Inhibicijsko djelovanje α- i β-jonona na aktivnost acetilkolinesteraze

Grbelja, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:210483

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

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

INHIBICIJSKO DJELOVANJE α- I β-JONONA NA AKTIVNOST ACETILKOLINESTERAZE

ZAVRŠNI RAD

IVA GRBELJA

Matični broj: 249

Split, rujan 2016.

KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

INHIBICIJSKO DJELOVANJE α- I β-JONONA NA AKTIVNOST ACETILKOLINESTERAZE

ZAVRŠNI RAD

IVA GRBELJA

Matični broj: 249

Split, rujan 2016.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

INHIBITORY EFFECT OF α- AND β-IONONE ON THE ACTIVITY OF ACETYLCHOLINESTERASE

BACHELOR THESIS

IVA GRBELJA

Parent number: 249

Split, September 2016

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

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

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 4. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta

Mentor: dr. sc. Franko Burčul, znanstveni suradnik

INHIBICIJSKO DJELOVANJE *α*- I *β*-JONONA NA AKTIVNOST ACETILKOLINESTERAZE

Iva Grbelja, 249

Sažetak: Enzimi su biokatalizatori koji kataliziraju reakcije na način da stabiliziraju prijelazno stanje, najviše energijsko stanje na reakcijskom putu. Enzimi su visoko specifični i po reakcijama koje kataliziraju i po supstratu. Acetilkolinesteraza (AChE) je enzim iz skupine hidrolaza. Njezina je fiziološka uloga hidroliza neuroprijenosnika acetilkolina (ACh) tijekom prijenosa živčanih impulsa. Nalazi se u sinapsama te živčanim i glija stanicama ljudskog mozga.

Alzheimerova bolest se manifestira kao gubitak pamćenja, "izgubljenost" u vremenu i prostoru, nemogućnost samostalnog života, što dovodi do potpune ovisnosti o stalnoj skrbi i njezi druge osobe. Liječenje je ograničeno samo na ublažavanje pojedinih popratnih simptoma, a smatra se da inhibicija acetilkolinesteraze ima ključnu ulogu u ublažavanju simptoma Alzheimerove demencije.

U ovom radu *α*- i *β*-jonon su ispitivani kao inhibitori acetilkolinesteraze. Uočeno je da se povećanjem koncentracije *α*- i *β*-jonona povećava i postotak inhibicije AchE-a. Najveća vrijednost inhibicije za α-jonon postignuta je pri koncentraciji od 90,9 μg mL^{-1} i iznosi 17,1 %, dok je za *β*-jonon pri koncentraciji od 113,6 μg mL^{-1} te iznosi 24,17 %.

Ključne riječi: *α*-jonon, *β*-jonon, acetilkolinesteraza, Alzheimerova bolest, inhibicija.
Rad sadrži: 25 stranica, 13 slika, 6 tablica, 16 literaturnih navoda.
Jezik izvornika: hrvatski.

Sastav Povjerenstva za obranu:

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

Datum obrane: 22. rujna 2016.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

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

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 4.

Mentor: dr. sc. Franko Burčul, research associate

INHIBITORY EFFECT OF *α*- AND *β*-IONONE ON THE ACTIVITY OF ACETYLCHOLINESTERASE

Iva Grbelja, 249

Abstract: Enzymes are biocatalysts that catalyse reactions by stabilizing the transition state, the highest energy state in the reaction pathway. Enzymes are highly specific by the reactions they catalysed, as well as their substrate.

Acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme from the hydrolases group. Its physiological role is the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) during transmission of nerve impulses. It is found in the synapses and the nerve and glial cells of the human brain. Alzheimer's disease is manifested as forgetfulness, disorientation in time and space, the inability of independent living, which leads to total dependence on a constant concern and care from others. Treatment is limited to the alleviation of some accompanying symptoms. Inhibition of acetylcholinesterase plays a key role in alleviating the symptoms of Alzheimer's dementia.

In this study *α*- and *β*-ionone were tested for their inhibition ability on acetylcholinesterase. It has been observed that increasing the concentration of *α*- and *β*-ionone, the percentage of inhibition also increases. The maximum inhibitory activity for *α*-ionone of 17,1 % was reached at 90,9 μg mL^{-1}while *β*-ionone reached 24,17 % at a concentration of 113,6 μg mL^{-1}.

Keywords: *α*- ionone, *β*-ionone, acetylcholinesterase, Alzheimer's dementia, inhibition.
Thesis contains: 25 pages, 13 pictures, 6 tables, 16 literary references.
Original in: Croatian.

Defence committee:

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

Defence date: September 22nd, 2016.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, RuđeraBoškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom znanstvenog suradnika dr. sc. Franka Burčula, tijekom mjeseca lipnja, 2016. godine.

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

Iskreno se zahvaljujem članovima Zavoda za biokemiju, posebno svom mentoru dr. sc. Franku Burčulu na pomoći pri izvedbi eksperimentalnog dijela rada te na korisnim savjetima i uputama prilikom pisanja rada.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na neizmjernoj podršci tijekom studija.

