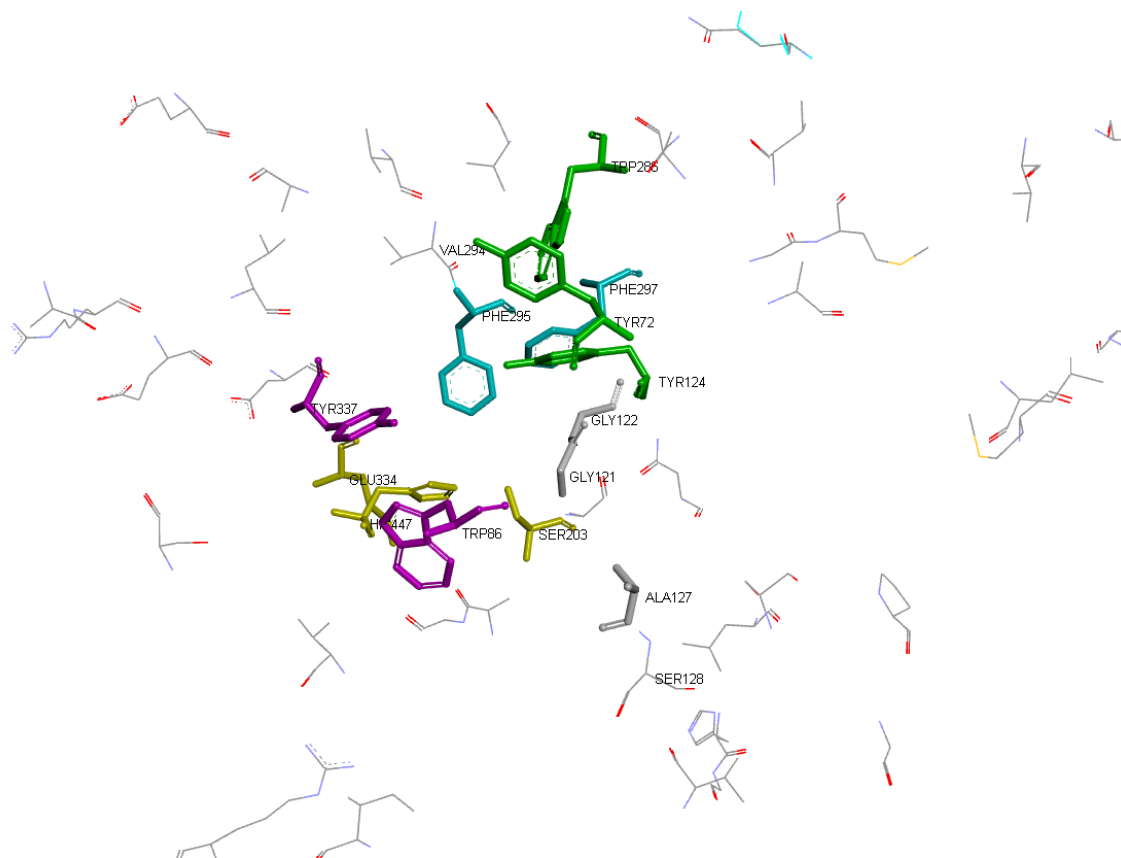


Slika 4.7. Aktivno mjesto ljudske BChE (PDB kod: 2PM8).<sup>74</sup> Žutom bojom označene su aminokiseline koje čine katalitičku trijadu, sivom aminokiseline oksianionske šupljine, plavom acilnog džepa, ružičastom kolinskog i zelenom perifernog katalitičkog mjesta. Ostale aminokiseline su one koje su u konjskoj BChE zamijenjene. Prikaz načinjen u BIOVIA Discovery studio programu.

