Određivanje antioksidacijske aktivnosti i inhibicijskog djelovanja vodenog ekstrakta gorke naranče (Citrus aurantium L.) na aktivnost acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze

Zenčić, Marijana

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:985427

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

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

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKIVNOSTI I INHIBICIJSKOG DJELOVANJA VODENOG EKSTRAKTA GORKE NARANČE (*Citrus aurantium* L.) NA AKTIVNOST ACETILKOLINESTERAZE I BUTIRILKOLINESTERAZE

ZAVRŠNI RAD

MARIJANA ZENČIĆ

Matični broj: 244

Split, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKIVNOSTI I INHIBICIJSKOG DJELOVANJA VODENOG EKSTRAKTA GORKE NARANČE (*Citrus aurantium* L.) NA AKTIVNOST ACETILKOLINESTERAZE I BUTIRILKOLINESTERAZE

ZAVRŠNI RAD

MARIJANA ZENČIĆ

Matični broj: 244

Split, rujan 2017.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

DETERMINATION OF ANTIOXIDATIVE ACTIVITY AND INHIBITION ACTIVITY OF WATER EXTRACT OF BITTER ORANGE (*Citrus aurantium* L.) ON THE ACETYLCHOLINESTERASE AND BUTYRYLCHOLINESTERASE

BACHELOR THESIS

MARIJANA ZENČIĆ

Parent number: 244

Split, September 2017

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

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

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

Mentor: doc. dr. sc. Mila Radan

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKIVNOSTI I INHIBICIJSKOG DJELOVANJA VODENOG EKSTRAKTA GORKE NARANČE (*Citrus aurantium* L.) NA AKTIVNOST ACETILKOLINESTERAZE I BUTIRILKOLINESTERAZE

Marijana Zenčić, 244

Sažetak: Alzheimerova bolest (AD) jedna je od najučestalijih degenerativnih bolesti mozga, te ju karakterizira oštećenje živčanih stanica i propadanje kognitivnih funkcija. Jedna od metoda za ublažavanje simptoma AD inhibicija je acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BuChE). U ovom radu kao potencijalni inhibitor koristio se vodeni ekstrakt gorke naranče (*Citrus aurantium* L.). Gorka naranča posjeduje protuupalna svojstva, te se stoga koristi u ljekovite svrhe. Također, poznato je da je uloga antioksidansa važna kod AD zbog obrambenog djelovanja čovjekovog organizma od štetnog djelovanja slobodnih radikala. Za sposobnost inhibicije AChE i BuChE korištena je modificirana spektrofotometrijska metoda po Ellmanu. Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da vodeni ekstrakt gorke naranče ne pokazuje dobru sposobnost inhibicije kolinesteraza. Korištene su različite koncentracije ekstrakta, najmanja je iznosila 1 mg mL^{-1}, a najveća 10 mg mL^{-1}. Za razliku od inhibicijske aktivnosti, kod antioksidacijske aktivnosti dobiveni su rezultati koji ukazuju kako se povećanjem koncentracije vodenog ekstrakta gorke naranče povećava postotak inhibicije DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala.

Ključne riječi: Alzheimerova bolest, gorka naranča, acetilkolinesteraza, butirilkolinesteraza, inhibicija, antioksidacija.
Rad sadrži: 38 stranica, 16 slika, 7 tablica, 30 literaturna navoda.
Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Franko Burčul - predsjednik
2. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić. - član
3. Doc. dr. sc. Mila Radan - član - mentor

Datum obrane: 27. rujna 2017.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

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

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

Mentor: Assist. Prof. Mila Radan, PhD

DETERMINATION OF ANTIOXIDATIVE ACTIVITY AND INHIBITION ACTIVITY OF WATER EXTRACT OF BITTER ORANGE (Citrus aurantium L.) ON THE ACETYLCHOLINESTERASE AND BUTYRYLCHOLINESTERASE

Marijana Zenčić, 244

Abstract:. Alzheimer's disease (AD) is one of the most common degenerative brain diseases and it is characterized by nerve cell damage and decline in cognitive abilities. One method for ameliorating the symptoms of AD is the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE). In this study, water extract of bitter orange (*Citrus aurantium*L.) was used as a potential inhibitor. Bitter orange contains many anti-inflammatory properties and it is used for medicinal purposes. Also, it is known that the role of antioxidant is important for AD because the human body uses them to defend itself from the damaging effects of free radicals. In this study, a modified spectrophotometric method by Ellman was used to assess the inhibitory ability of AChE and BuChE. The results have shown that water extract of bitter orange does not show an ability to inhibit cholinesterase. Different concentrations of the extract were used from 1 mg mL^{-1} to 10 mg mL^{-1}. In contrast to the inhibitory activity, the antioxidant activity results have proved that by increasing the concentration of the water extract of bitter orange, the percentage of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical inhibition also increases.

Keywords: Alzheimer’s disease, bitter orange, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, inhibition, antioxidation.
Thesis contains: 38 pages, 16 pictures, 7 tables, 30 literary references.
Original in: Croatian.

Defence committee:

1. Franko Burčul, PhD, assistant prof. - chair person
2. Ivana Generalić Mekinić, PhD, assistant prof. - member
3. Mila Radan, PhD, assistant prof. - supervisor

Defence date: September 27th, 2017.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed 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 doc. dr. sc. Mile Radan tijekom mjeseca travnja, 2017. godine.

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

Veliku zahvalnost, u prvom redu, dugujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Mili Radan koja mi je svojim stručnim savjetima pomogla pri izradi ovog rada, kao i na pruženom znanju i velikom razumijevanju tijekom školovanja.

Uz to, htjela bih se zahvaliti i doc.dr.sc. Franku Burčulu na savjetima i pomoći pri eksperimentalnom radu.

Posebnu zahvalnost iskazujem svojoj prijateljici Marini na velikoj pomoći i potpori tijekom izrade završnog rada.

I na kraju, najviše se zahvaljujem svojim roditeljima, kojima i posvećujem ovaj Završni rad. Hvala Vam na beskonačnom strpljenju, razumijevanju i ljubavi.

Marijana Zenčić

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Ispitati učinkovitost vodenog ekstrakta gorke naranče (*Citrus aurantium* L.) u inhibiciji acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BuChE) metodom po Ellmanu.
- Ispitati antioksidacijsku aktivnost vodenog ekstrakta gorke naranče (*Citrus aurantium* L.) pomoću DPPH metode.

SAŽETAK

Alzheimerova bolest (AD) jedna je od najučestalijih degenerativnih bolesti mozga, te ju karakterizira oštećenje živčanih stanica i propadanje kognitivnih funkcija. Jedna od metoda za ublažavanje simptoma AD inhibicija je acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BuChE). U ovom radu kao potencijalni inhibitor koristio se vodeni ekstrakt gorke naranče (*Citrus aurantium* L.).

Gorka naranča posjeduje protuupalna svojstva, te se stoga koristi u ljekovite svrhe. Također, poznato je da je uloga antioksidansa važna kod AD zbog obrambenog djelovanja čovjekovog organizma od štetnog djelovanja slobodnih radikala. Za sposobnost inhibicije AChE i BuChE korištena je modificirana spektrofotometrijska metoda po Ellmanu. Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da vodeni ekstrakt gorke naranče ne pokazuje sposobnost inhibicije kolinesteraza. Korištene su različite koncentracije ekstrakta, najmanja je iznosila 1 mg mL^{-1}, a najveća 10 mg mL^{-1}.

Za razliku od inhibicijske aktivnosti, kod antioksidacijske aktivnosti dobiveni su rezultati koji ukazuju kako se povećanjem koncentracije vodenog ekstrakta gorke naranče povećava postotak inhibicije DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikala.

SUMMARY

Alzheimer's disease is one of the most common degenerative brain diseases, and it is characterized by nerve cell damage and decline in cognitive abilities. One method for moderate the symptoms of AD is the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE). In this study, water extract of bitter orange (*Citrus aurantium* L.) was used as a potential inhibitor.

Bitter orange contains many anti-inflammatory properties, and it is used for medicinal purposes. Also, it is known that the role of antioxidant is important for curing AD because of the human body activity defense from the damaging effects of free radicals. In this study, a modified spectrophotometric method by Ellman was used for the inhibition ability of AChE and BuChE. The results have shown that water extract of bitter orange does not show a good ability to inhibit cholinesterase. There were different concentrations of the extract, the minimum amount was 1 mg mL^{-1}, and the largest 10 1 mg mL^{-1}.

In contrast to the inhibitory activity, the antioxidant activity results have proved that by increasing the concentration of the water extract of bitter orange, the percentage of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical can also be increased.

SADRŽAJ

UVOD ... 1

1. OPĆI DIO ... 2

1.1. AGRUMI (lat. Citrus) ... 2
1.1.1. Gorka naranča (Citrus aurantium L.) ... 2

1.2. Enzimi ... 4
1.2.1. Kolinesteraze ... 4

1.3. Acetilkolin ... 6
1.4. Acetilkolinesteraza ... 8
1.4.1. Struktura i mehanizam djelovanja acetilkolinesteraze ... 9

1.4.2. Inhibitori acetilkolinesteraze ... 11

1.5. Butirilkolinesteraza ... 11
1.5.1. Fiziološka i farmakološka uloga butirilkolinesteraze ... 12

1.5.2. Butirilkolinesteraza i patološka stanja ... 13

1.6. Alzheimerova bolest ... 13
1.6.1. Inhibitori acetilkolinesteraze u tretmanu Alzheimerove bolesti ... 17

1.7. Usporedba AChE i BuChE ... 19
1.8. Ekstrakcija ... 19
1.9. Liofilizacija ... 20
1.10. Spektrofotometrija ... 21
1.10.1. Ellmanova metoda ... 22

1.11. Oksidacijski stres i slobodni radikali ... 23
1.12. Antioksidansi i mehanizam djelovanja ... 24
1.12.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti vezivanjem radikala DPPH metodom ... 25

2. EKSPERIMENTALNI DIO ... 27

2.1. Biljni materijal ... 27
2.2. Ispitivanje sposobnosti inhibicije AChE metodom po Ellmanu ... 27
2.2.1. Priprema kemikalija ... 27

2.2.2. Postupak ... 28

2.3. Ispitivanje sposobnosti inhibicije BuChE metodom po Ellmanu ... 29
2.3.1. Priprema kemikalija ... 30

2.3.2. Postupak ... 30

2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom vezanja DPPH radikala ... 32
3. REZULTATI ... 33

3.1. Ispitivanje sposobnosti inhibicije AChE metodom po Ellmanu ... 33
3.2. Ispitivanje sposobnosti inhibicije BuChE metodom po Ellmanu ... 33
3.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom vezanja DPPH radikala ... 33
4. RASPRAVA ... 36

5. ZAKLJUČAK ... 37

6. LITERATURA ... 38

UVOD

Enzimi su biokatalizatori koji ubrzavaju metaboličke reakcije smanjujući energiju aktivacije kemijskih reakcija. Svi enzimi su većinom proteini, vrlo su specifični, te imaju veliku katalitičku snagu. Katalitička aktivnost enzima ovisi o kofaktorima, s kojima su povezani jačim ili slabijim vezama. Enzim bez kofaktora se naziva apoenzim, dok se katalitički aktivan enzim naziva holoenzim.