Iva Grbelja

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA :

- **Ispitati učinkovitost *α*- i *β*-jonona na inhibiciju acetilkolinesteraze (AChE) metodom po Ellmanu.**

Sažetak

Enzimi su biokatalizatori koji kataliziraju reakcije na način da stabiliziraju prijelazno stanje, najviše energijsko stanje na reakcijskom putu. Enzimi su visoko specifični i po reakcijama koje kataliziraju i po supstratu. Acetilkolinesteraza (AChE) je enzim iz skupine hidrolaza. Njezina je fiziološka uloga hidroliza neuroprijenosnika acetilkolina (ACh) tijekom prijenosa živčanih impulsa. Nalazi se u sinapsama te živčanim i glija stanicama ljudskog mozga.

Alzheimerova bolest se manifestira kao gubitak pamćenja, "izgubljenost" u vremenu i prostoru, nemogućnost samostalnog života, što dovodi do potpune ovisnosti o stalnoj skrbi i njezi druge osobe. Liječenje je ograničeno samo na ublažavanje pojedinih popratnih simptoma, a smatra se da inhibicija acetilkolinesteraze ima ključnu ulogu u ublažavanju simptoma Alzheimerove demencije.

U ovom radu α- i β-jonon su ispitivani kao inhibitori acetilkolinesteraze. Uočeno je da se povećanjem koncentracije α- i β-jonona povećava i postotak inhibicije AchE-a. Najveća vrijednost inhibicije za α-jonon postignuta je pri koncentraciji od 90,9 μg mL^{-1} i iznosi 17,1 %, dok je za β-jonon pri koncentraciji od 113,6 μg mL^{-1} te iznosi 24,17 %.

Ključne riječi: α-jonon, β-jonon, acetilkolinesteraza, Alzheimerova bolest, inhibicija.

Summary

Enzymes are biocatalysts that catalyse reactions by stabilizing the transition state, the highest energy state in the reaction pathway. Enzymes are highly specific by the reactions they catalysed, as well as their substrate.

Acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme from the hydrolases group. Its physiological role is the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (Ach) during transmission of nerve impulses. It is found in the synapses and the nerve and glial cells of the human brain. Alzheimer's disease is manifested as forgetfulness, disorientation in time and space, the inability of independent living, which leads to total dependence on a constant concern and care from others. Treatment is limited to the alleviation of some accompanying symptoms. Inhibition of acetylcholinesterase plays a key role in alleviating the symptoms of Alzheimer's dementia.

In this study *α*- and *β*-ionone were tested for their inhibition ability on acetylcholinesterase. It has been observed that increasing the concentration of *α*- and *β*-ionone, the percentage of inhibition also increases. The maximum inhibitory activity for α-ionone of 17,1 % was reached at 90,9 μg mL^{-1} while β-ionone reached 24,17 % at a concentration of 113,6 μg mL^{-1}.

Keywords: *α*- ionone, *β*-ionone,acetylcholinesterase, Alzheimer's dementia, inhibition.

Sadržaj

1. UVOD 1
2. OPĆI DIO 2
   2.1. Enzimi 2
      2.1.1. Klasifikacija enzima 3
   2.2. Acetilkolin i acetilkolinesteraza 5
      2.2.1. Struktura i aktivno mjesto AchE 7
      2.2.2. Mehanizam hidrolize ACh 10
   2.3. Alzheimerova bolest 10
   2.4. α- i β-jonon 12
      2.4.1. Biosinteza jonona 13
      2.4.2. Organska sinteza jonona 14
   2.5. Spektrofotometrija 16
      2.5.1. Ellmanova metoda 17
3. EKSPERIMENTALNI DIO 18
   3.1. Priprema kemikalija 18
   3.2. Postupak 19
4. REZULTATI 21
5. RASPRAVA 23
6. ZAKLJUČAK 24
7. LITERATURA 25

1. UVOD

Enzimi su biokatalizatori bez čije se prisutnosti većina reakcija u živim organizmima ne bi odvijala ili bi tekla vrlo sporo. Funkcioniraju na način da snižavaju energiju aktivacije pojedine reakcije te je na taj način ubrzavaju i do milijun puta. Zahvaljujući svom obliku, strukturi, hidrofilnim i hidrofobnim svojstvima, enzimi su veoma specifični.

Acetilkolinesteraza (AChE) i **butirilkolinesteraza** (BChE) su enzimikoji spadaju u grupu serinskih esteraza. AChE hidrolizira acetilkolin (ACh) i povezana je sprijenosom živčanih impulsa te redovito nalazimo u sinapsama dok se BChE, poznata kao i plazma kolinesteraza ili pseudokolinesteraza, hidrolizira butirilkolin, sintetizira u jetri i nalazi u većoj količini u plazmi.

Acetilkolinesteraza je od iznimne važnosti za očuvanje homeostaze organizma budući da je njen supstrat, acetilkolin, jedan od prijenosnika živčanih impulsa. Inhibitori acetilkolinesteraze su tvari koje sprječavaju razgradnju neuroprijenosnika acetilkolina i na taj način imaju utjecaj na funkciju mozga. Istraživanja tih spojeva se provode u nadi da se pronađe lijek za neurodegenerativne poremećaje poput Alzheimerove demencije.