Nadalje, pokazano je i da karbamat albuterola inhibira hAChE 34 puta brže u odnosu na eeAChE. Usporedba primarnih sljedova aminokiselina hAChE i eeAChE pokazala je da se proteini podudaraju u 89 % aminokiselinskog slijeda (slika 4.8.). Međutim, od 58 aminokiselina u kojima se hAChE i eeAChE razlikuju (slika 4.9.) samo dvije se nalaze u blizini aktivnog mjesta AChE, na položaju 294 i 127 za koje nije vjerojatno da mogu uzrokovati pokazanu razliku u afinitetu budući da zamijenjene aminokiseline pripadaju istim grupama aminokiselina. Stoga, u obzir treba uzeti sveukupne razlike koje vjerojatno utječu na promjenu tercijarne strukture samog proteina. Inhibicija eeAChE samo je dva puta brža od inhibicije hAChE bambuterolom<sup>70</sup>, dok je inhibicija hAChE karbamatima metaproterenola i izoproterenola bila 10 puta veća od one bambuterolom.<sup>3</sup>

<a href="#">AAH36813</a>	1	MRPPQCLLHT PSLASPLLLL LLWLLGGGVG AEGREDAELL VTVRGGRLRG IRLKTPGGPV SAFLGIPFAE PPMGPRRFLP	80
<a href="#">1C2B A</a>	1	-----	46
<a href="#">AAH36813</a>	81	PEPKQPWSGV VDATTFQSVC YQVDTLYPG FEGTEMNPN RELSEDCLYL NVWTPYPRPT SPTPVLWVIY GGGFSGASS	160
<a href="#">1C2B A</a>	47	PEPKRPWSGV LDATTFQNVV YQVDTLYPG FEGTEMNPN RELSEDCLYL NVWTPYPRPA SPTPVLWVIY GGGFSGAAS	126
<a href="#">AAH36813</a>	161	LDVYDGRFLV QAERTVLVSM NYRVGAFGFL ALPGSREAPG NVGLLDQRLA LQWVQENVAA FGGDPTSVTL FGESAGAASV	240
<a href="#">1C2B A</a>	127	LDVYDGRFLA QVEGAVLVSM NYRVGTFGFL ALPGSREAPG NVGLLDQRLA LQWVQENIAA FGGDPMSTL FGESAGAASV	206
<a href="#">AAH36813</a>	241	GMHLLSPPSR GLFHRAVLQS GAPNGPWATV GMGEARRRAT QLAHLVGCPP GGTGGNDEL VACLRTPAQ VLVNHEHVL	320
<a href="#">1C2B A</a>	207	GMHILSLPSR SLFHRAVLQS GTPNGPWATV SAGEARRRAT LLARLVGCPP GGAGGNDEL IACLRTPAQ DLVDHEHVL	286
<a href="#">AAH36813</a>	321	PQESVFRFSV VPVVDGDFLS DTPEALINAG DFHGLQVLVG VVKDEGSFL VYGAPGFSKD NESLISRAEF LAGVRIGVPQ	400
<a href="#">1C2B A</a>	287	PQESIFRFSV VPVVDGDFLS DTPEALINTG DFQDLQVLVG VVKDEGSFL VYGVPGFSKD NESLISRAQF LAGVRIGVPQ	366
<a href="#">AAH36813</a>	401	VSDLAEEAVV LHYTDWLHPE DPARLREALS DVVGDHNVVC PVAQLAGRLA AQQARVYAYV FEHRASLTSW PLWVGVPHG	480
<a href="#">1C2B A</a>	367	ASDLAEEAVV LHYTDWLHPE DPTHLRDAMS AVVGDHNVVC PVAQLAGRLA AQQARVYAYI FEHRASLTIW PLWVGVPHG	446
<a href="#">AAH36813</a>	481	EIEFIFGIPL DPSRNYTAE KIFAQRLMRY WANFARTGDP NEPRDPKAPQ WPPYTAGAQQ YVSLDL-----	546
<a href="#">1C2B A</a>	447	EIEFIFGLPL DPSLNYTTEE RIFAQRLMKY WTNFARTGDP NDRPDSKSPQ WPPYTAAQQ YVSLNLKPLE VRRGLRAQTC	526
<a href="#">AAH36813</a>	527	AFWNRFLPKL LSAT	540
<a href="#">1C2B A</a>			

Slika 4.8. Aminokiselinski slijed za ljudsku AChE<sup>76</sup> (NCBI proteina: AAH36813) i AChE izoliranu iz električne jegulje.<sup>77</sup> Usporedba je načinjena korištenjem algoritma BasicLocalAlignmentSearch Tool<sup>75</sup> (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, pristup 07.02.2018.). Plava slova označavaju aminokiseline u kojima se ljudska AChE i AChE iz električne jegulje razlikuju. Žutom bojom su označene aminokiseline koje se tvore periferno mjesto, zelenom kolinsko a plavom acilni džep. Zvezdicom su označene aminokiseline koje tvore katalitičku trijadu.