Enzimi acetilkolinesteraza (AChE) i butirilkolinesteraza (BuChE) pripadaju skupini kolinesteraza. AChE je hidrolaza koja razlaže molekule acetilkolina (ACh) na acetil i kolin pri prijenosu živčanih impulsa, dok BuChE može razlagati butirilkolin i acetilkolin. Za razliku od AChE koja se sintetizira u koštanoj srži, mišićima i mozgu, BuChE se sintetizira u jetri, te potom izlučuje u krv

Prema dosadašnjim istraživanjima, vidljivo je kako kod tretmana liječenja Alzheimerove bolesti (AD) bitnu ulogu imaju upravo kolinesteraze. Kod osoba oboljelih od Alzheimerovom bolesti (AD) djelovanje BuChE se povećava, dok djelovanje AChE ostaje nepromijenjeno ili se smanjuje. Obzirom da su za liječenje Alzheimerove bolesti (AD) potrebna inhibitori kolinesteraza, u ovom radu se kao potencijalni inhibitor AChE i BuChE koristio vodeni ekstrakt gorke naranče.

Gorka naranča (*Citrus aurantium* L) je voće koje je nastalo križanjem grejpfruta (*Citrus maxima,* Merr) i mandarine (*Citrus reticulate,*), te spada u porodicu rutvica (Rutacea). Od ljekovitih tvari gorka naranča sadrži eterično ulje i gorke tvari zbog čega pripada skupini aromatično gorkih ljekovitih biljaka, posjeduje jako protuupalno djelovanje i koristi se za liječenja problema probave i krvožilnog sustava.

Za ispitivanje sposobnosti inhibicije AChE i BuChE korištena je modificirana spektrofotometrijska metoda po Ellmanu koristeći DNTB kao tiolni reagens, dok je za određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenog ekstrakta gorke naranče korištena metoda vezanja DPPH radikala.

Antioksidansi su skupina različitih prirodnih spojeva koji štiti organizam od štetnog djelovanja slobodnih radikala. Čovjekov organizam može proizvoditi vlastite antioksidanse, dok se antioksidansi iz vanjskih izvora u organizam unose hranom.

1. OPĆI DIO

1.1. AGRUMI (lat. Citrus)

Agrumi su rod unutar porodice Rutaceae koji potječe iz tropske i suptropske jugoistočne Azije. Porodica Rutaceae, poznatija kao porodica citrusa ili ruta, najčešće je smještena u red sapindolikih (lat. Sapindales). Sapindolike su red cvjetnica dvosupnica koji broji 9 porodica, 460 rodova i 5700 vrsta. Biljke iz roda agruma uglavnom imaju cvjetove s 5 bijelih latica, brojnim prašnicima i odlikuje ih vrlo jaki miris. Vrste se razlikuju veličinom i oblikom, od bilja do grmlja i stabala visine od 5 do 15 metara. Ekonomski najvažniji je rod agruma (Citrus) koji uključuje naranču, limun, grejp i limetu. Plodovi roda agruma imaju intenzivan miris zbog flavonoida i limonoida, koji su zapravo terpeni. Također, sadrže limunsku kiselinu i velike količine vitamina C. [1,2]

Osim vitamina C, ovi plodovi su bogati mineralima i njihovim solima, te biljnim pigmentima iz skupine karotenoida koji predstavljaju molekule slične vitaminu A. Bijela, spužvasta ovojnica koja prekriva citrusne voćke, ugljikohidratnog je sastava i predstavlja biljna vlakna koja se u vodi tope i bubre. Ta se biljna vlakna nazivaju još i pektinska vlakna. Vanjska kora citrusnog voća je aromatična i sadrži mnogo biljnih žlijezda koje su prepune esencijalnim aromatičnim uljem.[3]

1.1.1. Gorka naranča (Citrus aurantium L.)

Uz slatku naranči, bergamotu i limun, gorka naranča jedan je od četiri agruma koje se upotrebljavaju u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Gorka naranča je voće koje je nastalo križanjem grejpfruta (*Citrus maxima,* Merr) i mandarine (*Citrus reticulata,* Blanco, 1837*).* Smatra se da je domovina gorke naranče područje Kine i sjeverne Indije. Prvi se put spominje prije više od 2000 godina u starim kineskim zapisima kao začin i lijek. Arapski trgovci donijeli su je u Siriju te se dalje raširila po Arabiji i sjevernoj Africi odakle je i donesena u Europu. Danas se naranča uzgaja na mediteranskom području, a dobro je poznata na cijelom teritoriju bivše Dubrovačke Republike gdje je bila neobilazni dio vrtova vila i okućnica plemenitaša, pomoraca, trgovaca i vlastelina. I danas ju nalazimo u parkovima južnog primorja (Dubrovnika, Korčule, Mljeta, Hvara, Visa). [4]

Stablo gorke naranče u prosjeku naraste do 10 metara visine. Listovi su čvrsti, tamnozelene boje, a cvjetovi bijeli i mirisni. Nakon cvatnje razvijaju se plodovi, žuto-narančaste bobe. Boba je plod s usplođem u kojem se, za razliku od, na primjer šljive, nalazi veći broj sjemenki. Mesnato usplođe razdijeljeno je na 9 do 14 kriški ispunjenih aromatičnim sokom koji sadrži 85 % vode. Usplođe sadrži 1 do 20 sjemenki pomoću kojih se biljka u prirodi sama razmnožava. Gorka naranča uzgaja se zbog primjene u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Upotrebljavaju se plodovi, listovi i cvjetovi. Plodovi bogati pektinima i aromom odličan su odabir za pripremu marmelada i za kandiranje. Destilacijom cvjetova gorke naranče dobiva se i poznato neroli eterično ulje koje je česta baza ženskih parfema.

Gorka naranča sadrži ljekovite tvari (eterično ulje i gorke tvari) zbog čega pripada skupini aromatično gorkih ljekovitih biljka. Zbog svoje sposobnosti da djeluje na razgrađivanje masnih stanica bila je sastavni dio prvih dijeta, a čajevi od lišća naranče posluživani su za smirenje.[4]



Slika 1. Gorka naranča (*Citrus aurantium* L.) [5]

1.2. Enzimi

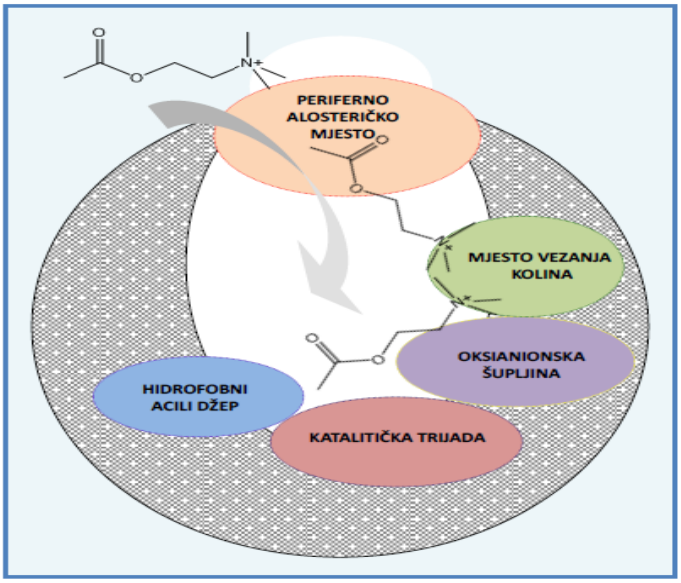
Enzimi su snažni i specifični biokatalizatori koji imaju ključnu ulogu u odvijanju metaboličkih reakcija. Najuočljivije značajke enzima su njihova specifičnost i katalitička moć. Kataliza se zbiva na specifičnom mjestu enzima, nazvanom aktivno mjesto. Imaju sposobnost specifičnog vezanja različitih molekula koristeći se svim vrstama međumolekulskih sila, dovodeći supstrate u optimalnu orijentaciju, što prethodi stvaranju ili kidanju kemijskih veza. Aktivnost mnogih enzima se može inhibirati vezanjem malih molekula i iona. Također, brojni lijekovi, a i otrovi su često inhibitori određenih enzima. Inhibicija enzimske aktivnosti glavni je kontrolni mehanizam u biološkim sustavima te pruža uvid u mehanizam djelovanja enzima.[6] Do danas je poznato i klasificirano oko 4000 enzima, te obzirom na njihov velik broj Međunarodna unija za biokemiju je 1961. godine preporučila nomenklaturu i klasifikaciju enzima prema kojoj se oni dijele u 6 klasa (obitelji) prema reakcijama koje kataliziraju i to u: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze, ligaze.[7]

1.2.1. Kolinesteraze

Enzimi iz skupine kolinesteraza rasprostranjeni su u biljnom i životinjskom svijetu te se intezivno istražuju zbog svojih važnih bioloških funkcija. Početkom tridesetih godina prošlog stoljeća prepoznata je uloga, tada se smatralo jednog enzima, u hidrolizi acetilkolina u uzorcima krvi kralježnjaka, prema čemu je taj enzim i nazvan kolinesteraza. Međutim, ubrzo je postalo jasno da se radi o dvije različite kolinesteraze, od kojih je jedna prisutna na eritrocitima, a druga u serumu te svaka pokazuje specifičnost prema određenim supstratima. Prema tome su i nazvane eritrocitna ili prava kolinesteraza te nespecifična ili pseudokolinesteraza. Temeljem daljnjih istraživanja, 1948. predloženo je da se nazovu aceto- i butiro- kolinesteraza, odnosno acetilkolinesteraza (AChE) i butirilkolinesteraza (BuChE).