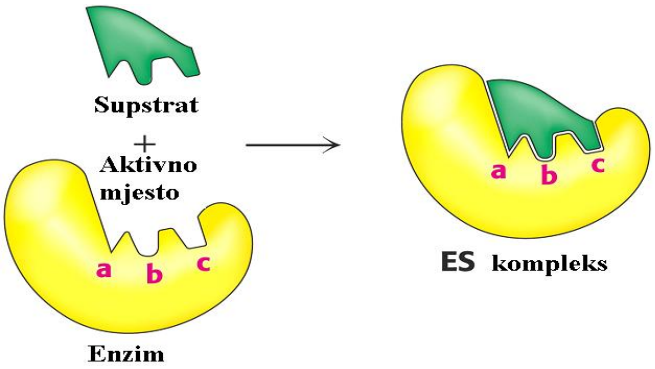
U ovom radu je istraživano inhibicijsko djelovanje α- i β-jonona, spojeva nastalih degradacijom karotenoida.

2. OPĆI DIO

2.1. Enzimi

Enzimi su biokemijski katalizatori koji po svom sastavu spadaju u grupu globularnih proteina. Gotovo svi poznati enzimi su proteini, uz iznimku malog broja katalitičkih RNA molekula. Visoko su specifični po reakcijama koje kataliziraju kao i po odgovarajućim supstratima, tako pojedini enzim najčešće katalizira samo jednu ili nekoliko srodnih reakcija. Molekule koje sudjeluju u reakciji (supstrat) vežu se na specifično aktivno mjesto u molekuli enzima stvarajući kratkoživući međuprodukt. Supstrat koji se veže za enzim ima točno određeni oblik, a aktivno mjesto enzima je modelirano tako da se supstrat savršeno prostorno uklopi, a da se u isto vrijeme onemogućuje vezivanje drugih molekula neodgovarajućeg oblika. Taj način vezivanja se naziva princip "ključ - brava". Teorija induciranog pristajanja smatra da se aktivno mjesto u potpunosti prilagodi supstratu (oblikom) tek kada dođe do vezivanja supstrata na enzim.

Za aktivnost mnogih enzima potrebni su i kofaktori. Kofaktori ili koenzimi su malene proteinske čestice vezane za enzim jačim ili slabijim vezama. Enzim bez kofaktora se naziva apoenzim, a cjelokupan, katalitički aktivan enzim je holoenzim. Enzimi ubrzavaju reakcije na način da olakšavaju postizanje prijelaznog stanja, odnosno smanjuju energiju aktivacije koju je potrebno prijeći da bi se reakcija odvila. Aktivnost mnogih enzima se može inhibirati vezanjem malih molekula i iona. Inhibicija enzimske aktivnosti glavni je kontrolni mehanizam u biološkim sustavima te pruža uvid u mehanizam djelovanja enzima.



Slika 1. Princip "ključ-brava"

2.1.1. Klasifikacija enzima

Do danas je poznato i klasificirano oko 4000 enzima. S obzirom na velik broj, biokemičari ih odavno pokušavaju sistematizirati. Kao osnovu za klasifikaciju uziman je tip reakcije koju kataliziraju, kemijski sastav supstrata, tip veze koju cijepaju pa i sam kemijski sastav koenzima. Klasifikacija se radila prema različitim kriterijima i na različite načine. Međunarodna unija je 1961. godine preporučila novu klasifikaciju i nomenklaturu enzima, tako da se sada enzimi dijele u 6 klasa prema reakcijama koje kataliziraju. Svaka klasa se dijeli na više podklasa, a svaka podklasa na više skupina te na kraju svaka skupina na više podskupina. Podjela enzima po klasama prikazana je u tablici 1. Prema ovoj klasifikaciji svaki enzim ima šifru od 4 broja. Prvi broj označava klasu, drugi podklasu, treći skupinu, a četvrti podskupinu.[1]

Tablica 1. Klasifikacija enzima[1]

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

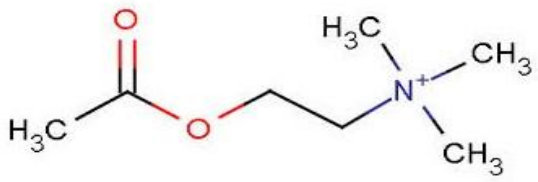
Primjer klasifikacije enzima koji je istraživan u ovom radu bila bi:

EC 3.1.1.7.

- EC →*engl. Enzyme Commission number*
- EC 3 → Hidrolaze
- EC 3.1. → Djeluju na esterske veze
- EC 3.1.1. → Hidrolaze karboksilnih estera
- EC 3.1.1.7. → Acetilkolinesteraza (djeluje na acetilkolin)