Slika 4.9. Aktivno mjesto ljudske AChE (PDB kod:4EY4).<sup>78</sup> Žutom bojom označene su aminokiseline koje čine katalitičku trijadu, sivom aminokiseline oksianionske šupljine, plavom acilnog džepa, ružičastom kolinskog i zelenom perifernog katalitičkog mjesta. Ostale aminokiseline su one koje su u eeAChE zamijenjene. Prikaz načinjen u BIOVIA Discovery studio programu.

#### 4.2.4. Stereoselektivnost ljudskih kolinesterazâ

Asimetrija aktivnog mjesta čini kolinesteraze stereoselektivnim enzimima što se očituje u njihovoj interakciji s kiralnim supstratima i inhibitorima.<sup>3,4,5,73</sup> Ispitivani karbamat albuterola je kiralna molekula kod koje je kiralni centar smješten na alkoholnom dijelu molekule, koji kod karbamilacije kolinesterazâ predstavlja izlaznu skupinu. Karbamilacija kolinesterazâ odvija se  $S_N2$  mehanizmom kojeg karakterizira visok stupanj stereoselektivnosti. Da bi se hidroliza odvijala tim mehanizmom, nukleofil mora reakcijskom centru prići sa strane suprotne izlaznoj skupini tako da su međudjelovanja između dolazećeg

nukleofila, izlazne skupine i karbonilnog kisika minimalna. U slučaju inhibicije kolinesterazâ karbamatima brzinu inhibicije, odnosno brzinu karbamilacije određuje ulazak inhibitora u aktivno mjesto kolinesterazâ i njegovo smještanje unutar aktivnog mjesta neposredno prije karbamilacije.

U radu je pokazano da obje ljudske kolinesteraze, AChE i BChE, pokazuju stereoselektivnost prema (*R*)-enantiomeru karbamata albuterola u odnosu na (*S*)-enantiomer. Veću stereoselektivnost pokazala je BChE s 13 puta većim afinitetom prema (*R*)-enantiomeru karbamata albuterola u odnosu na (*S*)-enantiomer, za razliku od AChE koja je prema (*R*)-enantiomeru pokazala 4 puta veći afinitet. Stereoselektivnost koju je pokazala AChE odgovara stereoselektivnosti ljudske AChE prema (*R*)-bambuterolu.<sup>70</sup>

Oba enzima pokazala su nelinearna ovisnost konstante brzine inhibicije prvog reda o koncentraciji karbamata što znači da interakcije u aktivnom mjestu enzima stabiliziraju Michaelisov tip kompleksa između ispitivanih karbamata i enzima što kao posljedicu ima sporiju brzinu karbamilacije. Nastajanje i stabilizacija Michaelisovog tipa kompleksa nije uočena kod karbamilacije racemata i njegova je brzina karbamilacije veća od brzine karbamilacije pojedinih enantiomera. Takav obrazac nije uočen kod inhibicije kolinesterazâ racemičnim i enantiomerno čistim bambuterolom.<sup>70</sup> Ovaj rezultat zahtjeva daljnju eksperimentalnu *in vitro* i *in silico* analizu i nije predmetom ovog diplomskog rada.

## § 5. ZAKLJUČAK

Karbamat albuterola je selektivni inhibitor kolinesteraza koji ljudsku BChE inhibira 8 puta brže od ljudske AChE.

Karbamat albuterola razlikuje kolinesteraze različitih vrsta, tako ljudsku BChE inhibira 1,7 puta brže od konjske BChE, dok ljudsku AChE inhibira 34 puta brže od AChE iz električne jegulje.

Ljudske BChE i AChE su stereoselektivni enzimi koji imaju 13, odnosno 4 puta veći afinitet prema (*R*)-karbamatu albuterola.

