Inhibicija acetilkolinesteraze odabranim organskim sulfidima

Pedić, Katarina

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:167:269497

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

INHIBICIJA ACETILKOLINESTERAZE ODABRANIM ORGANSKIM SULFIDIMA

ZAVRŠNI RAD

KATARINA PEDIĆ

Matični broj: 1085

Split, srpanj 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKE TEHNOLOGIJE

KEMIJSKO INŽENJERSTVO

INHIBICIJA ACETILKOLINESTERAZE ODABRANIM ORGANSKIM SULFIDIMA

ZAVRŠNI RAD

KATARINA PEDIĆ

Matični broj: 1085

Split, srpanj 2019.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

CHEMICAL ENGINEERING

ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITION WITH SELECTED ORGANIC SULFIDES

BACHELOR THESIS

KATARINA PEDIĆ

Parent number: 1085

Split, July 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij kemijske tehnologije, smjer: Kemijsko inženjerstvo

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 19. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: Doc. dr. sc. Franko Burčul

INHIBICIJA ACETILKOLINESTERAZE ODABRANIM ORGANSKIM SULFIDIMA

Katarina Pedić, 1085

Sažetak: Enzimi su snažni biokatalizatori bez čije se aktivnosti većina kemijskih reakcija u biološkom sustavu ne bi odvijala. Enzimskoj skupini hidrolaza pripada jedan od najučinkovitijih enzima u prirodi, acetilkolinesteraza (AChE). Fiziološka uloga AChE je da prilikom prijenosa živčanog impulsa hidrolizira neuroprijenosnik acetilkolin (ACh) na acetat i kolin i tako smanjuje aktivnost ACh. Važan je faktor u tretmanu teških neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove bolesti. Alzheimerova bolest (AD) predstavlja najučestaliji tip demencije u suvremenom svijetu. AD je neizlječiva bolest živčanih stanica (neurona) i okolnih struktrura sa smrtnim ishodom. Inhibitorima kolinesteraza, uz ostale proučavane metode, nastoje se ublažiti simptomi ove progresivne bolesti, a krajnji cilj je pronaći lijek. Cilj rada bio je ispitati inhibicijsko djelovanje odabranih organskih sulfida (inhibitora) na enzim acetilkolinesterazu metodom po Ellmanu. Ellmanova metoda zasniva se na reakciji Ellmanovog reagensa i tiolne skupine pri čemu nastaje žuto obojeni kompleks. Od odabranih sulfida najveću inhibicijsku sposobnost pokazao je dimetil-trisulfid pri koncentraciji od 568 μM, a iznosi 40,23 %. Smanjenjem koncentracije inhibitora smanjuje se i njegov učinak. Uzorak koji jedini nije pokazao inhibicijsko djelovanje pri različitim koncentracijama je dipropil-trisulfid.

Ključne riječi: Acetilkolinesteraza, Alzheimerova bolest, organski sulfidi, dimetil-trisulfid

Rad sadrži: 45 stranica, 17 slika, 8 tablica, 25 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

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

Datum obrane: 11. srpnja 2019.

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 chemical engineering, orientation: Chemical engineering

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 19.

Mentor: Franko Burčul, PhD, Assistant Professor

ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITION WITH SELECTED ORGANIC SULFIDES

Katarina Pedić, 1085

Abstract: Enzymes are powerful biocatalysts without which the majority of chemical reactions in the biological system would not occur. One of the most effective enzymes in nature, acetylcholinesterase (AChE) belongs to the enzyme group of hydrolases. The physiological role of AChE is to hydrolyse the neurotransmitter acetylcholine (ACh) after transmission of a nervous pulse to acetate and choline and thus reduce its activity. It is an important factor in the treatment of severe neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. Alzheimer's Disease (AD) is the most common type of dementia in the modern world. AD is an incurable disease of nerve cells (neurons) and surrounding structures with a deadly outcome. Cholinesterase inhibitors, along with the other studied methods, are used to alleviate the symptoms of this progressive disease, and the ultimate goal is to find a cure. The aim of the study was to investigate the inhibitory effect of selected organic sulfides (inhibitors) on the enzyme acetylcholinesterase using Ellman's method. Ellman's method is based on the reaction of Ellman's reagent and the thiol groups yielding a yellow coloured complex. Between the selected sulfides dimethyl trisulfide showed the highest inhibition capability of 40.23% at a concentration of 568 μM. Reduction of the concentration of the inhibitor decreased the inhibitory effect. Dipropyl trisulfide was the only sulfide that did not show any inhibitory activity at tested concentrations.

Keywords: Acetylcholinesterase, Alzheimer's disease, organic sulfides, dimethyl trisulfide

Thesis contains: 45 pages, 17 figures, 8 tables, 25 literary references

Original in: Croatian.

Defence committee:

1. Ivica Blažević, PhD, Associate Professor – chair person
2. Mario Nikola Mužek, PhD, Assistant Professor - member
3. Franko Burčul, PhD, Assistant Professor - supervisor

Defence date: 11th July 2019

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 analitičku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Franka Burčula tijekom mjeseca lipnja i srpnja 2019. godine.

Rad je financiran od Hrvatske zaklade za znanost projektom IP-2016-06-1316.

Zahvaljujem se svom mentoru, doc. dr. sc. Franku Burčulu na korisnim savjetima i velikoj pomoći pri izradi ovog rada.

Hvala mojim prijateljima na strpljenju i najveće hvala mojim roditeljima na ljubavi, razumijevanju i neizmjernoj podršci tijekom studija.

Katarina Pedić

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- *Određivanje inhibicijske sposobnosti odabranih organskih sulfida na enzim acetilkolinesterazu spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu*

SAŽETAK

Enzimi su snažni biokatalizatori bez čije se aktivnosti većina kemijskih reakcija u biološkom sustavu ne bi odvijala. Enzimskoj skupini hidrolaza pripada jedan od najučinkovitijih enzima u prirodi, acetilkolinesteraza (AChE). Fiziološka uloga AChE je da prilikom prijenosa živčanog impulsa hidrolizira neuroprijenosnik acetilkolin (ACh) na acetat i kolin i tako smanjuje aktivnost ACh. Važan je faktor u tretmanu teških neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove bolesti.

Alzheimerova bolest (AD) predstavlja najučestaliji tip demencije u suvremenom svijetu. AD je neizlječiva bolest živčanih stanica (neurona) i okolnih struktura sa smrtnim ishodom. Inhibitorima kolinesteraza, uz ostale proučavane metode, nastoje se ublažiti simptomi ove progresivne bolesti, a krajnji cilj je pronaći lijek.

Cilj rada bio je ispitati inhibicijsko djelovanje odabranih organskih sulfida (inhibitora) na enzim acetilkolinesterazu metodom po Ellmanu. Ellmanova metoda zasniva se na reakciji Ellmanovog reagensa i tiolne skupine pri čemu nastaje žuto obojeni kompleks. Od odabranih sulfida najveću inhibicijsku sposobnost pokazao je dimetil-trisulfid pri koncentraciji od 568 μM, a iznosi 40,23 %. Smanjenjem koncentracije inhibitora smanjuje se i njegov učinak. Uzorak koji jedini nije pokazao inhibicijsko djelovanje pri različitim koncentracijama je dipropil-trisulfid.

Ključne riječi: Acetilkolinesteraza, Alzheimerova bolest, organski sulfidi, dimetil-trisulfid

SUMMARY

Enzymes are powerful biocatalysts without which the majority of chemical reactions in the biological system would not occur. One of the most effective enzyme in nature, acetylcholinesterase (AChE) belongs to the enzyme group of hydrolases. The physiological role of AChE is to hydrolyse the neurotransmitter acetylcholine (ACh) after transmission of a nervous pulse to acetate and choline and thus reduce its activity. It is an important factor in the treatment of severe neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease.

Alzheimer's Disease (AD) is the most common type of dementia in the modern world. AD is an incurable disease of nerve cells (neurons) and surrounding structures with a deadly outcome. Cholinesterase inhibitors, along with the other studied methods, used to alleviate the symptoms of this progressive disease, and the ultimate goal is to find a cure.

The aim of the study was to investigate the inhibitory effect of selected organic sulfides (inhibitors) on the enzyme acetylcholinesterase using Ellman’s method. Ellman's method is based on the reaction of Ellman's reagent and the thiol groups yielding a yellow coloured complex. Between the selected sulfides dimethyl trisulfide showed the highest inhibition capability of 40.23% at a concentration of 568 μM. Reduction of the concentration of the inhibitor decreased the inhibitory effect. Dipropyl trisulfide was the only sulfide that did not show any inhibitory activity at tested concentrations.

Ključne riječi: Acetylcholinesterase, Alzheimer’s disease, organic sulfides, dimethyl trisulfide,

SADRŽAJ

UVOD 1

1. OPĆI DIO 2

1.1. Enzimi ili biokatalizatori 2

1.2. Acetilkolin 3

1.3. Acetilkolinesteraza 5

1.3.1. Struktura i mehanizam djelovanja AChE 6

1.3.2. Inhibitori acetilkolinesteraze 10

1.4. Neurodegenerativne bolesti 12

1.4.1. Alzheimerova bolest 12

1.5. Sulfidi (tioeteri) 16

1.5.1. Organski sulfidi iz roda *Allium* 17

1.6. Spektrofotometrija 20

1.6.1. Metoda po Ellmanu 22

2. EKSPERIMENTALNI DIO 24

2.1. Određivanje inhibicijske sposobnosti enzima acetilkolinesteraze metodom po Ellmanu 24

2.1.1. Priprema kemikalija 24

2.1.2. Postupak rada 26

3. REZULTATI 29

4. RASPRAVA 30

5. ZAKLJUČAK 31

6. LITERATURA 32

UVOD

Enzimi ili biokatalizatori, su tvari čija aktivnost omogućava izvedbu većine kemijskih reakcija u biološkom sustavu. Po svom sastavu gotovo svi poznati enzimi su proteini izuzev određene molekule RNA koje pokazuju katalitičku aktivnost (ribozimi). Enzimi djeluju tako što ubrzavaju kemijske reakcije snižavanjem energije aktivacije po mehanizmu "ključa i brave". Bez njihove aktivnosti, većina se kemijskih reakcija u biološkom sustavu ne bi odvijala ili bi bila suviše spora za razvoj pri normalnim tjelesnim uvjetima.