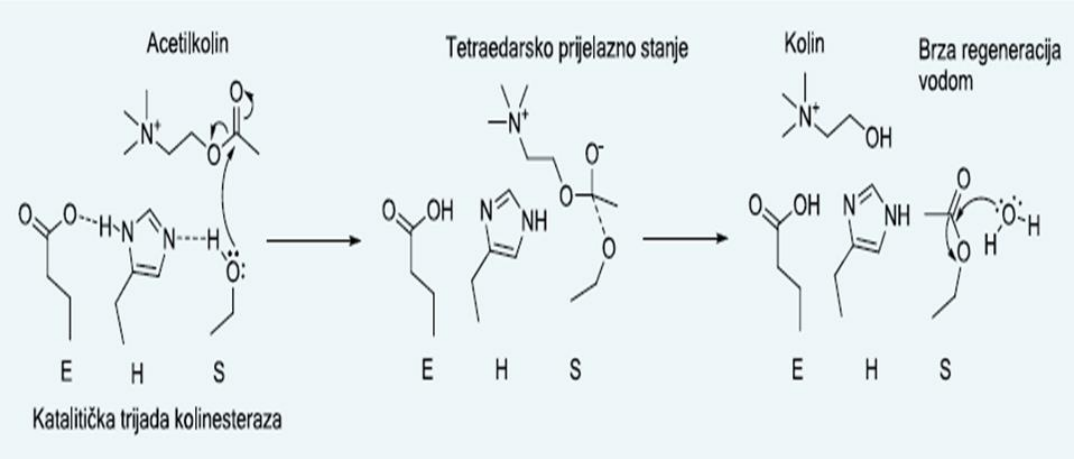
Prema enzimskoj nomenklaturi iz 1992. g. kolinesteraze se svrstavaju u skupinu hidrolaza, podskupinu esteraza i podskupinu hidrolaza estera karboksilnih kiselina. Kolinesteraze su klasificirane kao hidrolaze α/β strukture zbog toga što su građene od β-nabranih ploča okruženih α-uzvojnicama. [8]

Aktivno mjesto kolinesteraza sastoji se od pet strukturnih domena: hidrofobni acilni džep, estersko mjesto koje sadrži katalitičku trijadu, oksianionska šupljina, mjesto vezanja kolina, te periferno mjesto enzima koji se nalazi na samom kraju aktivnog mjesta. [8]



Slika 2. Shematski prikaz aktivnog mjesta kolinesteraza. [8]

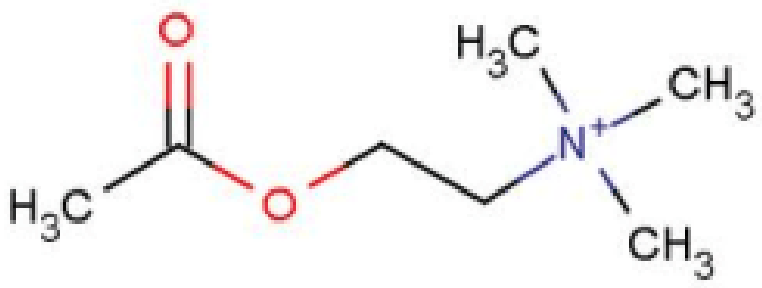
Iako postoje razlike u aminokiselinskoj građi pojedinih strukturnih domena aktivnog mjesta kolinesteraza, proces hidrolize supstrata je i dalje jednak te se odvija kroz tri koraka. Prvo nastaje reverzibilni kompleks između acetilkolina i katalitičkog serina, potom se formira tetraedarsko prijelazno stanje, nakon čega se acilna skupina supstrata prenosi na enzim što uvjetuje nastanjanje aciliranog enzima uz oslobađanje kolina. Slijedi deaciliranje aciliranog enzima odnosno regeneracije kolinesteraze vodom. Nukleofilnim napadom molekule vode na acilirani enzim nastaju drugi produkti, a to su octena kiselina i slobodna kolinesteraza.[8]



Slika 3. Mehanizam hidrolize supstrata kolinesteraza prikazan na primjeru hidrolize acetilkolina. [8]

1.3. Acetilkolin

Acetilkolin (eng. *acetylcholine,* ACh) je prvi otkriveni neuroprijenosnik koji se izlučuje u autonomnom živčanom sustavu, kao i u neuromišićnoj spojnici i brojnim sinapsama središnjeg živčanog sustava. Acetilkolinesteraza je enzim koji katalizira stvaranje acetilkolina u kolinergičnim neuronima iz kolina i acetilkoenzima A (acetil-CoA).[7]

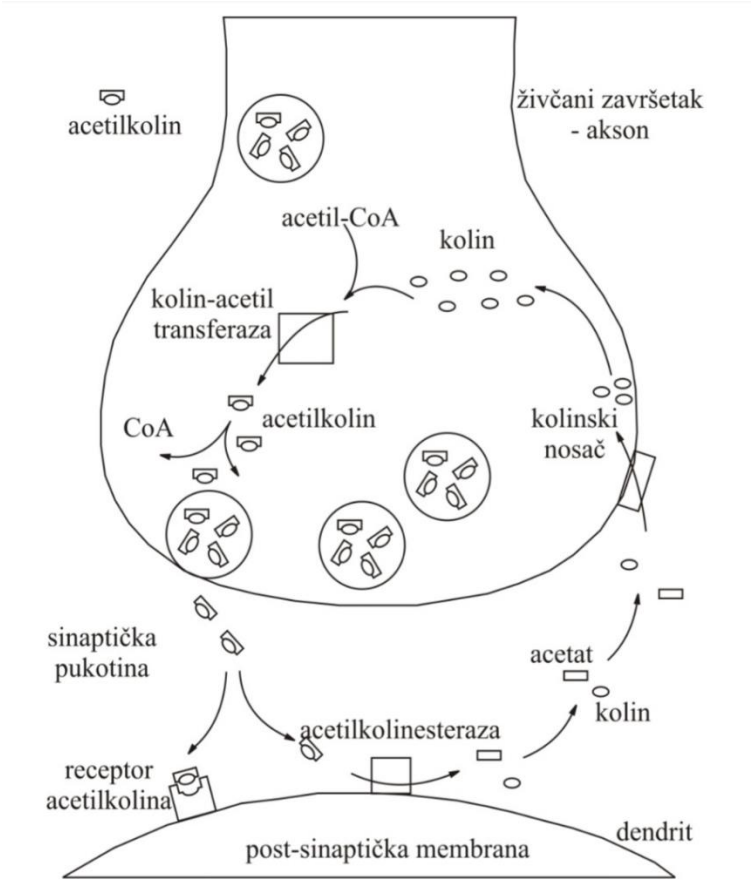


Slika 4. Kemijska struktura acetilkolina [9]

Acetilkolin djeluje na način da pobuđuje prijenos signala među neuronima kao i do samih stanica mišića. Razlikujemo dva tipa receptora za ACh: muskarinski i nikotinski. Muskarinski receptori su većinom povezani s perifernim živčanim sustavom i srčanim mišićima, a vezanje ACh na njih rezultira stimulacijom parasimpatičkog živčanog sustava koji potom uzrokuje smanjenje otkucaja srca i krvnog tlaka, poticanje

probave, sužavanje bronha, povećanje peristaltike crijeva itd. Nikotinske receptore nalazimo u središnjem živčanom sustavu kao i na membrani postsinaptičkih neurona. U središnjem živčanom sustavu njihova se stimulacija povezuje s kognitivnim procesima i pamćenjem, dok kod mišića kostiju uzrokuje njihovu konstrukciju.

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



Slika 5. Shematski prikaz kolinergične sinapse i kružnog ciklusa acetilkolina [7]

Kako se acetilkolin uklanja razgradnjom, a ne difuzijom iz sinaptičke pukotine, njegovom hidrolizom acetilkolinesteraza (AChE) kontrolira prijenos živčanih impulsa u kolinergičkoj sinapsi središnjeg i perifernog živčanog sustava. Dolazak živčanog impulsa uzrokuje otpuštanje acetilkolina iz sinaptičkog mjehurića predsinaptičke membrane u sinaptičku pukotinu gdje se potom veže na kolinergične receptore,

nikotinski i muskarinski, koji su vezani na postsinaptičku membranu kolinergičke sinapse ili mišićne stanice. Vezanjem acetilkolina pokreće se mnogo procesa koji rezultiraju depolarizacijom membrane i daljnjim prijenosom signala tj. živčanog impulsa. Razgradnja acetilkolina, djelovanjem AChE, u sinaptičkoj pukotini je brza te s ponovno uspostavlja polarizacija postsinaptičke membrane i prijenos impulsa prestaje.

1.4. Acetilkolinesteraza

Acetilkolinesteraza (eng. *acetylcholinesterase*, AChE) je enzim koji pripada klasi hidrolaza, podklasi serinskih esteraza i skupini hidrolaza karboksilnih kiselina. Fiziološka uloga AChE je hidroliza neuroprijenosnika acetilkolina na acetat i kolin tijekom prijenosa živčanih impulsa, čime se omogućava normalan prijenos signala u živčanim i živčano-mišićnim sinapsama. Sintetizira se u koštanoj srži, mozgu i mišićima. Nalazimo ju u krvi gdje je vezana na eritrocite. [10]



Slika 6. Trodimenzionalna struktura AChE [11]

AChE je od velike važnosti za očuvanje homeostaze organizma pošto je njezin fiziološki supstrat, ACh, jedan od prijenosnika živčanog impulsa. Prema brzini acetilkolina, AChE je jedan od najučinkovitijih enzima u prirodi. Za ljudsku AChE konstanta brzine hidrolize acetilkolina, k_{cat} (okretni broj) iznosi oko 400 000 min^{-1} te je njegova hidroliza strogo ograničena samo brzinom njegove difuzije u aktivno mjesto enzima.[10] Osim ključne esterazne aktivnosti, posjeduje i peptidaznu aktivnost koja se

povezuje s razvojem i napredovanjem Alzheimerove bolesti te arilachilamidaznu aktivnost čija fiziološka uloga još uvijek nije razjašnjena.

1.4.1. Struktura i mehanizam djelovanja acetilkolinesteraze

Osnovnu strukturu AChE čine 12 β-nabranih ploča okruženih s 14 α-uzvojnica. Struktura AChE u sisavaca vrlo je slična strukturi enzima električne jegulje (*Torpedo californica*, TcAChE) pa se većina *in vitro* istraživanja odvija na istraživanjima tog modela. [8]

Hidroliza acetilkolina odvija se na dnu aktivnog mjesta. Mehanizam se sastoji od tri koraka koji obuhvaćaju; nastajanje Michaelisovog kompleksa, aciliranje enzima i njegovo deaciliranje vodom. Prvo se acetilkolin veže na alosteričko mjesto nakon čega dolazi do prijenosa acilne skupine acetilkolina na serin u aktivnom mjestu gdje se oslobođa kolin. Acilirani međuprodukt se hidrolizira uz oslobođenje enzima i octene kiseline. [8]

Aktivno mjesto je 20 Å dugačko i 5 Å široko ždrijelo ili grlo (udubina).
Četiri podregije aktivnog mjesta koje sudjeluju u hidrolizi su:

- periferno mjesto smješteno na rubu ždrijela
- anionsko mjesto (mjesto vezanja kolina ili hidrofobno mjesto)
- esterazno mjesto (katalitičko mjesto, katalitička trijada s oksianionskom šupljinom)
- acilni "džep" (odgovoran za smještanje acilnog dijela supstrata). [8]

U tablici 1. prikazana je i opisana uloga pojedinih domena.