Inhibicijski potencijal karbamata albuterola, kao i njegova selektivnost prema ljudskoj BChE u odnosu na AChE, je manja od one sličnih karbamata (bambuterola, karbamata metaproterenola i karbamata izoproterenola) te kao takav ne predstavlja dobar strukturni predložak za daljnju modifikaciju strukture sa ciljem pronalaženja selektivnih inhibitora BChE.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AD	Alzheimerova bolest
AChE	acetilkolinesteraza
ATCh	acetilkolin
BChE	butirilkolinesteraza
DTNB	5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina
eeAChE	acetilkolinesteraza iz električne jegulje
EI	enzim-inhibitor kompleks
hAChErec	ljudska rekombinantna acetilkolinesteraza
hBChE	ljudska butirilkolinesteraza
hoBChE	konjska butirilkolinesteraza
KAb	karbamat albuterola
KAbrac	racemat karbamata albuterola
R-KAb	(R)-karbamat albuterola
S-KAb	(S)-karbamat albuterola

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. E. Giacobini, u E. Giacobini (ur.), *Butyrylcholinesterase, its function and inhibitors*, Martin Dunitz Ltd., London, 2003, str. 1-20.
2. M. Cygler, J. D. Schrag, J. L. Sussman, M. Harel, I. Silman, M. K. Gentry, B. P. Doctor, *Protein Sci.* **2** (1993) 366-382.
3. A. Bosak, I. Gazić-Smilović, G. Šinko, V. Vinković, Z. Kovarik, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 6716-6723.
4. A. Bosak, I. Primožič, M. Oršulić, S. Tomić, V. Simeon-Rudolf, *Croat. Chem. Acta* **78** (2005) 121-128.
5. A. Bosak, I. Gazić, V. Vinković, Z. Kovarik, *Arch. Biochem. Biophys.* **471** (2008) 72-76.
6. M. A. Kamal, X. Qu, Q. sheng Yu, D. Tweedie, H. W. Holloway, Y. Li, Y. Tan, N. H. Greig, *J. Neural. Transm.* **115** (2008) 889-898.
7. V. P. Whittaker, *Chem. Biol. Interact.* **187** (2010) 23-26.
8. Enzyme Nomenclature, Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes. San Diego (CA): Academic Press Inc.; 1992.
9. F. Nachon, P. Masson, Y. Nicolet, O. Lockridge, J. C. Fontecilla-Camps, *Comparison of structures of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase*. U: E. Giacobini, urednik, *Butyrylcholinesterase, its function and inhibitors*, Martin Dunitz Ltd., London, 2003, str. 39.

10. J. Massoulié, *Molecular forms and anchoring of acetylcholinesterases*. U: *Cholinesterases and cholinesterases inhibitors* (E. Giacobini, ur.), Martin Dunitz Ltd., London, 2000, str. 81-103.
11. G. Kryger, M. Harel, K. Giles, L. Toker, B. Velan, A. Lazar, C. Kronman, D. Barak, N. Ariel, A. Shafferman, I. Silman, J.L. Sussman, *Acta. Crystallogr. Sect. D* **56** (2000) 1385-1394.
12. Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, J. C. Fontecellia-Camps, F. Nachon, *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 41141-41147.
13. A. Bosak, M. Katalinić, Z. Kovarik, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **62** (2011) 175-189.
14. D. M. Quin, *Chem. Rev.* **78** (1987) 955-979.
15. P. Taylor, Z. Radić, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34** (1994) 281-320.
16. J. M. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 370.
17. O. Jbilo, C. F. Bartles, A. Chatonnet, J. P. Toutant, O. Lockridge, *Toxicol.* **32** (1994) 1445-1457.
18. O. Lockridge, P. Masson, *Neurotoxicology* **21** (2000) 113-126.
19. N. A. Çokuğras, *Turk. J. Biochem.* **28** (2003) 54-61.
20. M. M. Mesulam, A. Guillozet, P. Shaw, A. Levey, E. G. Duysen, O. Lockridge, *Neuroscience* **110** (2002) 627- 639.
21. S. Darvesh, D. A. Hopkins, C. Geula, *Nat. Rev. Neurosci.* **4** (2003) 131-138.
22. J. Saez-Valero, D. H. Small, *Brain Res.* **889** (2001) 247-250.