Acetilkolin, neurotransmiter ili neuroprijenosnik, kvarterna je amonijeva baza. Ovaj neuroprijenosnik sintetizira se u živčanim stanicama uz pomoć koenzima A i specifičnog enzima kolin-acetilaze (kolin-acetiltransferaza) koji katalizira transport acetilnoga ostatka iz koenzima A u kolin. Slobodan acetilkolin je jako nestabilan u prisutnosti specifičnog enzima acetilkolinesteraze koja ga odmah hidrolizira.

Acetilkolinesteraza (AChE; E.C. 3.1.1.7), kontrolira prijenos živčanih impulsa u kolinergičnoj sinapsi središnjeg i perifernog živčanog sustava te je od izrazite važnosti za očuvanje homeostaze organizma. Pripada skupini hidrolaza, a uz butirilkolinesterazu (BChE) čini važan faktor u tretmanu teških neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove, Parkinsonove, Huntingonove i drugih. U mozgu oboljelih od Alzheimerove bolesti, akumuliraju se dva abnormalna proteinska fragmenta, plakovi i (neurofibrilni) snopovi i uništavaju stanice mozga. To dovodi do smanjenja koncentracije acetilkolina i aktivnosti AChE, dok aktivnost BChE raste.

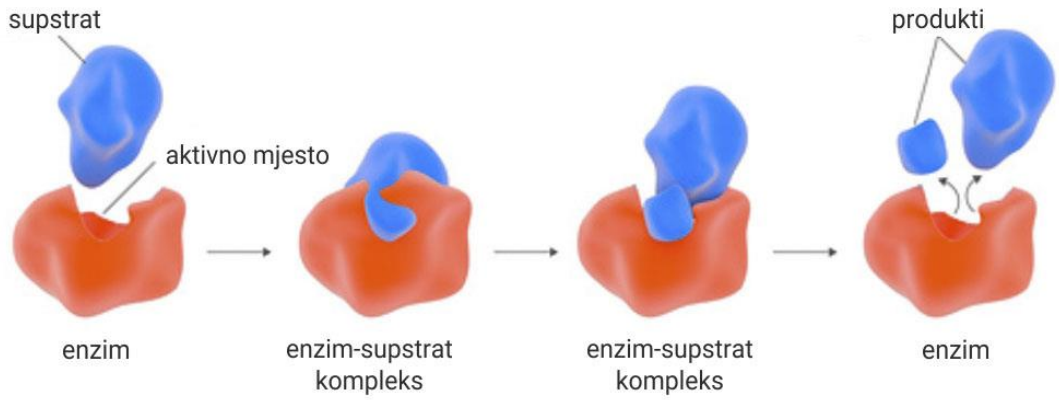
Organski sulfidi produkt su razgradnje spojeva iz roda *Allium (Amaryllidacea)*. Hlapljivi su spojevi, vrlo neugodnog mirisa čija se struktura kreće od najjednostavnijeg dimetil-sulfida do složenih spojeva koji uz atom sumpora sadrže i druge heteroatome.

Za dokazivanje sposobnosti inhibicije acetilkolinesteraze korišteni su slijedeći inhibitori koji pripadaju skupini sulfida: dimetil-trisulifid, dipropil-disulfid, dipropil-trisulfid i dialil-disulfid.

1. OPĆI DIO

1.1. Enzimi ili biokatalizatori

Enzimi su snažni biokatalizatori koji ubrzavaju kemijske reakcije više od milijun puta, a da se pritom ne troše i ne mijenjaju svoja svojstva. Odlikuje ih visoka katalitička moć i specifičnost za pojedine kemijske reakcije i supstrate u živim organizmima. U živoj stanici, reakcije se odvijaju pri točno definiranim uvjetima tlaka, temperature i pH. Brzo odvijanje kemijskih reakcija od velike je važnosti za optimalan život stanice. Na aktivnost enzima mogu utjecati različite molekule. Dodatkom aktivatora, raste aktivnost enzima kao i brzina kemijske reakcije dok dodatak inhibitora bilo prirodnih bilo umjetnih (sintetskih) umanjuje ili potpuno blokira aktivnost enzima. Svaki tip enzima najčešće katalizira samo jednu reakciju. Tvar na koju enzim djeluje naziva se supstrat. Mjesto na enzimu na koje se supstrat veže zove se aktivno mjesto, a međudjelovanje enzima i supstrata odgovara poput ključa i brave u kojem supstrat oblikom odgovara obliku aktivnog mjesta na enzimu.[3]

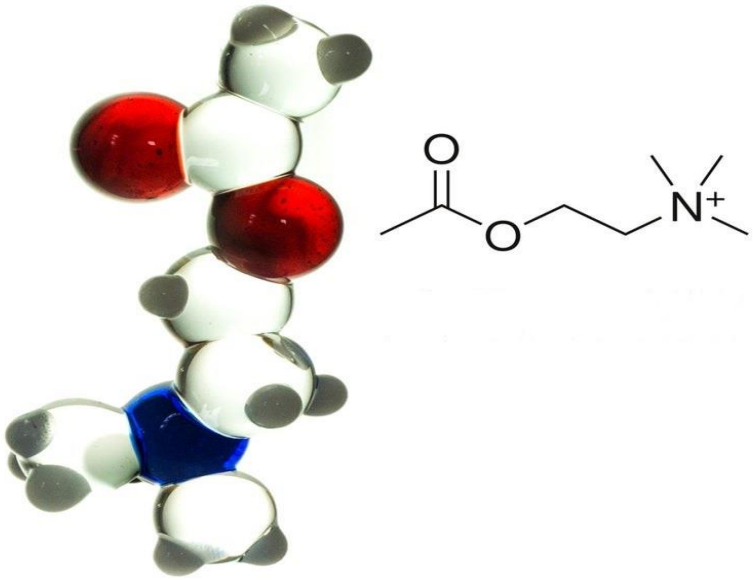


Slika 1. *Međudjelovanje enzima i supstrata* [2]

Kako je otkriven velik broj enzima što je rezultiralo dodjeljivanjem duplih ili više imena enzimima, tad je Međunarodni savez biokemije (IUB) razvio sustav nomenklatura prema kojem svaki enzim ima jedinstveno ime i vlastiti kodni broj koji identificiraju vrstu katalitičke reakcije i uključene supstrate. Stoga su enzimi klasificirani u slijedećih šest razreda: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze, ligaze.

1.2. Acetilkolin

Acetilkolin (engl. *acetylcholine*, ACh) je najpoznatiji kao jedan od prvih identificiranih neuroprijenosnika. Kolin-acetil-transferaza je enzim koji katalizira stvaranje acetilkolina u kolinergičnim neuronima iz kolina i acetilkoenzima A (acetil-CoA).[4]

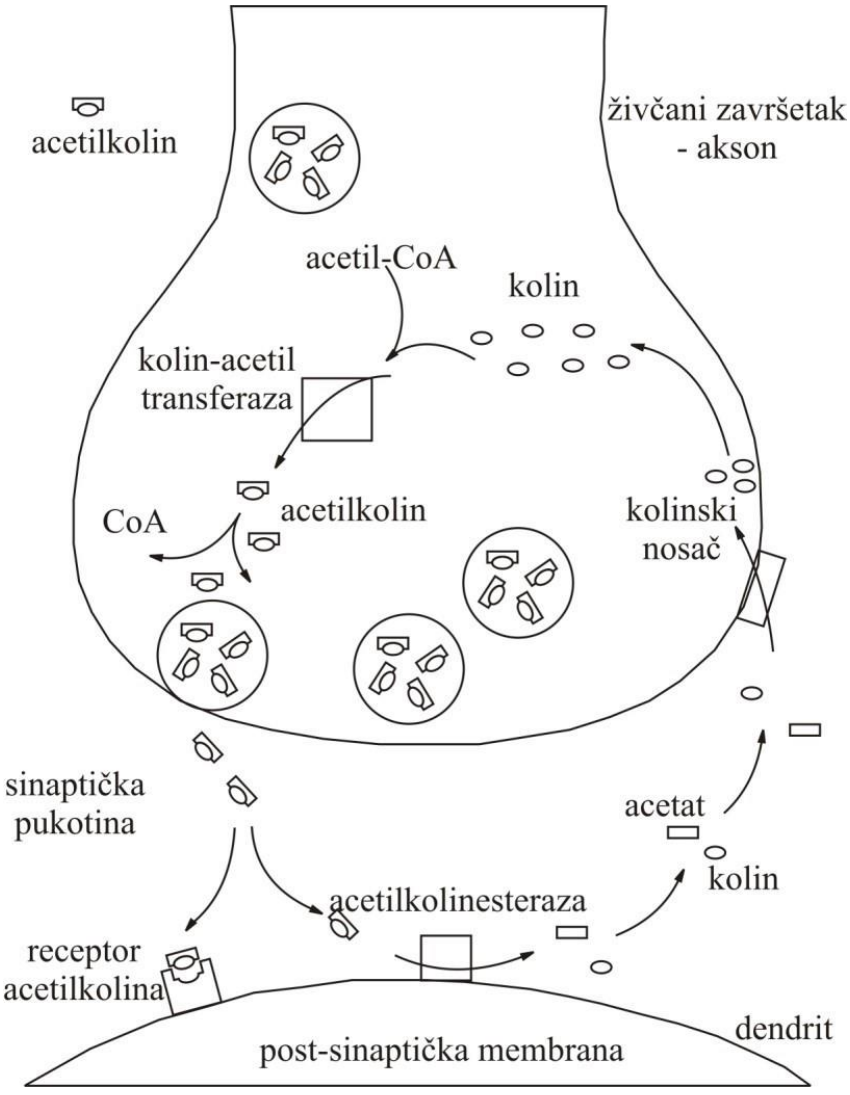


Slika 2. *Kemijska struktura acetilkolina* [9]

U većini slučajeva acetilkolin ima ekscitacijski (pobuđujući) učinak no u nekim perifernim parasimpatičkim, živčanim završecima javlja se kao inhibitor. Acetilkolin djeluje tako da pobuđuje prijenos signala među neuronima tako i do stanica mišića. Postoje dvije vrste receptora za ACh: muskarinski i nikotinski. Muskarinski receptori većinom su povezani s perifernim živčanim sustavom, glatkim i srčanim mišićima te vezivanje ACh na ovaj oblik receptora rezultira stimulacijom parasimpatičkog živčanog sustava što za posljedicu ima smanjenje broja otkucaja srca i krvnoga tlaka, sužavanje bronha, povećano izlučivanje sline, poticanje probave, otpuštanje tekućine iz mjehura itd. Nikotinski receptori su prisutni u središnjem živčanom sustavu (SŽS) kao i na membranama mnogih postsinaptičkih neurona. U SŽS stimulacija nikotinskih receptora se veže uz pamćenje i kognitivne procese, dok kod mišića kostiju uzrokuje njihovu kontrakciju. ACh se nalazi u vrećicama na krajevima neurona iz kojih se

depolarizacijom živčanoga kraja otpušta u sinaptičku pukotinu gdje se nakon toga veže na odgovarajući receptor.[4]

Otpušteni ACh ima izrazito kratko vrijeme poluživota zbog visoke koncentracije enzima acetilkolinesteraze (AChE) koji hidrolizira estersku vezu ACh što dovodi do gubitka simulirajućeg signala.