Tablica 1. Uloga strukturnih domena aktivnog mjesta acetilkolinesteraze[7]

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

1.4.2. Inhibitori acetilkolinesteraze

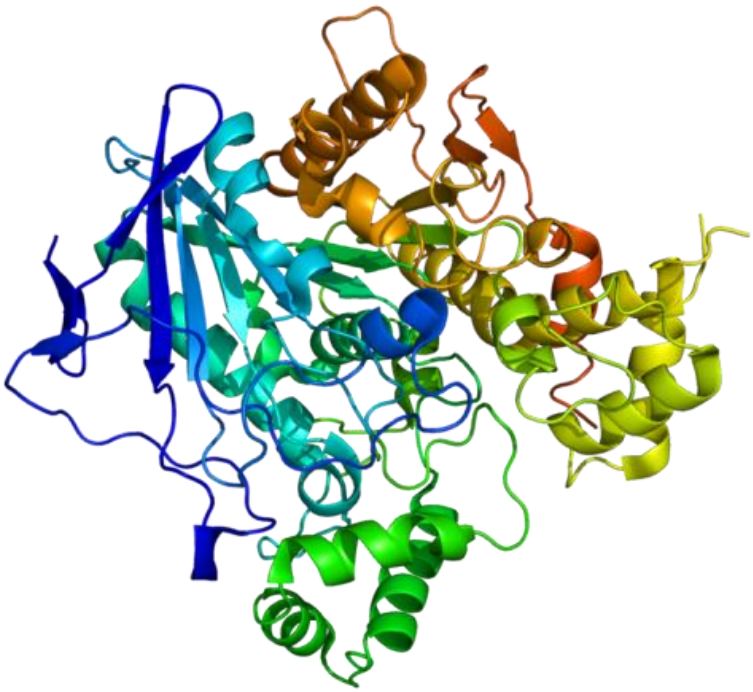
Inhibicijom aktivnosti AChE dolazi do nakupljanja acetilkolina i poremećaja u prijenosu živčanih impulsa što dovodi do kolinergične krize. Popratni simptomi kolinergične krize uključuju mučnine, salivaciju, paralizu dišnog sustava i kao krajnji ishod smrt organizma. Postoje dvije vrste inhibicije s obzirom na vezanje spojeva nekovalentnim (reverzibilna inhibicija) ili kovalentnim interakcijama za serin katalitičke trijade (ireverzibilna ili progresivna inhibicija).

- Reverzibilni inhibitori su većinom prirodnog podrijetla, izolirani iz biljaka, kao npr. alkaloidi (huperzin A, solanin, solanidin) i flavonoidi (galangin). Osim njih proučavaju se i druge klase spojeva kao što su: ksantoni, kumarini, terpeni i njihovi derivati te ostali. Uključenost enzima u patologiju mnogih bolesti kao što su miastenija gravis, Alzheimerova i Parkinsonova bolest potaknule su razvoj sintetskih inhibitora. Neki od tih reverzibilnih inhibitora AChE su: donepezil (Aricept) i takrin (Cognex). Reverzibilni inhibitori vežu se ili u aktivno mjesto ili na periferno mjesto enzima ili istodobno na oba mjesta.[10]
- Ireverzibilni inhibitori djeluju tako da se kovalentno vežu na serin katalitičke trijade. U ireverzibilne inhibitore AChE ubrajaju se karbamati i organofosforni spojevi. Prvi takav poznati inhibitor bio je karbamat fizostigmin, a koristi se u terapiji miastenije gravis, Alzheimerove bolesti, liječenju glaukoma. Sinteza ireverzibilnih inhibitora razvijena je u svrhu upotrebe ovih spojeva kao lijekova i pesticida. Nije zanemariva ni njihova primjena u obliku neurotoksičnih bojnih otrova (organofosforni spojevi: tabun, soman, sarin) te kod tradicionalnih obrednih ubojstava ili mučenja (u nekim dijelovima svijeta). Medicinska primjena podrazumijeva korištenje inhibitora AChE kako bi se ublažio nedostatak ACh.[10]

1.5. Butirilkolinesteraza

Butirilkolinesteraza (eng. *butyrylcholinesterase*, BuChE) je enzim koji se sintetizira u jetri i nakon toga se izlučuje u krv. Pripada skupini kolinesteraza odnosno esteraza. Esteraze spadaju u grupu hidrolaza. One cijepaju estere na kiseline i alkohol kemijskom reakcijom koju nazivamo hidroliza. Postoji širok raspon različitih esteraza koje se razlikuju po svojem specifičnom supstratu, proteinskoj strukturi te njihovoj

biološkoj funkciji. Osim u plazmi i u jetri aktivnost enzima dokazana je i u drugim tkivima, poput masnog tkiva, tankog crijeva, pluća i bijele tvari mozga.[12]



Slika 7. Struktura butirilkolinesteraze [13]

1.5.1. Fiziološka i farmakološka uloga butirilkolinesteraze

Fiziološka uloga butirilkolinesteraze nije potpuno razjašnjena. Pretpostavlja se da sudjeluje u metabolizmu lipoproteina i lipida te u hidrolizi butirilkolina, intermedijarnog metabolita koji nastaje tijekom metabolizma ne-esterificiranih masnih kiselina u jetri. Također, sudjeluje i u prijenosu spore živčane provodljivosti, dok u sinapsama u središnjem živčanom sustavu razgrađuje acetilkolin.[14] Acetilkolin (ACh) je neuroprijenosnik neuromišićne sinapse i preganglijskih simpatičkih te preganglijskih i postganglijskih parasimpatičkih aksona. Predstavlja posebnu vrstu neuroprijenosnika koji nije aminokiselina, te koji nije izravno sintetiziran iz aminokiseline. U središnjem živčanom sustavu acetilkolin ima važnu ulogu u održavanju pažnje i kognitivnih procesa, primjerice učenja i pamćenja. U perifernom živčanom sustavu acetilkolin izaziva proširenje krvnih žila, kontrakciju mišića, suženje zjenice, pojačano lučenje

žlijezda znojnica, pojačavanje peristaltike crijeva, usporavanje rada srca, slinovnica te želučanih i bronhalnih žlijezda. [15]

BuChE sadrži važnu farmakološku i toksikološku funkciju, hidrolizira farmakološke pripravke koji u svojoj strukturi sadrže estere, uključujući niz estera kolina, među kojima su acetilkolin, butirilkolin i propioniltiokolin. BuChE sudjeluje u metabolizmu kokaina, heroina, sukcinilkolina, te lijekova sličnih acetilsalicilnoj kiselini i mnogo brže hidrolizira butirilkolin, za razliku od AChE koja najbrže hidrolizira acetilkolin.[16]

1.5.2. Butirilkolinesteraza i patološka stanja

BuChE ima važnu ulogu u metabolizmu lipida i lipoproteina i često se istražuje njezina povezanost s metaboličkim sindromom. Potvrđena je pozitivna korelacija između katalitičke aktivnosti BuChE i serumskih koncentracija triglicerida. ukupnog kolesterola i LDL kolesterola u pacijenata s hipertenzijom, pretilih pacijenata, kao i u pacijenata s hiperkolesterolemijom.

Također, postoji pozitivna korelacija između aktivnosti plazmatske BuChE i tjelesne mase, koncentracije ukupnog i LDL 7 kolesterola, te triacilglicerola, a negativna između aktivnosti navedenog enzima i plazmatske koncentracije HDL-a.[17]

Osim svoje uloge u metabolizmu lipida, promjene BuChE vidljive su i kod bolesnika koji imaju različite neoplazme, poput karcinoma pluća i novotvorine stanica hematopoetskog sustava. Smanjena aktivnost BuChE prisutna je kod bolesnika s malignim tumorima želuca, prostate i debelog crijeva.

Danas je poznato da su BuChE i AChE povezane s patogenezom i progresijom Alzheimerove bolesti. BuChE i AChE su ciljno mjesto djelovanja lijekova koji inhibiraju njihovu katalitičku aktivnost i stoga se koriste za liječenje Alzheimerove bolesti.[18]

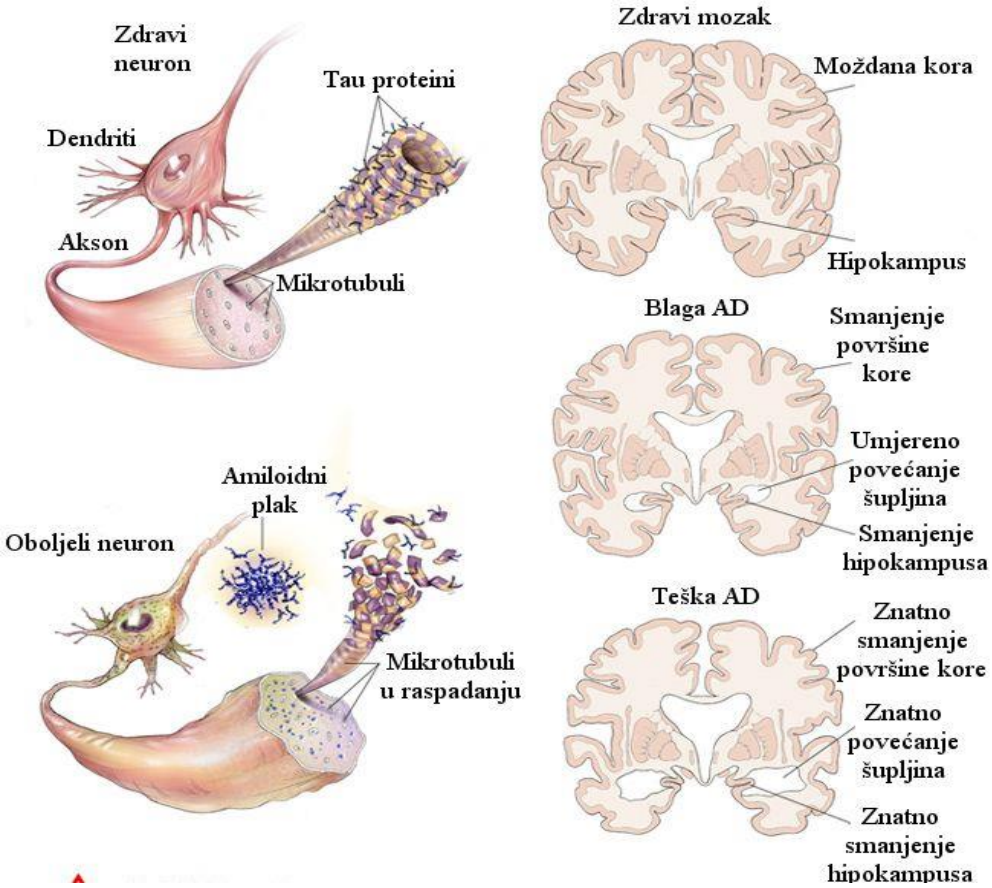
1.6. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer's disease*, AD) najučestaliji je oblik demencije za koju nema poznatog lijeka. Niz različitih čimbenika rizika Alzheimerove bolesti sastoji se od ozljede mozga, niskih mentalnih sposobnosti u ranijoj životnoj

dobi, vaskularnih bolesti, ateroskleroze, pušenja, gojaznosti i dijabetesa. Još uvijek nije razjašnjeno mogu li sve te bolesti stvarno uzrokovati bolest ili samo pridonose njezinom nastanku. Dr. Alois Alzheimer opisao je prvi slučaj bolesti po kojem je i dobila naziv Alzheimerova bolest (AD). Predstavlja najučestaliji oblik demencije i čini oko 60% svih slučajeva demencije. Prevalencija demencija manja je od 1% u osoba starih do 65 godina, te se postotak povećava sa starošću, tako da u populacijama Zapada kod ljudi starijih od 85 godina raste na 24% i 33%. Procijenjeno je kako trenutno u svijetu oko 26 milijuna ljudi ima Alzheimerovu bolest, te je bolest dvostruko češća kod žena u odnosu na muškarce, djelomično zato što žene imaju očekivano dulji životni vijek. [19]