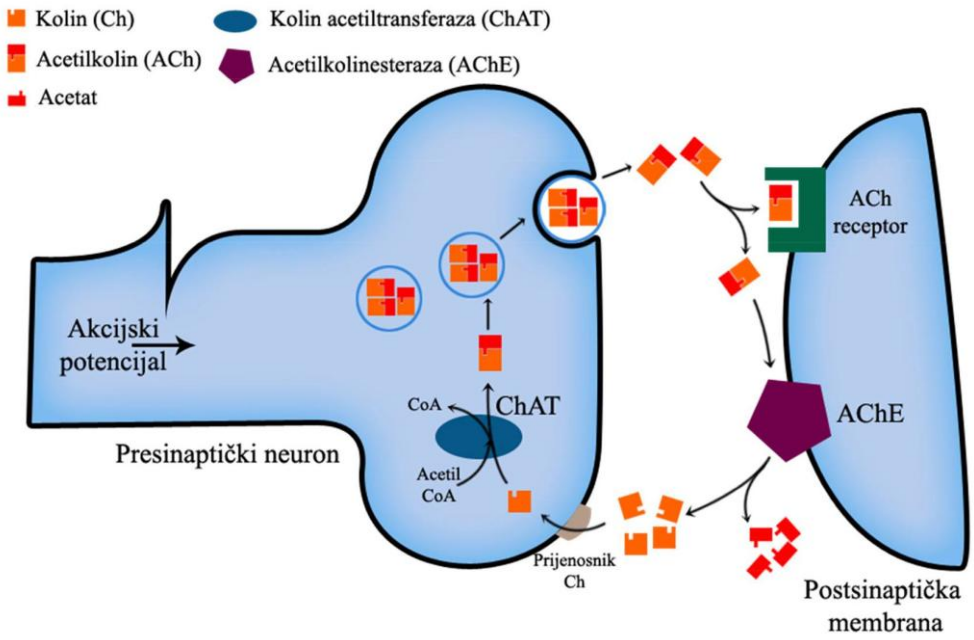
2.2. Acetilkolin i acetilkolinesteraza

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



Slika 2. Acetilkolin

Acetilkolinesteraza (**AChE, 3.1.1.7**) je enzim iz klase hidrolaza, podklase serinskih esteraza i skupine hidrolaza karboksilnih kiselina. AChE možemo naći u živčanim i glija stanicama ljudskog mozga. Njena fiziološka uloga je hidroliza neuroprijenosnika ACh tijekom prijenosa živčanih impulsa (slika 3), koja se može objasniti u nekoliko koraka. Prvo se ACh otpušta iz predsinaptičkog živca u sinaptičku pukotinu zbog akcijskog potencijala koji prolazi stanicom. Potom ACh difundira kroz sinapsu te se veže na ACh receptor (koji kontrolira ulazak K^+ iona u postsinaptički živac ili mišičnu stanicu). Na ovaj način se stvara akcijski potencijal u postsinaptičkoj stanici. Tada AChE brzo hidrolizira ACh i prekida živčani impuls.



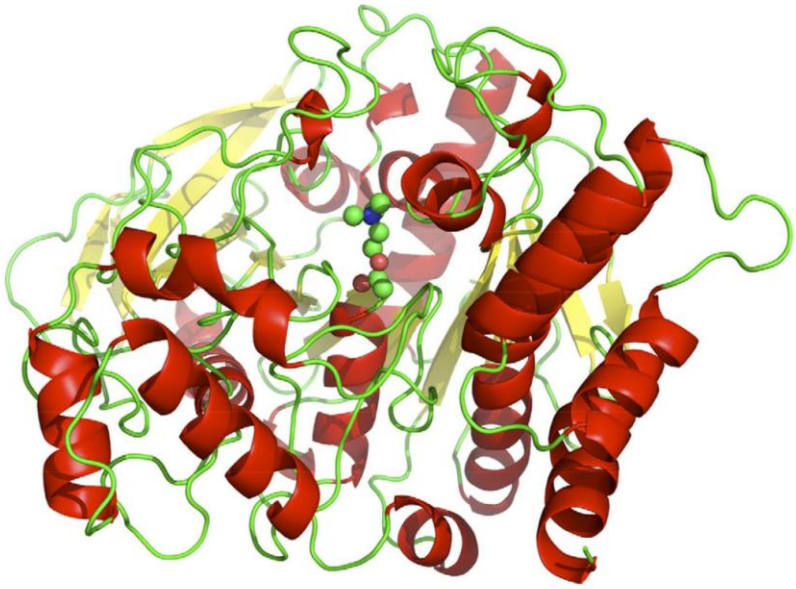
Slika 3. Shematski prikaz prijenosa živčanog impulsa s pred-sinaptičkog neurona napost-sinaptičku membranu[2]

AChE spada u najučinkovitije enzime iz skupine serinskih hidrolaza - brzina hidrolize supstrata je bliska brzinama difuzijski kontroliranih reakcija. ACh-om posredovani prijenosi živčanih impulsa su od životne važnosti jer je iznenadan prekid ovog procesa smrtonosan, a promjene vode do narušavanja kognitivnih i neuromišićnih funkcija, kao npr. u slučaju Alzheimerove bolesti. AChE nije samo enzim koji sudjeluje u kolinergičnom živčanom sustavu nego ima ulogu i u drugim biološkim procesima kao što su neuritogeneza, adhezija i diferencijacija stanica te nastajanje amiloidnih vlakana.[3]

2.2.1. Struktura i aktivno mjesto AchE

Prva molekulska struktura AChE je otkrivena (riješena) rendgenskom strukturnom analizom čime je potvrđeno da je ovaj enzim serinska hidrolaza. AChE je polimorfni enzim, vezan na membrane stanica preko kolagenske uzvojnice, a sastavljen je od globularnih katalitičkih podjedinica, svaka mase 70-80 kDa. Ove podjedinice se grupiraju u oligomerne strukture koje se dijele na dvije klase: globularne strukture (sastavljene od monomera, dimera ili tetramera) i asimetrične strukture (koje se dijele u tri posebne grupe: katalitičke, kolagenske i nekolagenske podjedinice).[4]