Slika 3. *Shematski prikaz kolinergične sinapse i kružnog ciklusa acetikolina* [4]

Tijekom sinaptičkog prijenosa živčanog signala, acetilkolin se oslobađa iz mjehurića, u koji se prenosi nakon sinteze, u sinaptičku pukotinu gdje se veže na kolinergične receptore (nikotinski i muskarinski) koji su vezani za postsinaptičku membranu kolinergične sinapse ili mišićne stanice. Vezivanje ACh osigurava daljnji prijenos živčanog signala ili impulsa. Acetilkolin se razgrađuje pod djelovanjem enzima AChE koji se nalazi u teoglikanskoj mrežici što ispunjava prostor sinaptičke pukotine. Mjehurići u presinaptičkom završetku ponovno se obnavljaju, uspostavlja se polarizacija postsinaptičke membrane i impuls prestaje. Kolin se aktivno prenosi natrag u presinaptičke završetke kako bi bio ponovno upotrebljiv za sintezu novog acetilkolina.[10]

1.3. Acetilkolinesteraza

Acetilkolinesteraza (engl. *acetylcholineesterase*, AChE), prava ili specifična kolinesteraza, jedan je od najučinkovitijih enzima u prirodi. AChE pripada skupini hidrolaza, podskupini esteraza i potpodskupini hidrolaza estera karboksilnih kiselina. Sintetizira se u koštanoj srži, mišićima i mozgu, a osim toga smještena je i u eritrocitima gdje joj je uloga još uvijek nepoznata. Acetilkolinesteraza je od iznimne važnosti za očuvanje homeostaze organizma s obzirom na to da je njezin fiziološki supstrat, acetilkolin, jedan od prijenosnika živčanog signala.



Slika 4. *Trodimenzionalna struktura AChE* [4]

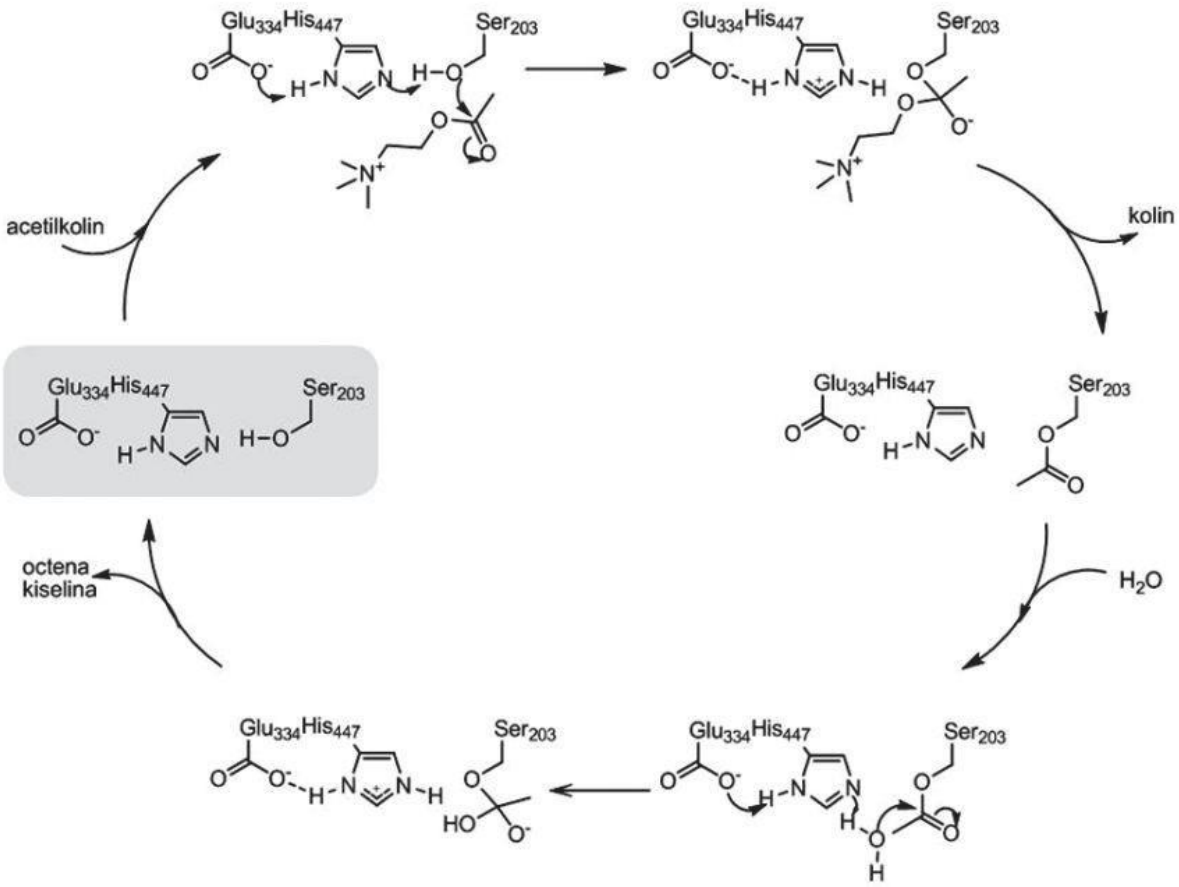
Kolinesterazama se nazivaju enzimi koji hidroliziraju kolinske estere brže nego ostale estere karboksilnih kiselina. Drugi tip kolinesteraze, butirilkolinesteraza (BChE, E.C. 3.1.1.8), nalazi se u centralnom i perifernom živčanom sustavu, cerebrospinalnoj tekućini, te crijevima, plućima, gušterači i jetri. Unatoč tome što je dokazano da BChE može hidrolizirati acetilkolin u sinapsi, njen specifični fiziološki supstrat još uvijek nije pronađen stoga njena prava uloga u organizmu nije razriješena.

AChE karakterizira velika brzina hidrolize acetilkolina. Za ljudsku AChE konstanta brzine hidrolize acetilkolina, k_{cat}, iznosi otprilike 400 000 min^{-1} te je njegova hidroliza stoga ograničena samo brzinom njegove difuzije u aktivno mjesto enzima.[11] Osim "klasične" katalitičke funkcije, AChE posjeduje i takozvane nekatalitičke funkcije, koje ne obuhvaćaju njezinu fiziološku funkciju. Do danas je potvrđeno da AChE sudjeluje u sinaptogenezi, aktivaciji dopaminskih receptora i agregaciji amiloidnih vlakana, dok se njezina uloga u nastajanju trombocita i krvnih stanica povezuje s povećanim rizikom od leukemije kod osoba izloženih djelovanju pesticida koji djeluju kao inhibitori AChE.

1.3.1. Struktura i mehanizam djelovanja AChE

Osnovnu strukturu ovog složenog proteina čini 12 *β*-naboranih ploča okruženih s 14 *α*-uzvojnica, što je klasificira u skupinu hidrolaza *α/β* strukture. Poznavanje strukture acetilkolinesteraze se temelji na istraživanjima strukture enzima električne jegulje (*Torpedo californica*, TcAChE) budući da je struktura AChE kod sisavaca vrlo slična strukturi TcAChE te se većina *in vitro* istraživanja odvija na ovom enzimu kao modelu. Elipsoidnog je oblika, te sadržava aktivno mjesto (ždrijelo ili grlo), udubljenje duboko oko 20 Å. Kristalna struktura AChE je određena 2000. godine i visoko je homologna (vrlo slična) strukturi enzima iz *Torpedo californica*.

Hidroliza acetilkolina, prijenosnika živčanih impulsa odvija se na dnu udubine (aktivnog mjesta) kroz složeni mehanizam koji obuhvaća 3 faze: nastajanje Michaelisova kompleksa, aciliranje enzima i deaciliranje istog vodom. Procesi aciliranja i deaciliranja odvijaju se preko tetraedarskog prijelaznog stanja koje čine aktivni serin i supstrat. Acetilkolin se najprije veže na samom otvoru, na tzv. periferno anionsko mjesto.

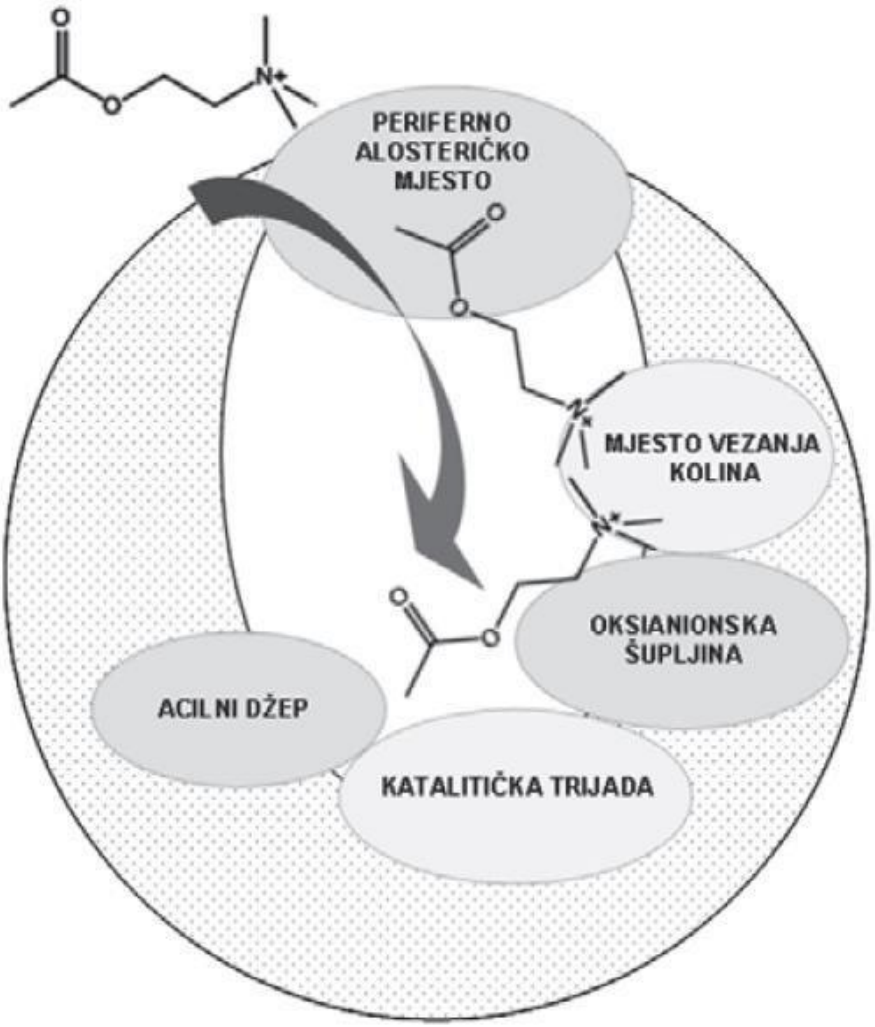


Slika 5. *Shematski prikaz ciklusa hidrolize acetilkolina u aktivnom mjestu preko katalitičke trijade* [11]

Aktivno mjesto AChE dugačko je 20 Å i oko 5 Å široko ždrijelo.