Alzheimerova bolest uključuje nasljedne i sporadične oblike bolesti. Nasljedna AD prenosi se na autosomno dominantan način, a prvi simptomi javljaju se prije 65. godine starosti, zbog toga se ovaj oblik bolesti još naziva rani oblik. Sporadični oblik AD javlja se nakon 65. godine života te se još naziva kasni oblik AD. Za razliku od nasljednog oblika Alzheimerove bolesti koji je vrlo rijedak, ovaj oblik AD je najčešći. [19]

Kako Alzheimerovu bolest karakterizira smanjena aktivnost AChE, a u višim koncentracijama u mozgu je prisutna i BChE, boljim omjerom inhibicije AChE i BChE mogla bi se postići veća uspješnost u lječenju bolesti. Nadalje, selektivni reverzibilni inhibitori BChE odnosno AChE, primjenjuju se u dijagnostici za određivanje aktivnosti pojedinih kolinesteraza u uzorcima krvi ili tkiva. Oba enzima osim ključne esterazne aktivnosti posjeduju i peptidaznu aktivnost koja se povezuje s razvojem i napredovanjem Alzheimerove bolesti. Zatim, kod usporedbe pacijenata oboljelih od AD u odnosu na zdravu osobu enzimi potrebni za sintezu i razgradnju acetilkolina sniženi su za 30%. Pokazalo se da je u AD serotoninergički sustav značajno oštećen te je smanjen broj nikotinskih i presinaptičkih muskarinskih receptora. [10]



Slika 8. Usporedni prikaz razlika mozga zdrave osobe i osobe oboljele od Alzheimerove bolesti. [20]

Glavne teorije koje se odnose na primarni uzrok bolesti su:

- kolinergična (propadanje kolinergičnih neurona i smanjenje sinteze ACh)
- hipoteza amiloidne kaskade (nakupljanje amiloid-β-peptida (Aβ) i taloženje u obliku plakova
- τ-hipoteza (nastanak τ-snopića ili petlji)
- oksidacijski stres i dr [7]

Tablica 2. Hipoteze koje se odnose na uzrok AD[7]

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

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

- sprječavanje nastanka Aβ pomoću inhibitora γ- i β-sekretaza
- uklanjanje Aβ pasivnom i aktivnom imunizacijom

- intravenskim imunoglobulinima
- terapije temeljene na τ-proteinu.

1.6.1. Inhibitori acetilkolinesteraze u tretmanu Alzheimerove bolesti

Kolinergična hipoteza se temelji na prepostavci da povečanje koncentracije acetilkolina uz inhibiciju AChE može ublažiti simptome AD. Tako su takrin, donepezil, rivastigmin i galantamin inhibitori AChE odobreni za kliničku upotrebu kod tretiranja AD. [21]

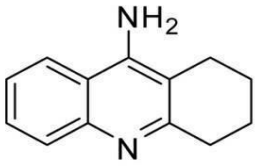
❖ Takrin- akridinski spoj, reverzibilni inhibitor i AChE i BuChE. Bio je prvi lijek u terapiji AD, danas se ograničeno koristi zbog izrazite hepatotoksičnosti.

❖ Donepezil- piperidinski spoj, reverzibilni inhibitor AChE. Donedavno glavni lijek za tretman AD, nije štetan za jetra, ali uzrokuje slične simptome kao i takrin: mučninu, povraćanje, umor, anoreksiju itd.

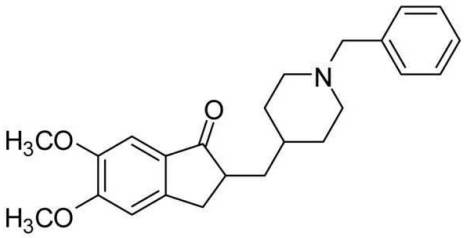
❖ Rivastigmin- selektivni inhibitor, inhibira i AChE i BuChE u dijelovima mozga s najvećim kolinergičnim deficitom kod AD pacijenata. Nuspojave su: mučnina i povraćanje.

❖ Galantamin- alkaloid izoliran iz biljnih vrsta Galanthus, inhibira acetilkolinesterazu i butirilkolinesterazu pokazuje jaku in vitro AChE inhibitornu aktivnost, lijek je za rane faze AD. Karakteristike: dugo djelovanje, selektivnost, reverzibilnost i kompetitivnost prema AChE. [21]

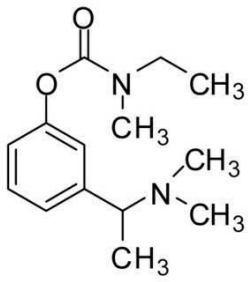
No istraživanja su pokazala i da pojedine biljne vrste kao što su: damašćanska crnjika, crni kumin, različite vrste kadulja, čajevca i druge posjeduju inhibicijsku aktivnost prema AChE te bi se mogle primjenjivati za tretiranje AD.



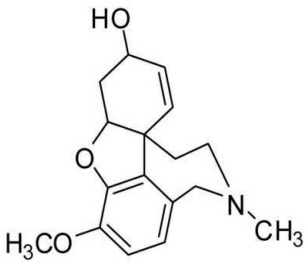
takrin



donepezil



rivastigmin



galantamin

Slika 9. Inhibitori AChE. [22]

1.7. Usporedba AChE i BuChE

Budući da je fiziološki supstrat AChE, acetilkolin, jedan od prijenosnika živčanih impulsa, ona ima bitnu ulogu u održavanju homeostaze organizma. Za razliku od supstrata AChE, BuChE je specifičnija za butirilkolin, te može razgraditi i acetilkolin i propionilkolin. Uz suvišak acetilkolina aktivira se butirilkolinesteraza, dok se acetilkolinesteraza inhibira. AChE se većinom nalazi u mozgu, mišićima i membranama eritrocita, za razliku od BuChE koji se većinom nalazi u srcu, bubrezima, jetri crijevima i plućima. [7]

Kao što je već spomenuto, BuChE sudjeluje u metabolizmu lipida i lipoproteina, u razdvajanju i rastu živčanog tkiva, te je primijećena i njegova pojačana ekspresija kod Alzheimerove bolesti, no njegova uloga na području patologije još uvijek nije potpuno jasna. Također, BuChE aktivira bambuterol i heroin i deaktivira sukcinildikolin, aspirin, kokain i amitriptilin koji predstavljaju važne farmakološke spojeve.[7]

1.8. Ekstrakcija

Ekstrakcija je jedna od metoda za pročišćavanje i izolaciju neke tvari iz otopine, suspenzije, emulzije ili krute smjese pomoću drugog otapala koje se s otopinom ne miješa. Bilo da se radi o ekstrakciji iz tekuće (*ekstrakcija tekuće-tekuće*) ili iz čvrste faze (*ekstrakcija čvrsto-tekuće*), organsko otapalo koje se primjenjuje za ekstrakciju treba zadovoljiti sljedeće uvjete [23]:

- otapalo mora biti kemijski inertno prema prisutnim tvarima
- tvar koju ekstrahiramo mora imati što bolju topljivost u tom otapalu
- otopina iz koje ekstrahiramo željenu tvar i otapalo moraju se što više razlikovati u gustoći
- otapalo ne smije imati previsoko vrelište kako bi se nakon ekstrakcije moglo lako uklonitiotapalo mora biti što manje zapaljivo i otrovno te jeftino. [23]

Fenomen ekstrakcije temelji se na različitoj topljivosti tvari koju želimo izdvojiti iz otopine i primjesa koje prate tvar, u dva otapala koja se ne miješaju. Pri tom dolazi do razdjeljenja tvari između dva otapala. Najčešće su to voda (odnosno vodena

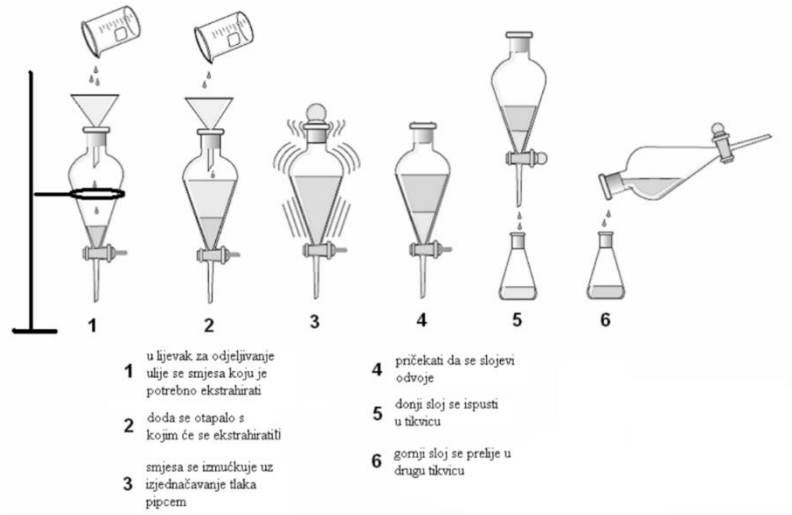
otopina tvari) i neko organsko otapalo koje se ne miješa s vodom (diklormetan, dietil-eter, kloroform, etil-acetat). Ekstrakcija je opisana Nernstovim zakonom razdjeljenja [23]:

$$K = c_1 / c_2 \qquad (1)$$

K je koeficijent razdjeljenja

c_1, c_2 su ravnotežne koncentracije (množinske ili masene) tvari u dva otapala.