Prva otkrivena (riješena) trodimenzionalna struktura AChE (*Torpedo californica*, *Tc*AChE) je pokazala da se katalitička trijada, slična onima u drugim serinskim hidrolazama i proteazama, sastoji od sljedećih aminokiselina: serina (Ser200), histidina (His440) i glutaminske kiseline odnosno glutamata (Glu327). AChE je alosterički enzim što je dokazano kinetičkim istraživanjima. Na alosteričku stranu se vežu određeni supstrati, reverzibilni inhibitori i organofosforni spojevi. Kada je ligand vezan na perifernu stranu, on može sprječavati ulazak supstrata u ždrijelo te tako može promijeniti konformaciju samog aktivnog mjesta. U visokoj koncentraciji ACh sam inhibira, alosteričkim mehanizmom, AChE tako što se veže na periferno mjesto i time mijenja konformaciju aktivnog mjesta te sprječava vezanje u aktivni centar i hidrolizu.



Slika 4. Struktura *Tc*AChE s ACh vezanim u aktivnom mjestu[4]

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

1. periferno mjesto smješteno na rubu ždrijela
2. anionsko mjesto (mjesto vezanja kolina ili hidrofobno mjesto)
3. esterazno mjesto (katalitičko mjesto, katalitička trijada s oksianionskom "rupom")
4. acilni "džep" odgovoran za smještanje acilnog dijela supstrata.

Tablica 2. Uloga strukturnih domena aktivnog mjesta AchE[5]

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

2.2.2. Mehanizam hidrolize ACh

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

2.3. Alzheimerova bolest

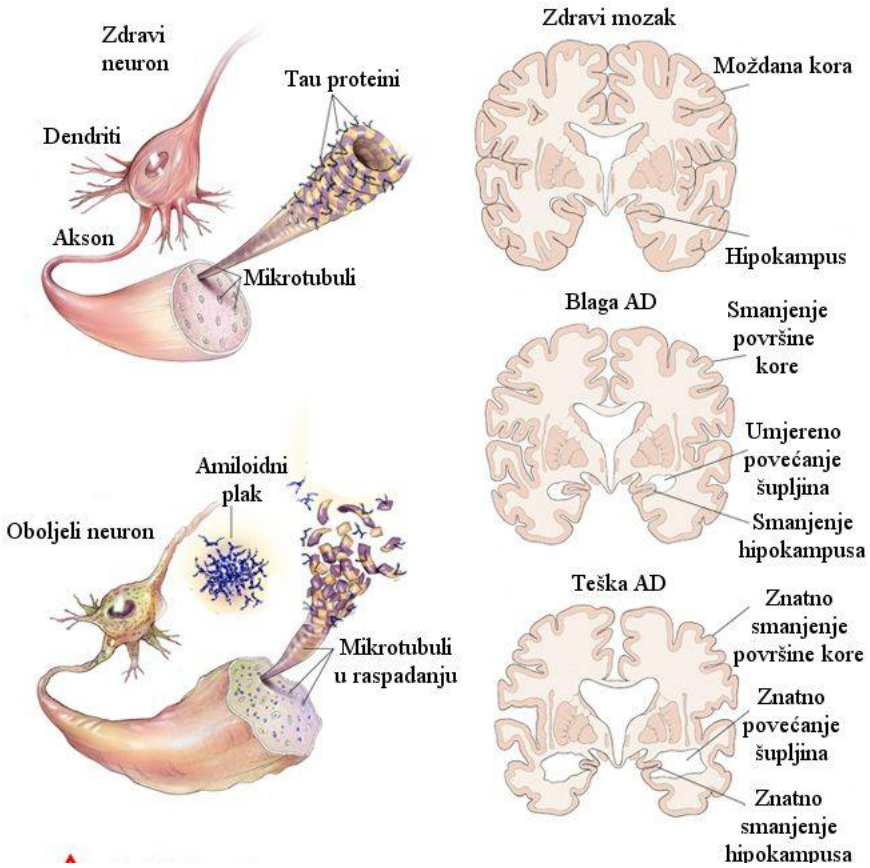
Alzheimerova bolest je degenerativna bolest stanica moždane kore i okolnih struktura. Progresivna je, neizlječiva, sa somatskim komplikacijama i smrtnim ishodom. Alois Alzheimer, njemački liječnik, je 1906. godine po prvi put opisao slučaj bolesti demencije kod jedne od svojih pacijentica, Auguste Deter. Tada je iznio i tipične kliničke simptome poput poremećaja u pamćenju, ali i neuropatološku sliku koja je uključivala senilne plakove i neurofibrilarne snopiće. Alzheimerova bolest je najučestaliji oblik demencije, a najveći rizični čimbenik za nastanak ove bolesti je starost. Kod većine osoba s ovom bolesti prvi simptomi se najčešće javljaju u 6. desetljeću života nakon čega bolest brzo napreduje, a otprilike 5 godina od uočavanja prvih simptoma dolazi do teške demencije. Od postavljanja dijagnoze bolesti bolesnici prosječno žive 5-10 godina.