Uz pomoć kristalografije, specifičnog vezivanja liganada i ciljane mutageneze, identificirane su 4 podregije koje čine aktivno mjesto AChE i sudjeluju u hidrolizi ACh:

- katalitičko mjesto (esterazno mjesto, katalitička trijada s oksianionskom šupljinom) – sadržava aminokiselinski ogranak glutamata koji je smješten do histidina i serina
- anionsko mjesto (hidrofobno, mjesto vezivanja kolina) – za stabilizaciju pozitivno nabijenog kvarternog dijela kolinskih supstrata
- acilni "džep" (odgovoran za smještanje acilnog dijela supstrata)
- periferno mjesto smješteno na rubu ždrijela



Slika 6. *Prikaz podregija aktivnog mjesta AChE* [11]

Tablica 1. *Uloga podregija aktivnog mjesta acetilkolinesteraze* [4]

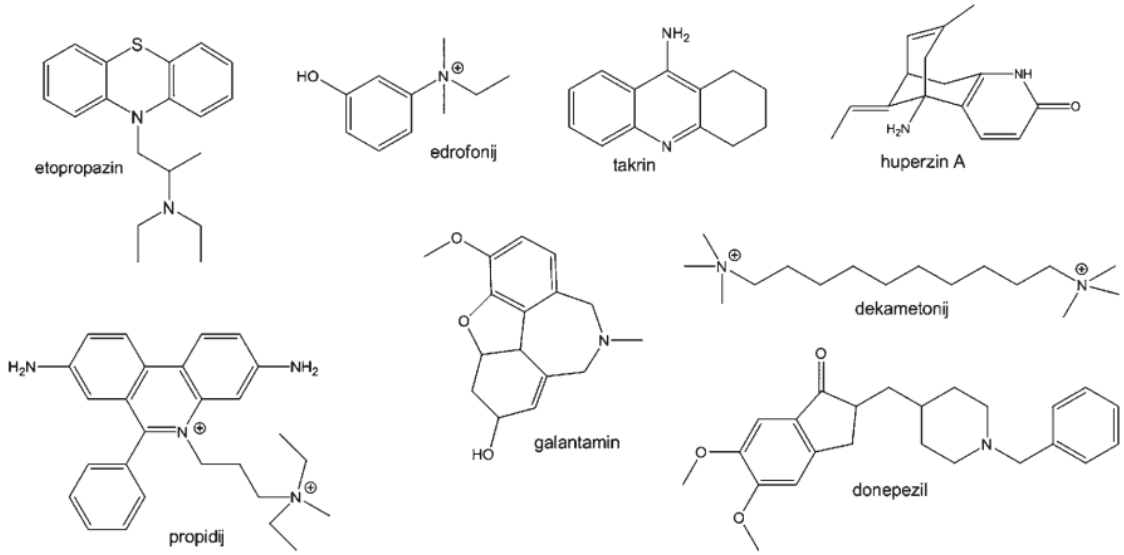
Podregije aktivnog mjesta	Uloga	Aminokiseline
ESTERAZNO MJESTO	Poboljšavanje nukleofilnosti katalitičkog serina (zbog vodikove veze između serina i histidina koja omogućava nukleofilni napad serina na supstrat)	Ser200 His440 Glu327
OKSIANIONSKA ''RUPA''	Pobočni lanci ovih aminokiselina djeluju kao donori vodikove veze te tako stabiliziraju tetraedarski međuprodukt ACh koji nastaje tijekom procesa hidrolize	Gly118 Gly119 Ala201
PERIFERNO ANIONSKO MJESTO	Alosterički mehanizam inhibicije AChE pri visokim koncentracijama acetilkolina	Tyr72 Tyr124 Trp286
ANIONSKO MJESTO	Hidrofobno mjesto ili mjesto vezivanja kolina – aromatske aminokiseline i Glu99 odgovorne su za stabilizaciju kvarternog amonijevog liganda, triptofan (Trp84) je važna aminokiselina koja veže ACh	Aromatske aminokiseline (Trp84, Phe330) i 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

1.3.2. Inhibitori acetilkolinesteraze

Inhibicija aktivnosti enzima acetilkolinesteraze dovodi do nakupljanja acetilkolina i poremećaja u transportu živčanih impulsa (desenzibilizacija receptora), što se manifestira kolinergičkom krizom. Mučnine, salivacija, paraliza dišnog sustava neke su od posljedica djelovanja kolinergične krize koja kao krajnji ishod ima smrt. Dok inhibicija AChE ima opasne posljedice po život, inhibicija butirilkolinesteraze (BChE) istim spojem ne predstavlja opasnost vitalnim funkcijama organizma. Slijedno tome BChE u organizmu, potencijalno, djeluje kao čistilo od spojeva koji inhibiraju aktivnost AChE te je na taj način štiti od inhibicije.

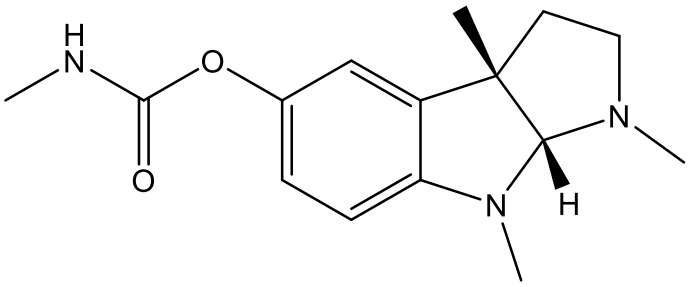
Inhibitori se mogu podijeliti u dvije skupine: inhibitori koji se vežu na dnu ždrijela (reverzibilni) i inhibitori koji se vežu na periferno alosteričko mjesto (ireverzibilni).

- Reverzibilni inhibitori uglavnom su prirodnog podrijetla, izolirani iz biljaka poput alkaloida (huperzin A, solanidin, solanin) i flavonoida (galangin). Alkaloidi su najčešće proučavana klasa spojeva pa je tako galantamin – alkaloid po prvi puta izoliran iz biljke lukovice i cvjetova biljke *Galanthus woronowii* L. (Amaryllidaceae) odobren i komercijalno dostupan kao lijek za Alzheimerovu bolest. Razvoj prirodnih enzima, njihova uključenost u patologiju raznih bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti potakla je razvoj sintetskih inhibitora. Tako su danas u kliničkoj upotrebi 2 reverzibilna inhibitora, donepezil (Aricept) i takrin (Cognex), primjenjivi u terapiji demencije. Dio reverzibilnih inhibitora visokog afiniteta prema AChE, načinjen je pomoću tzv. klik – kemije gdje je aktivno mjesto enzima služilo kao reakcijska posuda.



Slika 7. *Reverzibilni inhibitori AChE* [11]

- Ireverzibilni inhibitori u aktivnom mjestu enzima formiraju Michaelisov tip kompleksa s katalitičkim serinom (kovalentna veza). Ovu skupinu spojeva čine karbamati i organofosforni spojevi. Prvi poznati ireverzibilni inhibitor, karbamat fizostigmin (eserin), izoliran iz sjemenki biljke *Physostigma venenosum*, koristi se u terapiji miastenije gravis, genetske autoimune bolesti do koje dolazi zbog nedostatka ACh u neuromuskularnim spojevima i Alzheimerove bolesti, te se dugi niz godina uspješno koristio za liječenje glaukoma.[11]