Brojnik se odnosi na otapalo manje gustoće, a nazivnik na otapalo veće gustoće. Koeficijent razdjeljenja K jednak je omjeru topljivosti tvari u oba otapala, konstantan je pri određenoj temperaturi i ovisi o prirodi tvari. Učinak ekstrakcije je bolji ako se postupak ponovi više puta, odnosno ako se ekstrakcija provede više puta s manjom količinom otapala nego jedanput upotrebom cijele količine otapala. Nepisano pravilo ekstrakcije kaže da se ekstrakcija ponavlja tri puta.[23]



Slika 10. Koraci pri izvođenju ekstrakcije [23]

1.9. Liofilizacija

Liofilizacija je postupak dehidratacije koji osigurava očuvanje organoleptičkih svojstava mnogih namirnica koje sadrže aromatična svojstva. Postupak liofilizacije temelji se na uklanjanju vode iz prethodno smrznutog proizvoda procesom sublimacije leda pod djelovanjem topline pri odgovarajućem podtlaku. Također, ovim postupkom dolazi do očuvanja gubitaka topljivih sastojaka (šećera, kiselina, mineralnih

soli, aminokiselina itd.) prema površini proizvoda. Tim postupkom prekinuto je stvaranje krute površinske kore koja usporava proces dehidratacije. [24]

Prednosti liofiliziranih proizvoda su:

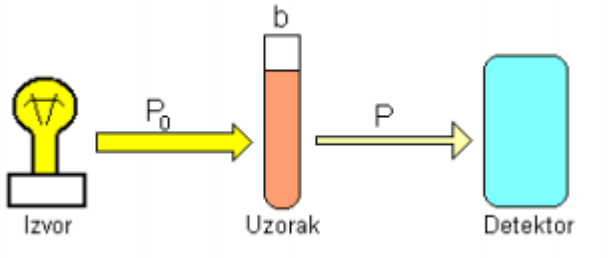
- velika trajnost
- održavanje strukture i vanjskog oblika
- dobra topivost proizvoda
- dobra rehidratacija
- neznatne promjene boje, arome i okusa
- minimalan gubitak vitamina

Struktura zamrznutog proizvoda ima važnu ulogu u provedbi liofilizacije, te je najvažniji čimbenik način na koji je postignuta temperatura proizvoda tijekom procesa zamrzavanja. [25]

Stabilizacija proizvoda postiže se njegovim pothlađivanjem. Daljnjim zagrijavanjem do temperature eutektikuma postignuta struktura proizvoda ostaje ista, te je provođenje sublimacije moguće pri višim temperaturama. Procesom sublimacije uklanja se slobodna voda, a zagrijavanjem već zaleđenog proizvoda dolazi do prelaska kristala leda u plinovito stanje. Pri ovom agregatnom prijelazu dolazi do postupnog dehidriranja zamrznutog proizvoda s minimalnom promjenom oblika. Tijekom čitavog stupnja sublimacije proizvod mora ostati zamrznut, pa se zbog toga održava konstantno niska temperatura koja je posljedica ravnoteže između količine dovedene topline i topline potrebne za sublimaciju. [25]

1.10. Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je tehnika kojom se mjeri apsorpcija emitiranog elektromagnetskog zračenja ukoliko se određeni uzorak podvrgne zračenju. Uređaj za mjerenje količine apsorbiranog zračenja naziva se spektrofotometar.[26]



Slika11. Prigušivanje snopa zračenja kao rezultat apsorpcije u otopini. [20]

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

$$T = P / P_0 \qquad (2)$$

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

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

$$A = \log (P_0 / P) \qquad (3)$$

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

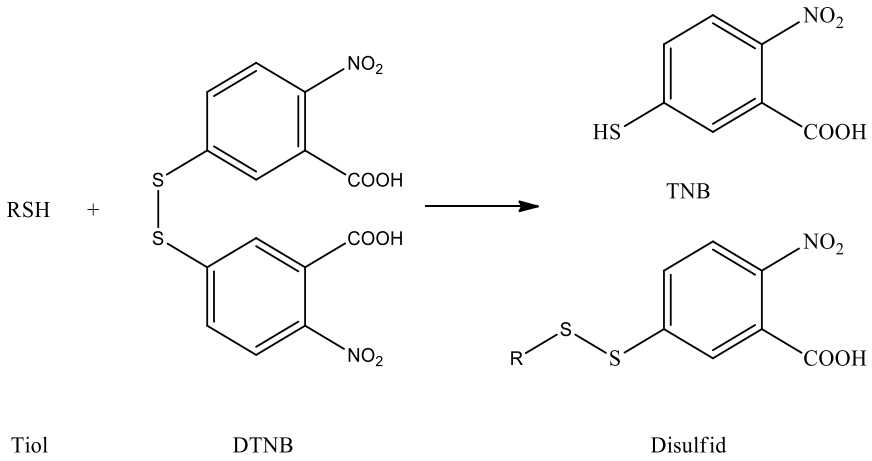
$$A = \log (P_0 / P) = abc \qquad (4)$$

gdje je *a* apsorptivnost (apsorpcijski koeficijent), *b* duljina puta zračenja kroz uzorak, a *c* koncentracija apsorbirajuće vrste.[26]

1.10.1. Ellmanova metoda

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

Ellmanova metoda je spektrofotometrijska metoda koja služi za mjerenje aktivnosti kolinesteraza pri čemu rabi tiokolinske supstrate. Ellmanov reagens (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina ili DTNB) se koristi za određivanje broja ili koncentracije tiolnih skupina u uzorku. Tioli reagiraju s DTNB-om i tom reakcijom nastaje 2-nitro-5-merkaptobenzojeva kiselina (TNB), koja zatim u vodi ionizira u TNB^- anion kod neutralnog ili alkalnog pH. Oslobođeni TNB^- ion ima intenzivno žutu boju. Apsorpcijski maksimum DTNB-a je pri valnoj duljini od 320 nm, dok se količina oslobođenog TNB^- mjeri pri duljini od 412 nm.[27]



Slika 12. Ellmanova reakcija za određivanje tiola. [27]

1.11. Oksidacijski stres i slobodni radikali

Oksidacijski stres definira se kao pomak ravnoteže u staničnim oksidativno-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Riječ je o stanju prekomjernog stvaranja slobodnih radikala kisika pri čemu dolazi do gubitka ravnoteže stvaranja slobodnih radikala i mogućnosti neke stanice da ih razgradi, a rezultira promjenama vezanim uz oštećenje stanica. Oksidacijsko oštećenje može utjecati na strukturu i funkciju brojnih biomolekula (polinezasićenih lipida, ugljikohidrata, proteina i nukleinskih kiselina), što konačno rezultira promjenama u strukturi i funkciji stanica, tkiva i organa. Tako nastala oštećenja mogu narušiti homeostazu iona, prijenos signala u stanici, gensku transkripciju i dovesti do drugih poremećaja.

Slobodni radikal je vrsta međuspoja kemijske reakcije u kojoj puca veza na dva dijela, molekule koje tako nastanu sadrže po jedan elektron preuzet iz kemijske veze. Vrlo se reaktivni zbog čega brzo nestaju i vrlo se lako spajaju s drugim molekulama ili se razlažu na neki drugi radikal i stabilnu molekulu. Po redoslijedu opadajućeg prioriteta pri odabiru i imenovanju glavne karakteristične skupine, radikali su prvi po redu razredni spojevi. [28]

Budući da su to nestabilni spojevi oni reagiraju s najbližom stabilnom molekulom. Na taj se način destabilizira dotad stabilna molekula i ona postaje slobodni radikal, a reakcija postaje lančana, što rezultira stvaranjem sve većeg broja slobodnih radikala koji oštećuju stanice organizma. Potrebno je unositi antioksidanse da bi se organizam obranio.[28]

ROS (engl. *reactive oxygen species)* su reaktivne kisikove vrste odnosno spojevi kisika koji imaju nespareni elektron viška u svojoj strukturi i nastaju u organizmu svakodnevno tijekom fizioloških procesa, ali mogu nastati i zbog vanjskih čimbenika. [28]

1.12. Antioksidansi i mehanizam djelovanja

Antioksidansi su tvari koje prisutne u maloj količini sprječavaju ili odlažu proces oksidacije slobodnih radikala. To je skupina različitih prirodnih spojeva koji štite organizam čovjeka od štetnog djelovanja slobodnih radikala.[29] Dva su izvora antioksidansa. Prvi je naš vlastiti organizam koji proizvodi vlastite antioksidanse (endogeni), a drugi vanjski izvor antioksidansa je hrana (egzogeni). U endogene antioksidanse ubrajamo antioksidacijske enzime superoksid-dismutazu (SOD), katalazu i glutation-peroksidazu. Danas je poznato da je uloga antioksidansa važna kod mnogih bolesti, osobito degenerativnih (Alzheimerova, Parkinsonova), a također i kod usporavanja procesa starenja i produljenja vitalnosti. Nadalje, što se više antioksidansa unosi i proizvodi, to je bolja osnova za organizam kada se suočava sa slobodnim radikalima u stanju bolesti, zagađenja okoliša te akutnim ili kroničnim unosom toksina iz okoliša.

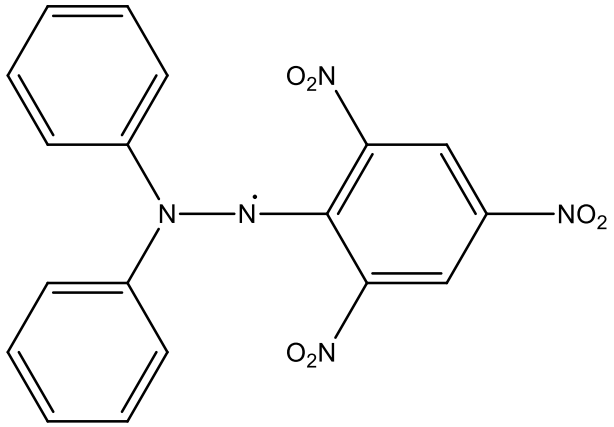
Antioksidansi imaju veliku primjenu u raznim granama industrije, a posebno u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj industriji, medicini, proizvodnji plastičnih masa i gume i dr.

Razlikuju se dva glavna mehanizma kojima se opisuje djelovanje antioksidansa. Prvi mehanizam se temelji na prekidanju lančane reakcije nastajanja slobodnih radikala u procesima autooksidacije. Antioksidanse koji djeluju ovim mehanizmom zovu se primarni antioksidansi. Oni djeluju tako da predaju radikal vodika peroksil- i alkoksil- radikalima nastalim u fazi propagacije lančane reakcije. [29]

Drugi mehanizam uključuje vezivanje slobodnih radikala koji iniciraju lančanu reakciju. To se može postići na više načina: keliranjem iona metala koji djeluju kao katalizatori; uklanjanjem kisika iz sustava regeneracijom primarnog antioksidansa te deaktiviranjem vrsta s visokim sadržajem energije. Antioksidansi koji djeluju ovim mehanizmom zovu se sekundarni ili preventivni antioksidansi. [29]

1.12.1. Određivanje antioksidacijske aktivnosti vezivanjem radikala DPPH metodom

Metoda hvatanja slobodnih 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala *(*engl. *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl,* DPPH*)* jedna je od najstarijih indirektnih metoda koja se temelji na sposobnosti ekstrakta da smanji aktivnost DPPH·, a reakcija se prati promjenom apsorbancije pri valnoj duljini od 517 nm. To je najčešća metoda kojom se određuje sposobnost hvatanja slobodnih radikala.