Alzheimerova bolest narušava važne metaboličke procese koji održavaju neurone zdravima. Ti poremećaji uzrokuju prestanak rada živčanih stanica, gubitak veze s drugim živčanim stanicama i na kraju dolazi do smrti. Uništavanje i smrt neurona dovodi do gubitka pamćenja, promjena u ponašanju i teškoća u obavljanju svakodnevnih aktivnosti.

Nakon desetljeća istraživanja, Alzheimerova bolest je i dalje neizlječiva i time se smatra jednim od najznačajnih zdravstenih izazova. Još uvijek ne postoji odgovarajuće liječenje, stoga se ono uglavnom svodi na odgodu uznapredovalih faza bolesti i ublažavanje simptoma. Obzirom na sve veći broj oboljelih osoba, istraživanja Alzheimerove bolesti su od velike važnosti jer imaju za cilj pronalazak lijeka, sprječavanje nastanka bolesti i smanjenje njene progresije.

U kliničkim pokusima najviše su korišteni i najbolje proučeni kolinomimetici, najčešći inhibitori acetilkolinesteraze. Inhibitori zaustavljaju ili smanjuju aktivnost

acetilkolinesteraze, enzima koji razgrađuju acetilkolin. Acetilkolin je neuroprijenosnik koji ima važnu ulogu u hipokampusu i moždanoj kori u procesima pamćenja. Donepezil, galantamin i rivastigmin su inhibitori kolinesteraza koji se danas koriste u liječenju u ranoj i srednjoj fazi bolesti. Sva tri inhibitora su jednako učinkovita i mogu privremeno poboljšati pamćenje jer održavaju višu razinu acetilkolina u mozgu. Ovi lijekovi su pokazali mala, ali svejedno značajna poboljšanja u obavljanju svakodnevnih aktivnosti i u ponašanju pacijenata. Iako se inhibitori kolinesteraze trenutno najviše koriste u liječenju ove bolesti, oni samo prolazno i kratkotrajno usporavaju progresiju bolesti, i to samo kod nekih bolesnika u ranom stadiju.



Slika 5. Razlika mozga zdrave osobe i osobe oboljele od Alzheimerove bolesti[6]

2.4. *α*- i *β*-jonon

Jononi su serija kemijski sličnih tvari koje su dio grupe spojeva poznatih kao ketoni ruže. Ta grupa sadrži i damaskone te damaskenone. Jononi su aromatični spojevi koji se često nalaze u eteričnim uljima kao npr. u ulju ruže. *β*-jonon značajno doprinosi aromi ruža, unatoč niskoj koncentraciji, pa je stoga važan sastojak parfema. Kombinacija *α*- i *β*-jonona, karakteristična po mirisu ljubičice, koristi se zajedno s drugim komponentama u industriji parfema i aroma.

Karoteni se djelovanjem enzima karotenoid-dioksigenaze mogu metabolizirati u *α*- i *β*-jonon.[7]

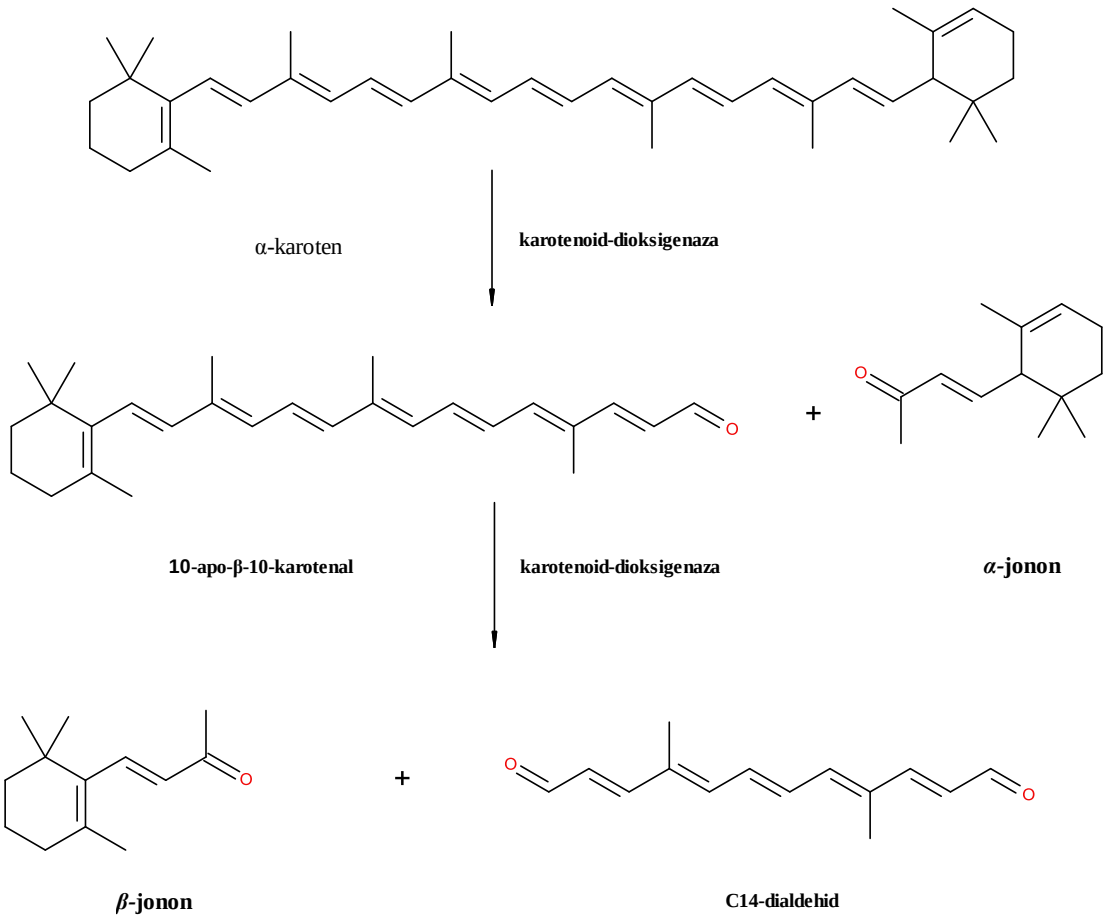
Tablica 3. Svojstva jonona[7]