23. M. A. Fisher, *Use of cholinesterase inhibitors in the therapy of myasthenia gravis*. U: E. Giacobini, urednik. *Cholinesterasee and cholinesterase inhibitors*, Martin Dunitz Ltd., London, 2000, str. 249-262.
24. A. Chatonnet, O. Lockridge, *Biochem. J.* **260** (1989) 625-634
25. A. Saxena, Y. Ashani, L. Raveh, D. Stevenson, T. Patel, B. P. Doctor, *Mol. Pharmacol.* **53** (1998) 112-122.
26. D. Kolarich, A. Weber, M. Pabst, J. Stadlmann, W. Teschner, H. Ehrlich, H. P. Schwarz, F. Altmann, *Proteomics* **8** (2008) 254-263.
27. B. Holmstedt, u E. Giacobini (ur.), *Cholinesterase inhibitors: an introduction*, Martin Dunitz Ltd., London, 2000, str. 1-8.
28. *ESTHER Database* (pristup 18. prosinca 2017.)  
Dostupno na <http://bioweb.ensam.inra.fr/ESTHER/general?what=index>
29. M. Schumacher, S. Camp, Y. Maulet, M. Newton, K. MacPhee-Quigley, S. S. Taylor, T. Friedmann, T. Taylor, *Nature* **319** (1986) 407-409.
30. J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science* **253** (1991) 872-879.
31. P. Taylor, Z. Radic, N. A. Hosea, S. Camp, P. Marchot, H. A. Berman, *Toxicol. Lett.* **82-83** (1995) 453-458.
32. A. Saxena, A. M. G. Redman, X. Jiang, O. Lockridge, B. P. Docto, *Chem. Biol. Interact.* **119-120** (1999) 61-69.
33. A. Ordentlich, C. Kronman, D. Barak, D. Stein, N. Ariel, D. Marcus, B. Velan, A. Shafferman, *FEBS Lett.*, **334** (1993) 215-220.
34. G. Gibney, S. Camp, M. Dionne, K. MacPhee-Quigley, P. Taylor, *Proc. Nati. Acad. Sci.* **87** (1990) 7546- 7550.

35. M. Bajda, A. Więckowska, M. Hebda, N. Guzior, C. A. Sottriffer, B. Malawska, *Int. J. Mol. Sci.* **14** (2013) 5608-5632.
36. A. Shafferman, A. Ordentlich, D. Barak, D. Stein, N. Ariel, B. Velan, *Biochem. J.* **318** (1996) 833-840.
37. Z. Radić, N. A. Pickering, D. C. Vellom, S. Camp, P. Taylor, *Biochemistry* **32** (1993) 12074-12084.
38. Z. Radić, E. Reiner, P. Taylor, *Mol. Pharmacol.* **39** (1991) 98-104.
39. M. C. McGuire, C. P. Nogueira, C. F. Bartels, H. Lightstone, A. Hajra, A. F. Van der Speck, O. Lockridge B. N. La Du, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86** (1989) 953- 957.
40. P. Masson, M. T. Froment, C. F. Bartels, O. Lockridge, *Eur. J. Biochem.* **235** (1996) 36-48
41. E. Reiner, Z. Radić, u E. Giacobini (ur.), *Butyrylcholinesterase, its function and inhibitors*, Martin Dunitz Ltd., London, 2003, str. 103-120.
42. G. D. Fasman, W. A. Gilbert, *Trends Biochem.* **58** (1989) 89-92
43. E. Reiner, Z. Radić, u E. Giacobini (ur.), *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*, Martin Dunitz Ltd., London, 2000, str. 103-120.
44. E. Giacobini, u E. Giacobini (ur.), *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*, Martin Dunitz Ltd., London, 2000, str. 181-227.
45. J. Chambers, E. L. Patricia, *Organophosphates: Chemistry, Fate and Effects*, New York, Academic Press Inc. 1992
46. M. Jokanović, M. P. Stojiljković, *Eur. J. Pharmacol.* **553** (2006) 31-39.
47. M. Katalinić, G. Rusak, J. Domaćinović Barović, G. Šinko, D. Jelić, R. Antolović, Z. Kovarik, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 186-192.