Slika 13. DPPH radikal [30]

Metoda se zasniva na redukciji alkoholne otopine DPPH· u prisutnosti antioksidansa ili radikala pri čemu dolazi do tvorbe neradikalnog oblika DPPH (DPPH-H).

DPPH apsorbira pri valnoj duljini od 517 nm. Njegovom reakcijom dolazi do smanjenja apsorbancije. Smanjenje apsorbancije proporcionalno je aktivnosti zadanog antioksidansa.[17] Iz mjerenih vrijednosti apsorbancije računa se postotak redukcije DPPH· prema formuli:

$$\%\ \text{redukcije}\ DPPH\bullet = (A_K - A_A/A_K)\ x\ 100 \quad (5)$$

gdje je A_A apsorbancija otopine s dodanim antioksidansom izmjerena nakon jednog sata, a A_K je apsorbancija čiste otopine.

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Biljni materijal

Gorka naranča, koja je korištena u ovom radu sakupljena je u siječnju 2017. god. na području Manuša, Split. Iscijeđeni sok gorke naranče podvrgnut je ekstrakciji s vodenim otapalom u svrhu dobivanja vodenog ekstakta. Potom je vodeni ekstrakt gorke naranče odnesen na postupak liofilizacije u svrhu uklanjanja viška vode bez gubitka topljivih sastojaka (kiselina, šećera, mineralnih soli, aminokiselina itd.). Pripravljene su određene koncentracije vodenog ekstrakta gorke naranče koje su korištene za određivanje inhibicijskog djelovanja na AChE i BuChE, te određivanje antioksidacijske aktivnosti.

2.2. Ispitivanje sposobnosti inhibicije AChE metodom po Ellmanu

U ovom radu korišten je enzim acetilkolinesteraza (AChE) izoliran iz elektrofora električne jegulje (Tip V-S). Kao supstrat enzima korišten je acetitiolkolin jodid (ATChI), a ispitivani uzorak je vodeni ekstrakt gorke naranče različitih koncentracija. Za ispitivanje sposobnosti inhibicije AChE korištena je modificirana spektrofotometrijska metoda po Ellmanu, kod koje je kao tiolni reagens korišten DTNB.

2.2.1. Priprema kemikalija

Za potrebe mjerenja pripremljene su sljedeće otopine :

- fosfatni pufer 0,1 M, pH=7 i pH=8
- enzim AChE je otopljen u puferu pH=8
- otopina supstrata (ATChI), koncentracija u sustavu: 0,5 mM
- DTNB je otopljen u puferu pH=7 + 0,12 mM $NaHCO_3$, konačne koncentracije 0,3 mM
- otopine uzoraka (inhibitora) gorke naranče u destiliranoj vodi koncentracija 1mg mL^{-1}, 2 mg mL^{-1}, 4 mg mL^{-1}, 5 mg mL^{-1} i 10 mg mL^{-1}

2.2.2. Postupak

U svakoj jažici reakcijska smjesa sadrži:

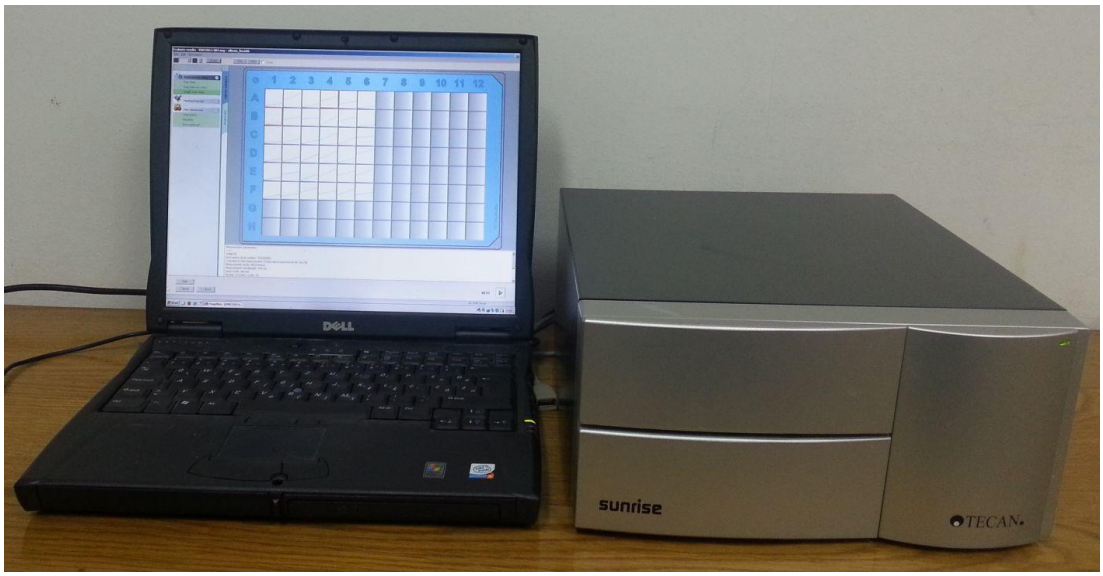
- 180 µL 0,1 mol L^{-1} fosfatnog pufera pH=8
- 10 µL 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzojeve kiseline)–DTNB, čija koncentracija iznosi 0,3 mmol L^{-1} (početna otopina pripremljena u 0,1 mol L^{-1} fosfatnom puferu pH=7 s dodatkom 0,12 mol L^{-1} natrij-bikarbonata radi stabilnosti DTNB-a)
- 10 µL acetilkolinesteraze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

Tablica 3. Shema otopina u eksperimentu

	Kontrola	**BL1**	**BL2**	**Uzorak M**	**Uzorak BL**
Pufer	180	190	190	180	190
DTNB	10	10	10	10	10
Uzorak/destilirana voda	0/10	0/10	0/10	10/0	10/0
AChE	10	/	10	10	/
ATChI	10	10	/	10	10

Uzorci se otpipetiraju u jažice, prema shemi iz tablice 3, s tim da se supstrat, acetiltiokolin (ATChI), dodaje neposredno prije početka mjerenja jer s njime započinje reakcija. Ne-enzimska hidroliza praćena je tzv. "blank" mjerenjima, odnosno slijepim probama. U jednoj slijepoj probi izostavljena je AChE, a u drugoj ATChI koji se zamijeni jednakim volumenom pufera.

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



Slika 14. Višekanalni čitač mikrotitarskih pločica "Sunrise

Sposobnost inhibicije enzima računaju se prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije AChE} = [(A_K - A_A / A_K)] \times 100 \qquad (5)$$

gdje je:

A_K – apsorbancija test otopine,

A_A – apsorbancija kontrolnog uzorka.

2.3. Ispitivanje sposobnosti inhibicije BuChE metodom po Ellmanu

Kao izvor enzima korištena je butirilkolinesteraza (BuChE) iz seruma konja, a kao supstrat enzima korišten je butiriltiokolin jodid (BuTChI). Kao inhibitor enzima korišten je uzorak vodenog ekstrakta gorke naranče različitih koncentracija. Za ispitivanje sposobnosti inhibicije BuChE korištena je modificirana spektrofotometrijska metoda po Ellmanu koristeći DTNB kao tiolni reagens.

2.3.1. Priprema kemikalija

Za potrebe mjerenja pripremljene su sljedeće otopine:

- fosfatni pufer (0,1 M; pH=7 i pH=8)
- enzim BuChE otopljen u puferu pH=8
- otopine supstrata (BTChI); DTNB otopljen u puferu pH=7 + 0,12 mM $NaHCO_3$
- otopine uzoraka (inhibitora) gorke naranče u destiliranoj vodi koncentracija 1 mg mL^{-1}, 2 mg mL^{-1}, 4 mg mL^{-1}, 5 mg mL^{-1} i 10 mg mL^{-1}

2.3.2. Postupak

U svakoj jažici reakcijska smjesa sadrži:

- 180 µL 0,1 mol L^{-1} fosfatnog pufera pH=8
- 10 µL 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzojeve kiseline)–DTNB (početna otopina pripremljena u 0,1 mol L^{-1} fosfatnom puferu pH=7 s dodatkom 0,12 mol L^{-1} natrij-bikarbonata radi stabilnosti DTNB-a)
- 10 µL butirilkolinesteraze - BuChE
- 10 µL butiriltiokolin jodida - BTChI (početne otopine BuChE i BTChI pripremljene su koristeći 0,1 mol L^{-1} fosfatni pufer pH=8)
- 10 µL uzorka određene koncentracije otopljenog u destiliranoj vodi

Tablica 4. Shema otopina u eksperimentu

	Kontrola	**BL1**	**BL2**	**Uzorak M**	**Uzorak BL**
Pufer	180	190	190	180	190
DTNB	10	10	10	10	10
Uzorak/destilirana voda	0/10	0/10	0/10	10/0	10/0
BuChE	10	/	10	10	/
BTChI	10	10	/	10	10

Uzorci se otpipetiraju u jažice, prema shemi iz tablice 4. s tim da se supstrat BTChI dodaje neposredno prije početka mjerenja budući da njime započinje reakcija. Kod mjerenja kontrole koristi se voda. Ne-enzimska hidroliza praćena je tzv. "blank" mjerenjima, odnosno slijepim probama. U jednoj slijepoj probi izostavljena je BuChE, a u drugoj BTChI koji se zamijeni jednakim volumenom pufera.

Mjerenje se vršilo na višekanalnom čitaču mikrotitarskih pločica "Sunrise" (Tecan, GmbH, Austrija) pri valnoj duljini od 405 nm uz automatsko miješanje i pohranjivanje podataka na računalo. Jedna mikrotitarska pločica ima 96 jažica.



Slika 15. Mikrotitarska pločica

Sposobnost inhibicije enzima računaju se prema sljedećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije BuChE} = [(A_K - A_A / A_K)] \times 100 \qquad (6)$$

gdje je:

A_K – apsorbancija test otopine,

A_A – apsorbancija kontrolnog uzorka.

2.4. Određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom vezanja DPPH radikala

Priprema otopine DPPH:

U čaši od 50 mL otopljeno je 1 mg DPPH u 30 mL etanola.