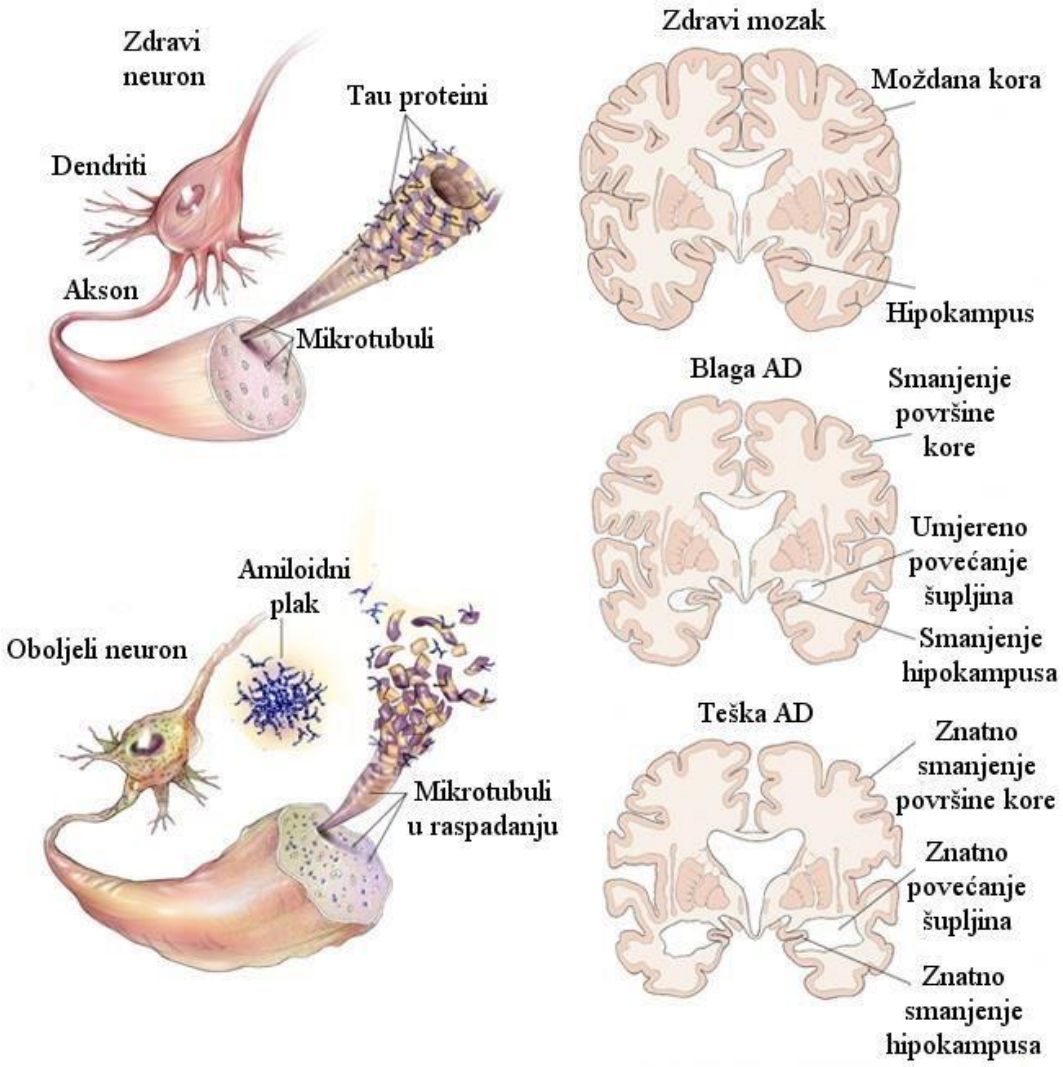
Slika 8. *Struktura fizostigmina*

1.4. Neurodegenerativne bolesti

Neurodegenerativne bolesti su bolesti nakupljanja koje karakterizira postepeno i progresivno odumiranje stanica što vodi ka disfunkciji živčanog sustava. Molekularna klasifikacija neurodegenerativnih bolesti temelji se na proteinima. Proteini kod ovog tipa demencija pokazuju promijenjena fizikalno-kemijska svojstva u mozgu i perifernim organima. Neurodegenerativne bolesti nastaju pod utjecajem genetičkih, epigenetičkih (okolišnih) čimbenika, a u današnje vrijeme zahvaćaju sve veći broj populacije.[15] U neurodegenerativne bolesti se ubrajaju Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, Huntingova bolest, prionska bolesti, progresivna supranuklearna paraliza itd. Alzheimerova bolest najčešći je oblik demencije i jedan je od najozbiljnijih zdravstvenih problema suvremenoga svijeta.

1.4.1. Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest (engl. *Alzheimer's disease*, AD) je progresivna neurodegenerativna bolest koja je ime dobila po njemačkom neurologu Aloisu Alzheimeru. Alzheimer je prvi put opisao bolest 1907. godine na pacijentici sa simptomima paranoidnih ideja, gubitka pamćenja i poremećaja govora. Najčešći je oblik demencije, nema lijeka niti postoji učinkovito liječenje i krajnji ishod je uvijek smrt. AD je karakterizirana ekstracelularnim skupljanjem β-amiloida u mozgu i nakupinama neurofibrilarnih snopova u neuronima. Biokemijski procesi, uključeni u razvoj AD dovode do gubitka neurona apoptozom (programirana smrt stanice).



Slika 9. *Usporedba zdravog mozga i mozga osobe oboljele od Alzheimerove bolesti* [6]

AD uključuje nasljedne i sporadične oblike bolesti.

Nasljedna AD prenosi se na autosomno dominantan način, a prvi simptomi javljaju se prije 65. godine života (rani oblik AD). Drugi oblik AD, sporadični, javlja se nakon 65. godine života i najčešći je oblik Alzheimerove bolesti. Iako se u većini slučajeva AD smatra sporadičnom bolesti, u oko 5 do 15 % slučajeva javlja se obiteljski, a pola takvih slučajeva ima rani početak i tipično su povezani s genetskim poremećajima.[16]

Ova progresivna bolest zahvaća 4 % populacije u dobi od 65. do 74. godine i 30 % populacije iznad 85 godina.

1.4.1.1. Mehanizam djelovanja

Osnovne teorije koje se odnose na primarni uzrok bolesti su: kolinergična hipoteza, amiloidna hipoteza, *τ*-hipoteza, oksidacijski stres, itd.

- KOLINERGIČNA HIPOTEZA – temelji se na pretpostavci da je AD uzrokovana poremećajem metabolizma ACh koji ima utjecaj na učenje i pamćenje. Smatra se i da dolazi do manjka enzima kolin-acetil-transferaze, zaslužnog za sintezu ACh te kako se povećanjem njegove koncentracije može utjecati na ublažavanje simptoma AD.

- AMILOIDNA HIPOTEZA – hipoteza amiloidne kaskade
  Ovom se hipotezom pretpostavlja da A*β*-peptid ima središnju ulogu u patogenezi AD, odnosno da nakupine i naslage (plakovi) peptida pronađeni na mozgu oboljelih od AD imaju toksičan učinak na zdrave neurone i uzrokuju njihovo odumiranje. Provedena su brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja na osnovu kojih je zaključeno da stupanj oštećenja stanica ovisi o količini nastalog A*β*-peptida kao i o njegovim karakteristikama.

- *τ*-HIPOTEZA – temelji se na pretpostavci da dolazi do hiperfosforilacije *τ*-proteina koji se odvaja od mikrotubula te tako direktno dovodi do degradacije mikrotubula nakon čega se spaja s drugim istovrsnim proteinima stvarajući neurofibrilarne petlje (NFP). Jedini nedostatak ove teorije je da nije utvrđeno je li hiperfosforilacija uzrok ili posljedica AD s obzirom na to da se *τ*-petlje javljaju i kod drugih bolesti.

- OKSIDACIJSKI STRES – stanje karakterizirano neravnotežom između nastanka slobodnih radikala (najčešće reaktivnih kisikovih ili reaktivnih dušikovih vrsta) i oksidacijske obrane unutar stanica.

1.4.1.2. Liječenje Alzheimerove bolesti

Lijek za AD još uvijek ne postoji s obzirom na to da i dalje nije jasno što uzrokuje bolest. Postoje razne metode i načini ublažavanja simptoma (inhibitorima kolinesteraza) koji se istražuju, ali ništa nije polučilo izlječenje. Strategije borbe protiv AD uključuju:

- terapije temeljene na τ-proteinu (smanjenje toksičnosti hiperfosforiliranog τ-proteina koji stvara neurofibrilarne petlje),
- uklanjanje Aβ-peptida pasivnom (koristeći gotova protutijela) i aktivnom (stvaranje cjepiva) imunizacijom ,
- sprječavanje nastanka Aβ-peptida pomoću inhibitora γ- i β- sekretaza,
- intravenskim imunoglobulinima.

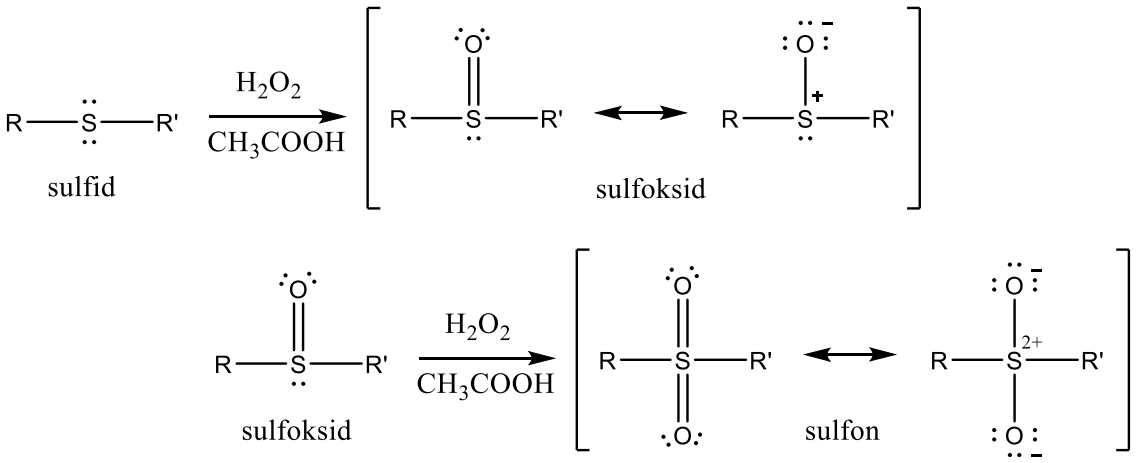
***Tablica 2**. Uloga inhibitora AChE u liječenju Alzheimerove bolesti* [4]

INHIBITOR AChE	ULOGA
TAKRIN	Prvi lijek u terapiji AD, akridinski spoj, brzi reverzibilni inhibitor i AChE i BChE
DONEPEZIL	Piperidinski inhibitor kolinesteraza, selektivni je inhibitor AChE, nije štetan za jetra, uzrokuje nuspojave
RIVASTIGMIN	Inhibira kolinesteraze u dijelovima mozga s najvećim kolinergičnim deficitom kod AD pacijenata, od nuspojava izaziva mučninu i povraćanje
GALANTAMIN	Pokazuje jaku *in vitro* AChE inhibitorsku aktivnost, lijek za rane faze AD, karakterizira ga selektivnost, kompetitivnost prema AChE, dugo djelovanje i reverzibilnost

1.5. Sulfidi (tioeteri)

Sulfidi se također zovu tioeteri jer su sumporovi analozi etera. Sulfidi, kao i tioli, imaju jaki karakteristični miris. Miris dimetil-disulfida podsjeća na miris kamenica koje su predugo čuvane u hladnjaku. Uvriježena imena sulfida slična su imenima etera, uz napomenu da se riječ „eter“ zamjenjuje riječju „sulfid“. Prema supstitucijskoj nomenklaturi u imenima odgovarajućih etera „alkoksi“ se zamjenjuje s „alkiltio“. Primjerice, dimetil-disulfid, fenil-metil-sulfid, 4-etiltio-2-metilpent-2-en.