48. E. Reiner, G. Šinko, M. Škrinjarić-Špoljarić, V. Simeon-Rudolf, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* **51** (2000) 13-18.
49. D. R. Ripoll, C. H. Faerman, J. L. Sussman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** (1993) 5128-5151.
50. A. Yoshida, A. G. Motulsky, *Am. J. Hum. Genet.* **21** (1969) 486-498.
51. C. Pope, S. Karanth, J. Liu, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **19** (2005) 433-436.
52. E. J. Lee, *Ann. Acad. Med. Singapore*, **26** (1997) 104-107.
53. C. H. Gunderson, C. R. Lehmann, F. R. Sidell, B. Jabbari, *Neurology* **42** (1992) 946-950.
54. I. Primožič, T. Hrenar, S. Tomić, Z. Mein, *J. Phys. Org. Chem.* **15** (2002) 608-614.
55. A. Shafferman, D. Barak, D. Stein, C. Kronman, B. Velan, N. H. Greig, A. Ordentlich, *Chem. Biol. Interact.* **175** (2008) 166-172.
56. D. Barak, A. Ordentlich, D. Stein, Q-S. Yu, N. H. Greig, A. Shafferman, *Biochem. J.* **417** (2009) 213-222.
57. M. L. Waite, *Australian Prescriber* **38** (2015) 60-63.
58. [www.nia.nih.gov](http://www.nia.nih.gov) (pristup 21. prosinca 2017.)
59. [www.dementia.hiim.hr](http://www.dementia.hiim.hr) (pristup 21. prosinca 2017.)
60. P. S. Aisen, J. Cummings, L. S. Schneider, *Cold Spring Harb. Perspect Med.* **2** (2012) 63-95.
61. A. Tasker, E. K. Perry, C. G. Ballard, *Expert Rev. Neurother.* **5** (2005) 101-106.
62. N. H. Greig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102** (2005) 17213-17218.

63. E. Giacobini, *Cholinesterases in human brain: the effect of cholinesterase inhibitors on Alzheimer's disease and related disorders*, u: *The Brain Cholinergic System in Health and Disease*, (E. Giacobini i G. Pepeu, ur.), Informa Helthcare, Abingdon, 2006 str. 235-264.
64. D. Karlsson, *Eur. J. Pharma. Sci.* **47** (2012) 190-205.
65. Q. Li, H. Yang, Y. Chen, H. Sun, *Eur. J. Med. Chem.* **26** (2017) 294-309.
66. J. Wu, Y. Tian, S. Wang, M. Pistolozzi, Y. Jin, T. Zhou, G. Roy, L. Xu, W. Tan, *Eur. J. Med. Chem.* **126** (2017) 61-71.
67. V. Simeon-Rudolf, R. T. Evans, *Acta. Pharm.* **51** (2001) 289-296.
68. G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres jr, R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.* **7** (1961) 88-95.
69. A. R. Main, *Science* **14** (1964) 92-93.
70. I. Gazić, A. Bosak, G. Šinko, V. Vinković, Z. Kovarik, *Anal. Bioanal. Chem.* **385** (2006) 1513-1519.
71. Z. Kovarik, Z. Radić, B. Grgas, M. Škrinjarić-Špoljar, E. Reiner, V. Simeon-Rudolf, *Biochemica et Biophysica Acta* **1433** (1999) 261-271.
72. Z. Kovarik, Z. Radić, H. A. Berman, V. Simeon-Rudolf, E. Reiner i P. Taylor, *Biochem. J.* **373** (2003) 33-40.
73. M. S. Hestand, T. S. Kalbfleisch, S. J. Coleman, Z. Zeng, J. Liu, J. N. Orlando, *Annotation of the Protein Coding Regions of the Equine Genome*, PLoS ONE 10 (6), E0124375 (2015).
74. M. N. Ngamelue., K. Homma, O. Lockridge, O. A. Asojo, *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **63** (2007) 723-727.
75. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (pristup 07. veljače 2018.).

- 
76. R. L. Strausberg et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99** (2002) 16899-16903.
77. Y. Bourne, J. Grassi, P. E. Bougis, P. Marchot, *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 30370-30376.
78. J. Cheung, M. J. Rudolph, F. Burshteyn, M. S. Cassidy, E. N. Gary, J. Love, M. C. Franklin, J. J. Height, *J. Med. Chem.* **55** (2012) 10282-10286.

## § 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Robert Kerep

Datum rođenja: 30. travnja 1993.

Mjesto rođenja: Našice

### Obrazovanje

2000-2008 Osnovna škola Augusta Harambašića, Donji Miholjac

2008-2012 Srednja škola Donji Miholjac, Opća gimnazija, Donji Miholjac

2012-2015 Preddiplomski studij kemije, Odjel za kemiju, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

2015-2018 Diplomski studij kemije; istraživački: biokemija i organska kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2016-2017 Otvoreni dani Kemijskog odsjeka