Naziv po IUPAC-u	**α: (3*E*)-4-(2,6,6-Trimethilcikloheks-2-en-1-il)but-3-en-2-on** **β: (3*E*)-4-(2,6,6-Trimethilcikloheks-1-en-1-il)but-3-en-2-on**
Kemijska formula	$C_{13}H_{20}O$
Molarna masa	192.30 g mol^{-1}
Gustoća	*α*: 0,933 g cm^{-3} *β:* 0,945 g cm^{-3}
Temperatura tališta	*α:* np *β*: - 49° C
Temperatura vrelišta	*α:* np *β*: 126 to 128 °C

*****np - nema podataka

2.4.1. Biosinteza jonona

Karotenoidi su prekursori važnih mirisnih spojeva u cvijeću. Jononi nastaju degradacijom karotenoida. Reakcija je katalizirana karotenoid-dioksigenazom.



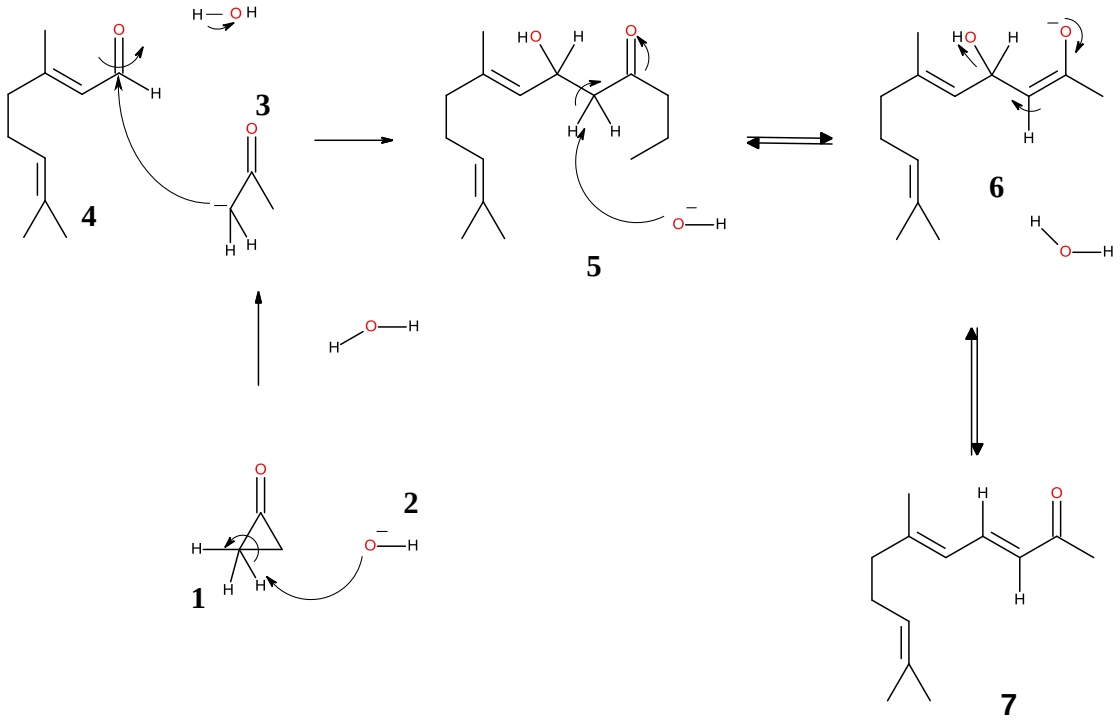
Slika 6. Biosinteza jonona[7]