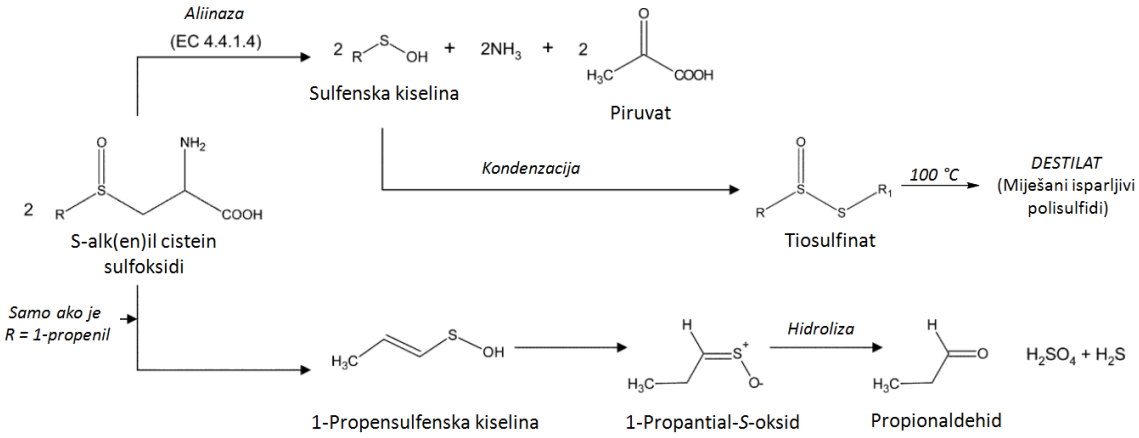
Sulfidi su reaktivniji od etera. U sulfidima vanjska ljuska atoma sumpora ne mora biti popunjena, pa sumpor može tvoriti jake veze s kisikom, pa se sulfidi lako oksidiraju do sulfoksida i sulfona. Sulfoksidi i sulfoni prikazuju se hipervalentnim strukturama s dvostrukim vezama ili nabijenim jednostrukim vezama, kao što je niže prikazano na slici 10..[17]



Slika 10. *Hipervalentne strukture sulfoksida i sulfona* [17]

1.5.1. Organski sulfidi iz roda *Allium*

Allium (Amaryllidacea) je široka skupina zeljastih biljaka koja predstavlja prirodan i bogat izvor organosumporovih spojeva. Većina sumporovih spojeva pronađenih u biljkama su hlapljivi spojevi, izrazito neugodnog mirisa.



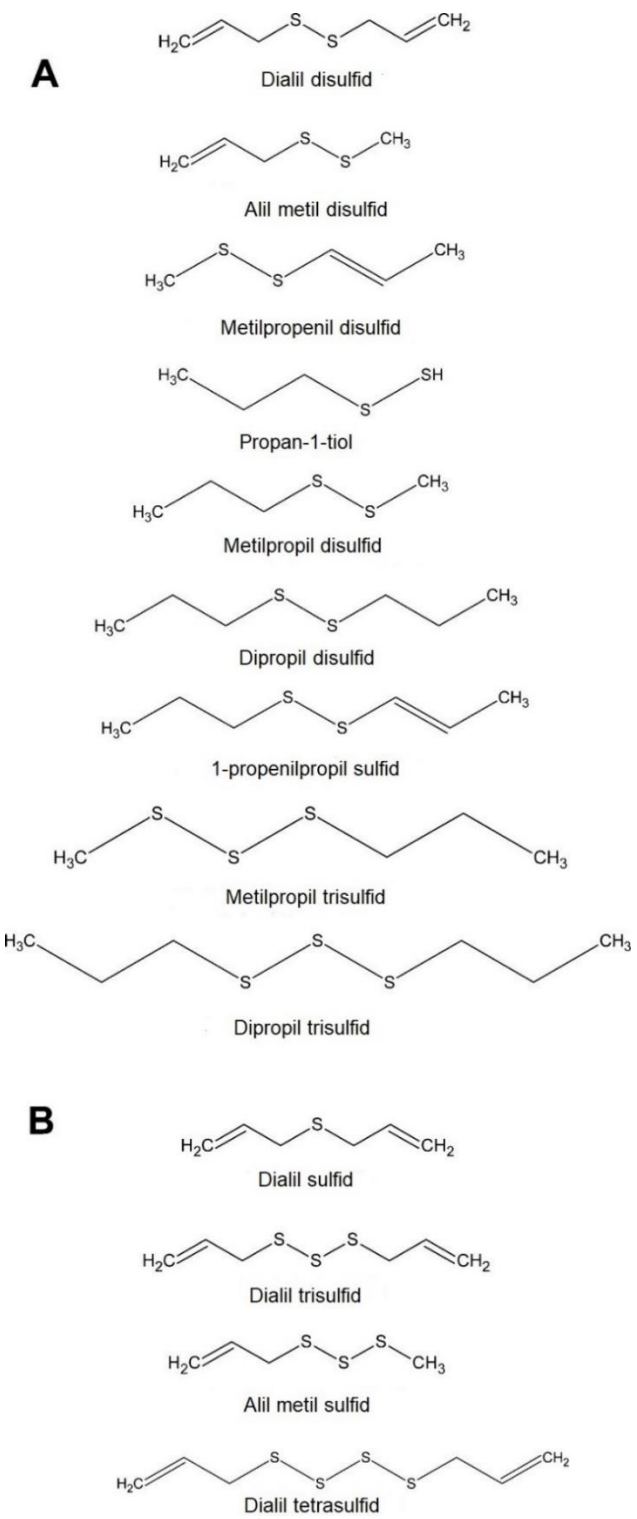
Slika 11. *Shema razvoja spojeva pri različitim uvjetima* [19]

Prema svom obliku i uvjetima u kojima se uzorak obrađuje, spojevi se mogu podijeliti u 3 kategorije:

1. vršne pare – spojevi proizvedeni pri sobnoj temperaturi nakon rezanja ili homogenizacije *Allium* tkiva
2. produkti razgradnje dobiveni iz tiosulfinata pri sobnoj temperaturi
3. uljne komponenete – spojevi dobiveni termičkom obradom kao što je parna destilacija

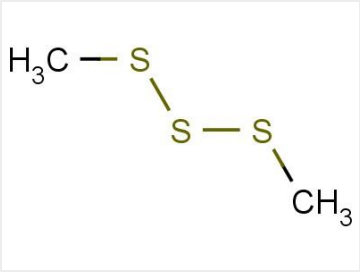
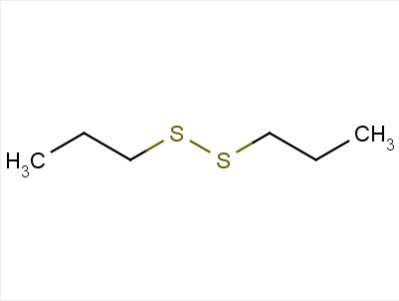
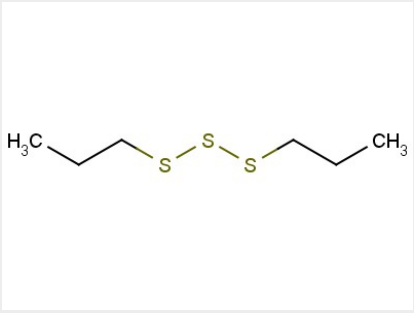
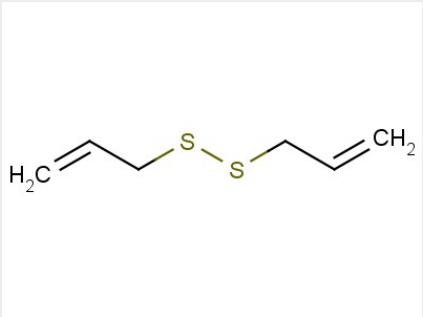
Enzim aliinaza transformira *S*-alk(en)il-L-cistein sulfoksid u početku stvarajući alk(en)ilsulfenske kiseline. Kondenzacijskim reakcijama sulfenske kiseline daju tiosulfinat, reaktivni međuprodukt. Alicin (kao i ostali tiosulfinati) je vrlo nestabilan spoj koji se dalje pregrađuje i tako stvara različite sumporove spojeve. Zbog svoje termičke nestabilnosti, tijekom destilacije, alicin se razgrađuje na polisulfide (dialil-disulfid i dialil-trisulfid) koji su odgovorni za karakterističan miris eteričnog ulja. Svi identificirani spojevi u uljima dobivaju se termičkom razgradnjom tiosulfinata. Na

sobnoj temperaturi alicin se može razgraditi tako stvarajući sumporov dioksid (SO_2), dimetil-trisulfid i dialil mono-,di- i trisulfid.[19]



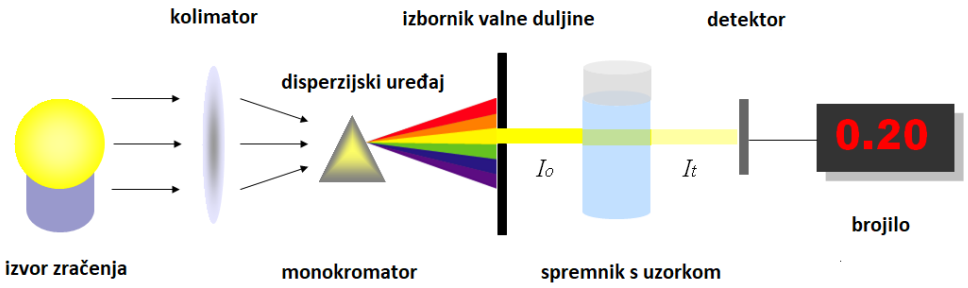
Slika 12. *Sulfidi identificirani u vršnim parama oštećenih Allium tkiva: (A) crvenog luka i (B) češnjaka* [18]

Tablica 3. *Odabrani organski sulfidi i njihove značajke*

	STRUKTURA	MOLEKULSKA FORMULA	MOLEKULSKA MASA	KARAKTERISTIKE
DIMETIL-TRISULFID		**$C_2H_6S_3$**	126,26 g/mol	Zapaljiva tekućina žute boje, neugodnog mirisa, dobiva se iz biljke poznate pod nazivom "mrtvi konj"
DIPROPIL-DISULFID		**$C_6H_{14}S_2$**	150,298 g/mol	Sastojak eteričnih ulja iz *Alliuma*, sredstvo za poboljšavanje okusa, izrazito neugodnog mirisa
DIPROPIL-TRISULFID		**$C_6H_{14}S_3$**	182,358 g/mol	
DIALIL-DISULFID		**$C_6H_{10}S_2$**	146,28 g/mol	Žućkasta tekućina netopiva u vodi, ima snažan miris češnjaka, dobiva se tijekom dekompozicije alicina

1.6. Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je analitička tehnika kojom se mjeri apsorpcija emitiranog elektromagnetskog zračenja kada se određeni uzorak podvrgne zračenju. Osnovni princip metode je da svaki spoj apsorbira ili prenosi svjetlo preko određenog raspona valne duljine. Uređaj koji se primjenjuje za mjerenje intenziteta apsorbirane svjetlosti naziva se spektrofotometar.