Postupak:

U kivetu širine 1 cm se stavi 1 mL DPPH i mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 517 nm, i potom se doda 50 µL uzorka koncentracije 0,25 mg mL^{-1}. Postupak je ponovljen s uzorcima koncentracije: 0,5 mg mL^{-1}, 1 mg mL^{-1}, 2,5 mg mL^{-1}, 5 mg mL^{-1}, 10 mg mL^{-1}, 15 mg mL^{-1} i 20 mg mL^{-1}. Antioksidacijska aktivnost mjerenja je u uzorcima različitih koncentracija, dok se u referentnoj kiveti nalazio čisti etanol. Apsorbancija se mjeri nakon 1 h pri valnoj duljini od 517 nm

Reakciju uklanjanja slobodnog radikala možemo uočiti pri promjeni boje od ljubičaste s početka reakcije do žute, te je to praćeno smanjenjem apsorbancije na određenoj valnoj duljini.

Postotak inhibicije DPPH radikala uzoraka računao se prema formuli:

$$\% \text{ Inhibicije} = (A_K - A_A / A_K) \times 100 \quad (7)$$

gdje je

A_A – apsorbancija otopine s dodanim antioksidansom izmjerena nakon jednog sata,

A_K – apsorbancija čiste otopine (referentnog uzorka).

3. REZULTATI

Za ispitivanje inhibicijske sposobnosti kolinesteraza korištene su različite koncetracije vodenog ekstrakta gorke naranče (1, 2, 4, 5, 10 mg mL^{-1}).

3.1. Ispitivanje sposobnosti inhibicije AChE metodom po Ellmanu

Vodeni ekstrakti gorke naranče nisu pokazali inhibicijsku aktivnost prema enzimu AChE pri korištenim koncentracijama.

3.2. Ispitivanje sposobnosti inhibicije BuChE metodom po Ellmanu

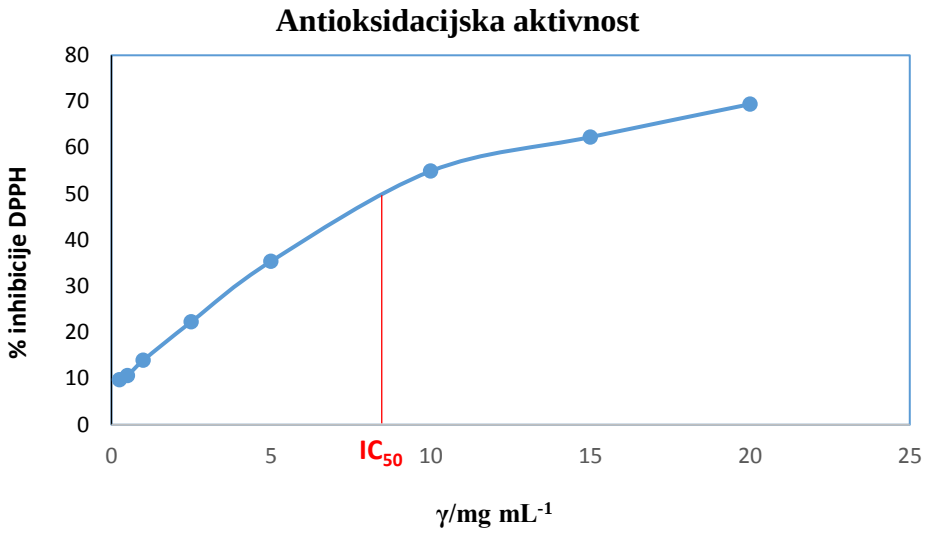
Vodeni ekstrakti gorke naranče nisu pokazali inhibicijsku aktivnost prema enzimu BuChE pri korištenim koncentracijama.

3.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti metodom vezanja DPPH radikala

Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti vodenog ekstrakta gorke naranče (*Citrus aurantium* L.) prikazani su u tablici 7.

Tablica 7. Rezultati određivanja antioksidacijske aktivnosti (a) koncentracija vodenog ekstrakta gorke naranče u sustavu; (b) apsorbancija čistog DPPH; (c) apsorbancija uzorka

γ/mg mL^{-1} (a)	A_{517} (b)	A_{517} (c)	% inhibicije
0,25	1,273	1,149	9,74
0,5	1,259	1,125	10,64
1,0	1,260	1,084	13,97
2,5	1,260	0,979	22,30
5,0	1,260	0,814	35,40
10,0	1,260	0,568	54,92
15,0	1,257	0,474	62,29
20,0	1,259	0,385	69,42



Slika 16. Grafički prikaz ovisnosti inhibicije DPPH o masenoj koncetraciji gorke naranče.

$$y = 4{,}6911x + 9{,}4448$$

$$y = 50$$

$$50 = 4{,}6911x + 9{,}4448$$

$$\boldsymbol{x = 8{,}65\ mg\ mL^{-1}}$$

$$\boldsymbol{x = IC_{50}}$$

Relativna IC_{50} predstavlja koncetraciju ekstrakta pri kojoj dolazi do 50 % inhibicije DPPH radikala.

4. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je ispitati sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BuChE) kao i odrediti antioksidacijsku aktivnost vodenog ekstrakta gorke naranče (*Citrus aurantium* L.) u svrhu pronalaženja djelotvornih inhibitora AChE i BuChE. Određivanje antioksidacijske aktivnosti i inhibicije kolinesteraza su svojstva koja se često proučavaju zbog njihovih povezanosti s AD i oksidativnim oštećenjem moždanih struktura.

Inhibicijska sposobnost određena je spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu. Ispitivan je vodeni ekstrakt gorke naranče u različitim koncentracijama. Možemo zaključiti da vodeni ekstrakt gorke naranče ne pokazuje sposobnost inhibicije enzima AChE i BuChE. Najveća ispitivana koncentracija bila je 10 mg mL^{-1}, a najmanja 1 mg mL^{-1}.

Antioksidacijska aktivnost određena je metodom vezanja DPPH radikala. Korištene su različite koncentracije vodenog ekstrakta gorke naranče. Najveći postotak inhibicije DPPH radikala imao je vodeni ekstrakt koncentracije 20 mg mL^{-1}, i to u postotku od 69,42 %. Najmanji postotak redukcije DPPH imao je vodeni ekstrakt koncentracije 0,25 mg mL^{-1}, s postotkom od 9,74 %. Možemo zaključiti da povećanjem koncentracije raste i postotak inhibicije DPPH radikala.

Rezultati ovih eksperimenata pokazuju da vodeni ekstrakt gorke naranče (*Citrus aurantium* L.) ima dobra antioksidacijska svojstva, dok isti nemaju sposobnost inhibicije acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze.

5. ZAKLJUČAK

- Rezultati ispitivanja inhibicijskog djelovanja vodenog ekstrakta gorke naranče (*Citrus aurantium* L.) na enzime acetilkolinesterazu i butirilkolinesterazu pokazali su da testirani ekstrakt nema sposobnost inhibicije AChE i BuChE bez obzira na testiranu koncentraciju.

- DPPH metodom utvrđeno je da najveću inhibiciju DPPH radikala u iznosu od 69,42 % pokazuje vodeni ekstrakt koncentracije 20 mg mL^{-1}. Povećanjem koncentracije ekstrakta dolazi do povećanja postotka redukcije DPPH radikala.

- Rezultati ispitivanja ukazuju na dobra antioksidacijska svojstva vodenog ekstrakta gorske naranče, te na lošu sposobnost inhibicije enzima AChE i BuChE.

6. LITERATURA

1. *https://wikipedia.org/wiki/Agrumi* (01.09.2017.).
2. *https://en.wikipedia.org/wiki/Rutaceae* (01.09.2017.).
3. *http://www.kakolijeciti.com/citrusno-voce-agrumi/* (10.09.2017).
4. H. Car. *Matka: časopis za mlade matematičare*, **25** (2016/2017), 83-85
5. *https://www.femina.hr/clanak/index/r/9/c/5792/se/relax_diy-njega-s-etericnim-uljima-narance* (20.09.2017.).
6. J. M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryr, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb: 2013.
7. F. Burčul, *Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae*, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2014.
8. N. Hrvat Maček, *Kolinesteraze i oksimi kao pseudolitička čistila živčanih bojnih otrova*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2012.
9. *https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Acetylcholine.png* (20.09.2017.).
10. A. Bosak, M. Kalinić, Z. Kovarik, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, **62** (2011), 175-190.
11. *http://proteopedia.org/wiki/index.php/Acetylcholinesterase_inhibited_by_nerve_agent_soman* (20.09.2017.).
12. *https://en.wikipedia.org/wiki/Esterase* (12.09.2017.).
13. *https://en.wikipedia.org/wiki/Butyrylcholinesterase* (21.09.2017.).
14. N. Blažević, Učinci antilipidnih lijekova na butirilkolinesterazu u biološkom materijalu štakora, Diplomski rad, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2014.
15. *https://hr.wikipedia.org/wiki/Acetilkolin* (12.09.2017.).
16. K.M. Kutty, R.H. Payne, *Journal of clinical laboratory analysis*, **8** (1994), 247-250.
17. M. Stojanov, A. Stefanović, G. Džingalašević, S. Mandić- Radić, M. Prostran, *Clinical Biochemistry* **44** (2011), 623-626.
18. M. Macan, *Utjecaj antilipidnih ljekova na esteraze, lipide i leptin u biološkom materijalu štakora*, Disertacija,Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 2011.

19. A. Puljak, G. Perko, D. Mihok, H. Radašević i S. Tomek-Roksandić, *Medicus*, **14** (2005), 229-235.
20. A. Radanović, *Ispitivanje sposobnosti inhibicije acetilkolinesteraze i određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenog ekstraktra mirisne ljubice (Viola odorata* L.*)*, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2015.
21. B. Jurić, *Terapijski pristup Alzheimerovoj bolesti*, Diplomski rad, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2015.
22. *https://www.google.hr/search?q=tacrine+donepezil+rivastigmine+and+galantamine&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjQ1aiTsrnWAhXJB5oKHd7xBdYQ_AUICigB&biw=1366&bih=662#imgrc=GjD8b6-9txT_9M:* (21.09.2017.).
23. S. Borčić i O. Kronja, *Praktikum preparativne organske kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 2004.
24. M. Bušnja, *Utjecaj različitih šečera na temperaturu staklastog prijelaza osmodski dehidratirane kore naranče*, Diplomski rad, Sveučilišta Josipa Juraja Strossmayera, Sveučilište u Osijeku, Osijek, 2015.
25. T. Lovrić, *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva,* Hinus, Zagreb, 2013.
26. D.A. Skoog, D.M. West, i F.J. Holler, *Osnovi analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
27. G.L. Ellman, D. K. Courtney, V. Andres, i R. M. Featherstone, *Biochemical pharmacology*, **7**(1961), 88-95.
28. *https://en.wikipedia.org/wiki/DPPH* (21.09.2017.).
29. Z. Lasić, *Inhibicija enzima acetilkolinesteraze i antioksidacijsko djelovanje vodenog ekstrakta gorske metvice,* Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Split, Split, 2015.
30. O. Politeo, *Biokemijski praktikum, Interna skripta*, Split 2012