Slika 13. *Shematski prikaz spektrofotometra* [22]

Spektrofotometar se, u osnovi, sastoji od dvije vrste uređaja: spektrometra i fotometra. Spektrometar je uređaj koji proizvodi, raspršuje i mjeri svjetlost dok fotometar predstavlja fotoelektrični detektor kojim se mjeri intenzitet svjetlosti.

Dio upadnog zračenja koje prolazi kroz otopinu u omjeru s ukupnim upadnim zračenjem se naziva transmitancija (T) ili propusnost otopine:

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

P_o = ulazna snaga zračenja
P = snaga zračenja nakon apsorpcije

Transmitancija je logaritamski povezana s apsorbancijom (A):

$$A = -\log (T) = -\log (P/P_0) = \log (P_o/P) \qquad (2)$$

gdje apsorbancija predstavlja količinu apsorbiranih fotona, a definira se kao logaritamski odnos zračenja koje je prošlo kroz otopinu (P) i upadnog zračenja (P_0).

Ako je vrijednost apsorbancije poznata, preko Lambert-Beerovog zakona moguće je odrediti nepoznatu koncentraciju vrste.

Lambert-Beerov zakon predstavlja linearni odnos između apsorbancije i koncentracije vrste koja apsorbira elektromagnetsko zračenje:

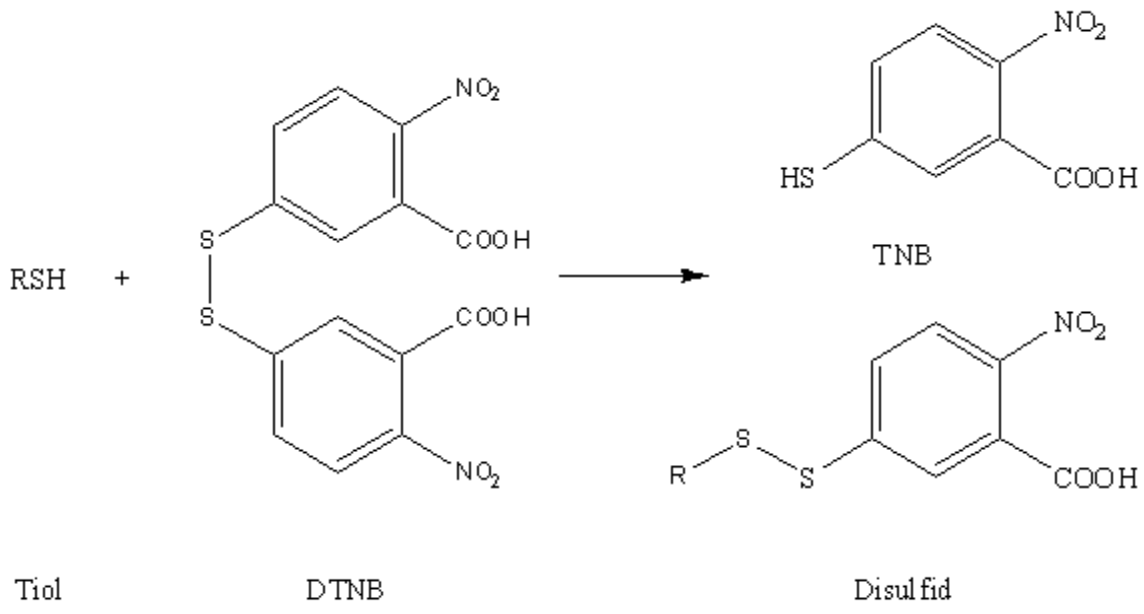
$$A = \log (P_0/P) = abc \qquad (3)$$

gdje je a molarna apsorpcijska sposobnost (apsorpcijski koeficijent), b duljina puta zračenja kroz uzorak i c koncentracija apsorbirajuće vrste.[22,24]

1.6.1. Metoda po Ellmanu

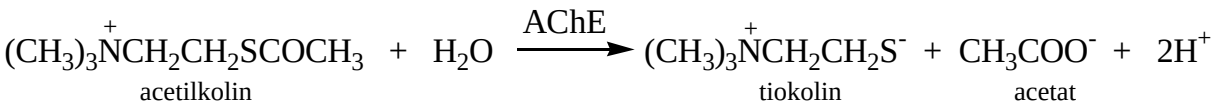
Određivanje inhibicijske sposobnosti kolinesteraza može se izvoditi na 2 načina: *in vivo* i *in vitro*. Uglavnom je riječ o spektrofotometrijskim metodama od kojih se najviše primjenjuje metoda po Ellmanu (*in vitro*).

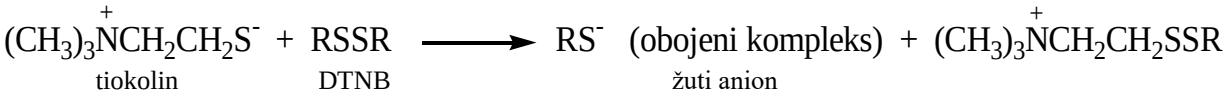
Ellmanova metoda je jednostavna spektrofotometrijska metoda kojom se mjeri aktivnost kolinesteraza (AChE i BChE). Metoda se temelji na reakciji između Ellmanovog reagensa, DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva) kiselina) i tiolne skupine (jedan od produkata enzimatske hidrolize acetiltiokolina, ATCh). Produkt reakcije je 2-nitro-5-tiobenzojeva kiselina (TNB) koja u vodi, pri neutralnom ili alkalijskom pH, ionizira u TNB^- anion. Nastali TNB^- anion je intenzivno žute boje. Apsorpcijski maksimum DTNB-a je na valnoj duljini od 320 nm, dok se apsorpcijski maksimum oslobođenog aniona nalazi na valnoj duljini od 412 nm. Metoda po Ellmanu je brza metoda kod koje se dodatkom 1 mola tiola oslobađa 1 mol TNB^-.[23]



Slika 14. *Mehanizam reakcije Ellmanovog reagensa i tiolne skupine* [4]

Dobivanje obojenog kompleksa se odvija prema sljedećim reakcijama:





2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Određivanje inhibicijske sposobnosti enzima acetilkolinesteraze metodom po Ellmanu

Metodom po Ellmanu mjeri se aktivnost enzima acetilkolinesteraze na osnovi reakcije Ellmanovog reagensa, DTNB-a i tiokolina. Reakcijom se oslobađa žuto obojeni kompleks, anion 2-nitro-5-tiobenzoat, TNB^-.

Osnovne kemikalije korištene u postupku rada:

- enzim acetilkolinesteraza – iz elektrofora električne jegulje, tip V-S
- acetiltiokolin jodid (ATChI) – supstrat enzima
- DTNB (5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzojeva kiselina]) – tiolni reagens

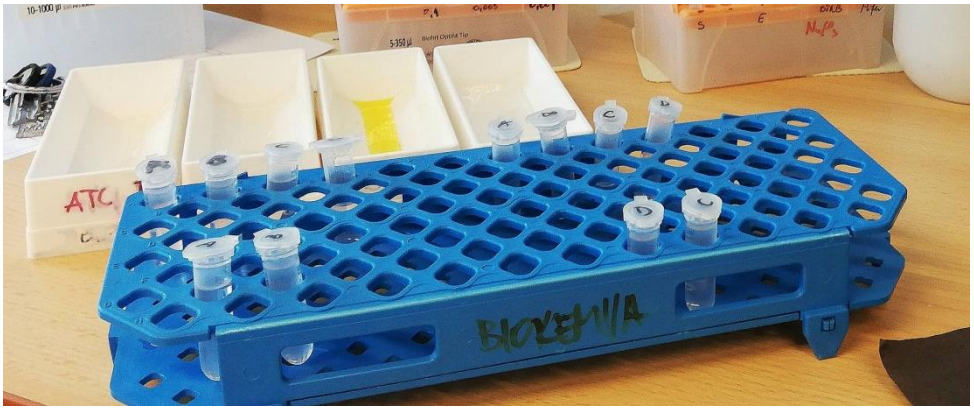
2.1.1. Priprema kemikalija

Za potrebe mjerenja pripravljene su sljedeće otopine:

- fosfatni pufer (pH=7 i pH=8; 0,1 M)
- tiolni reagens DTNB otopljen u puferu pH=7+0,12 mM $NaHCO_3$ konačne koncentracije u sustavu 0,3 mM
- enzim AChE otopljen u puferu pH=8, konačne aktivnosti 0,03 U/mL
- otopina supstrata ATChI u puferu pH=8, konačne koncentracije u sustavu 0,5 mM
- otopine uzoraka (inhibitora) sulfida u etanolu početne koncentracije (c=100 Mm): 12,626 mg/mL; 15,032 mg/mL; 18,238 mg/mL; 14,628 mg/mL

Tablica 4. *Početne masene koncentracije inhibitora*

Uzorak	Naziv	masa, m (mg)	volumen, V (mL)	masena koncentracija, γ (mg/mL)
A	dimetil-trisulfid	63,13	5	12,626
B	dipropil-disulfid	75,16	5	15,032
C	dipropil-trisulfid	91,19	5	18,238
D	dialil-disufid	73,14	5	14,628



Slika 15. *Kadice s pripremljenim otopinama i otopine uzoraka različitih koncentracija*

Tablica 5. *Priprema kemikalija*

Kemikalije	Osnovna otopina	Konačna koncentracija
DTNB	13,079 mg u 5 mL pufera (pH=7+0,12 mM $NaHCO_3$)	0,3 mmol/L
AChE	6,6 µL (500 U) u 5 mL pufera (pH=8)	0,03 U/mL
ATChI	15,9 mg u 5 mL pufera (pH=8)	0,5 mmol/L
Uzorak/EtOH		različite konc./4,36 %

2.1.2. Postupak rada

U svakoj jažici se reakcijska smjesa sastoji od:

- 180 µL 0,1 mol/L fosfatnog pufera pH=8
- 10 µL 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzojeve kiseline) – DTNB, konačne koncentracije 0,3 mmol/L
- 10 µL acetilkolinesteraze - AChE, konačne koncentracije 0,03 U/mL
- 10 µL acetiltiokolinjodida - ATChI, konačne koncentracije 0,5 mmol/L
- 10 µL uzorka određene koncentracije otopljenog u etanolu ili čistog etanola u slučaju kontrole



Slika 16. *Mikrotitarska pločica (96 jažica)*

Tablica 6. *Shema otopina u eksperimentu*

	KONTROLA H_2O	**BL H_2O**	**KONTROLA ETOH**	**BL EtOH**	**UZORAK**	**BL UZORAK**
PUFER	190	200	180	190	180	190
DTNB	10	10	10	10	10	10
AChE	10	/	10	/	10	/
UZORAK/EtOH	/	/	0/10	0/10	10/0	10/0
ATChI	10	10	10	10	10	10

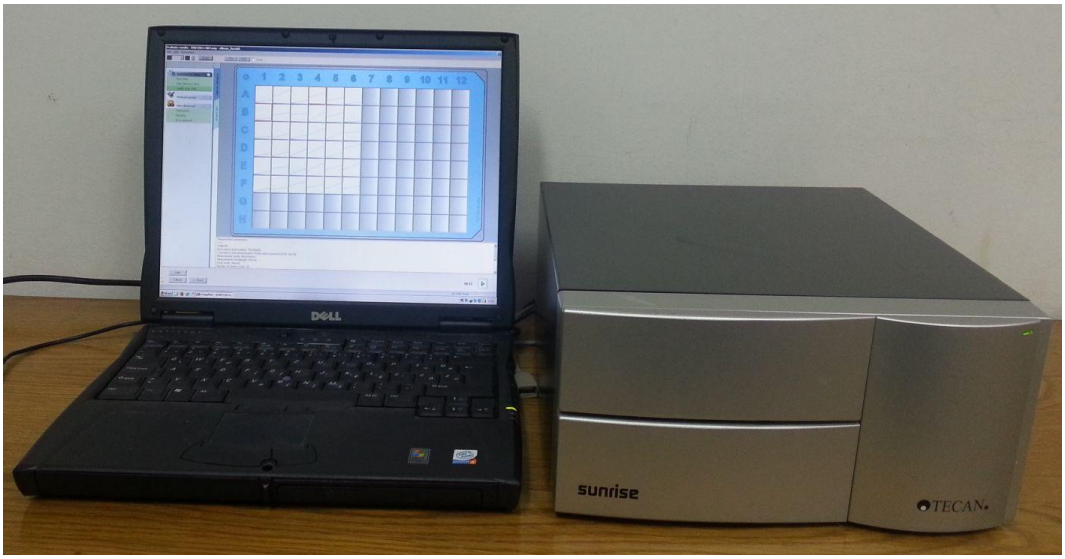
BL – slijepa proba

Pripremljene kemikalije se otpipetiraju u jažice prema shemi iz tablice 6, s tim da se supstrat acetiltiokolin (ATChI) dodaje neposredno prije početka mjerenja jer njegovim dodatkom započinje reakcija. Ukupni volumen smjese iznosi 220 μL. Ne-enzimska hidroliza praćena je tzv. "blank" mjerenjima odnosno slijepim probama.

Za uzorke sulfida bilo je potrebno izvršiti razrjeđivanje jer je njihova prisutnost pri većim koncentracijama izazvala zamućenje reakcijske smjese.
Uređaj na kojem se vršilo mjerenje je višekanalni čitač mikrotitarskih pločica "Sunrise" (Tecan, GmbH, Austrija) na valnoj duljini od 405 nm uz automatsko miješanje i pohranjivanje podataka na računalo.

Tablica 7. *Koncentracije uzoraka sulfida nakon razrjeđivanja*

	Masena koncentracija, γ (mg/mL)			
koncentracija,c (mM)	**A**	**B**	**C**	**D**
50	6,313	7,516	9,119	7,314
25	3,157	3,758	4,559	3,657
12,5	1,579	1,879	2,279	1,829
6,25	0,789	0,939	1,139	0,914
3,125	0,395	0,469	0,569	0,457



Slika 17. *Višekanalni čitač mikrotitarskih pločica "Sunrise" (Tecan, GmbH, Austrija)*

Inhibicijska sposobnost enzima (postoci inhibicije) računa se po formuli:

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

A_K = apsorbancija test otopine

A_A = apsorbancija kontrolnog uzorka.

3. REZULTATI

Za određivanje inhibicije enzima acetilkolinesteraze korišteni su uzorci sulfida (inhibitori) različitih masenih koncentracija. Pripremljene otopine uzoraka dodaju se prema shemi iz tablice 6. Pri većim koncentracijama dodatak pojedinih uzoraka sulfida izazvao je zamućenje u jažicama stoga je otopine bilo potrebno razrijediti do koncentracije koja je polučila rezultat.

Iz izračunatih postotaka inhibicije prema tablici 8, vidljivo je da uzorak C (dipropil-trisulfid) ne pokazuje sposobnost inhibicije enzima AChE na niti jednoj od navedenih koncentracija. Maksimalni učinak inhibicije je pokazao uzorak A (dimetil-trisulfid) pri koncentraciji od 568 µM s postotkom inhibicije koji iznosi 40,23 %.

Tablica 8. *Postoci inhibicije za različite koncentracije sulfida*

		Koncentracija, c (µM) u 10 µL od ukupnog V (220 µL)				
Uzorak		**2273**	**1136**	**568**	**284**	**142**
A	**Postotak inhibicije, %**	/	/	40,23	9,05	/
B		/	/	/	/	8,12
C		/	/	/	/	/
D		/	/	/	23,59	/

A – dimetil-trisulfid, B – dipropil-disulfid, C – dipropil-trisulfid, D – dialil-disulfid

4. RASPRAVA

Cilj ovog rada je bio ispitati sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) odabranim organskim sulfidima (inhibitorima). Ovi spojevi se pronalaze u zeljastim biljkama roda *Allium,* a karakterizira ih vrlo neugodan miris poput luka ili češnjaka.

Pripremljena su 4 uzorka inhibitora različitih koncentracija. Inhibicijska sposobnost AChE je određena spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu praćenjem porasta apsorbancije obojenog kompleksa (žuti anion). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da odabrana skupina organskih sulfida ne pokazuje zadovoljavajuću sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze.

Dodatak pojedinih uzoraka u jažice izazvao je zamućenje pripremljenih otopina što je spektrofotometru stvorilo poteškoće prilikom mjerenja. Stoga je uzorke bilo potrebno razrijediti do koncentracije koja je rezultirala određenim postotkom inhibicije.

Najveći postotak inhibicije, pokazao je dimetil-trisulfid (uzorak A) pri koncentraciji od 568 μM i iznosi 40,23 %, dok dipropil-trisulfid (uzorak C) ne inhibira pri niti jednoj od navedenih koncentracija.

5. ZAKLJUČAK

- Metodom po Ellmanu ispitana je inhibicijska sposobnost određenih organskih sulfida na enzim acetilkolinesterazu. Iz dobivenih rezultata zaključeno je kako niti jedan od 4 odabrana sulfida ne pokazuje zadovoljavajuću inhibicijsku sposobnost.

- Maksimalna inhibicija enzima postignuta je pri koncentraciji dimetil-trisulfida od 568 μM i iznosi 40,23%. Smanjenjem koncentracije inhibitora opada i njegova djelotvornost.

- Uzorak dipropil-trisulfida nije pokazao inhibicijski učinak (nije postignut rezultat pri različitim koncentracijama inhibitora)

6. LITERATURA

1. URL:http://tehnika.lzmk.hr/tehnickaenciklopedija/enzimi.pdf (14.06.2019.).
2. URL:https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/3a78e1cd-1710-4359-a37e-bf5c03cf6890/kemija-2/m03/j02/index.html (15.06.2019.).
3. I. Bogut, S. Đumlija, K. Lukačević, M. M. Ilić, *Udžbenik iz biologije za prvi razred gimnazije,* Alfa d.d, Zagreb, 2014.
4. F. Burčul, *Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae*, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2014.
5. K. Krejčir, *Određivanje antioksidacijske aktivnosti i ispitivanje sposobnosti inhibicije kolinesteraza vodenog ekstrakta i eteričnog ulja chia sjemenki*, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2018.
6. A. Bodač, *Inhibicijsko djelovanje seskviterpena (β-kariofilena i kariofilen oksida) na aktivnost acetilkolinesteraze*, Završni rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2016.
7. M. J. Michelson, E. V. Zeinal, *Acetylcholine: An Approach to the Molecular Mechanism of Action,* Pergamon press, Australia, 1973.
8. N. J. Woolf, *J. Mol. Neurosci.* **30** (2006) 219-222.
9. URL: https://www.etsy.com/hk-en/listing/278910478/lampworked-glass-acetylcholine-molecule (15.06.2019.).
10. S. K. Taradi, I. Andreis, *Guyton i Hall, Medicinska fiziologija*, hrvatsko izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2012.
11. A. Bosak, M. Kalinić, Z. Kovarik, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **62** (2011) 175-190.
12. URL: https://www.wikidata.org/wiki/Q410595 (16.06.2019.).
13. V. Simeon, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **23** (1972) 29-39.
14. M. Malnar, M. Košiček, S. Hećimović, *Medicina* **45** (2009) 234-243.
15. I. Gašparović, N. Starčević-Čizmarević, O. Perković, I. Antončić, M. Kapović, S. Ristić, *Med. flumin.* **49** (2013) 144-156.

16. URL:http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/neurologija/delirij-i-demencija/alzheimerova-bolest (17.06.2019.).
17. L. G. Wade, *Organska kemija,* Goran Bukan (ur.), Školska knjiga, Zagreb, 2017., str. 642-643.
18. P. Rose, M. Whiteman, P. K. Moore, Y. Z. Zhu, *Nat. Prod. Rep.* **22** (2005) 351-368.
19. M. Matić, *Kemija Alliuma: GC-MS analiza tiosulfinata u četiri odabrane biljne vrste*, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2017.
20. URL: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/29109 (01.07.2019.).
21. URL: https://www.scbt.com/scbt/home (01.07.2019.).
22. URL:https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Kinetics/Reaction_Rates/Experimental_Determination_of_Kinetcs/Spectrophotometry (01.07.2019.).
23. G. L. Ellman, D. K. Courtney, V. Andres, R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.* **7** (1961) 88-95.
24. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler*, Osnove analitičke kemije,* Školska knjiga, Zagreb, 1999.