2.4.2. Organska sinteza jonona

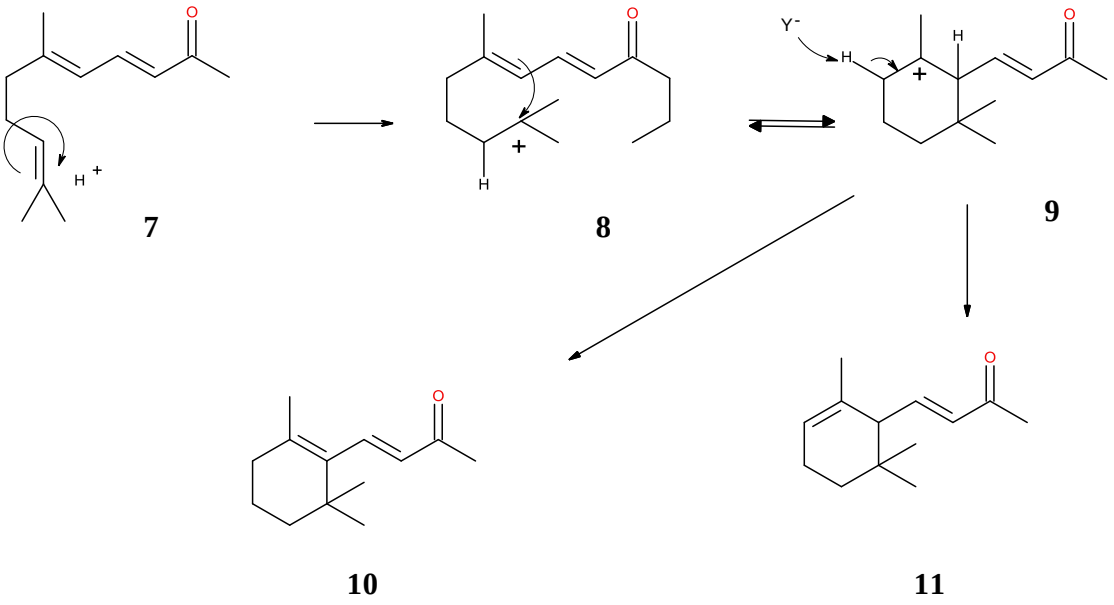
Jononi se mogu sintetizirati iz citrala i acetona mehanizmom aldolne kondenzacije uz pomoć heterogenog katalizatora kalcijevog oksida (slike 7a i 7b).

Nukleofilna adicija karbaniona acetona (3) na karbonilnu grupu citrala (4) je katalizirana pomoću lužine. Produkt aldolne kondenzacije (5) eliminira vodu kroz enolatni ion (6) da bi se formirao pseudojonon (7).

Reakcija se nastavlja s kiselim katalizatorom, gdje se dvostruka veza u pseudojononu otvara i tvori karbokation (8). Potom slijedi reakcija izomerizacije, odnosno preuređenja, koju prati zatvaranje prstena (9). Konačno, atom vodika se izdvaja pomoću akceptora (Y) te stvara ili α-jonon (10) ili β-jonon (11).



Slika 7a. Organska sinteza jonona[7]



Slika 7b. Organska sinteza jonona[7]

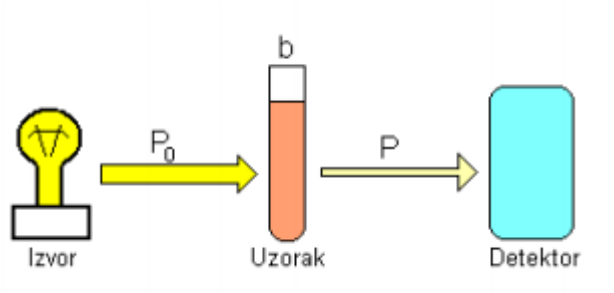
2.5. Spektrofotometrija

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**.

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

$$T = \frac{P}{P_0} \tag{1}$$

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



Slika 8. Prigušivanje snopa zračenja kao rezultat apsorpcije u otopini[8]

Apsorbancija (A) se definira jednadžbom:

$$\mathrm{A} = -\log_{10} \mathrm{T} = -\frac{\log \mathrm{P}}{\mathrm{P_0}} = \frac{\log \mathrm{P_0}}{\mathrm{P}} \tag{2}$$

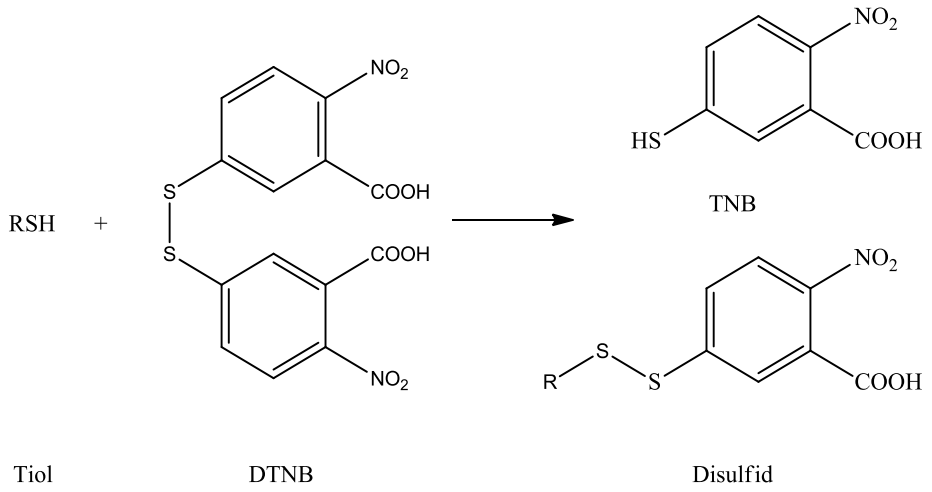
Odnos između izmjerene vrijednosti apsorpcije nekog uzorka i veličine koja se određuje (koncentracija c) poznat je kao **Beerov zakon**:

$$A = \log\frac{P_0}{P} = a \cdot b \cdot c \tag{3}$$

gdje je a - konstanta proporcionalnosti odnosno apsorptivnost (apsorpcijski koeficijent), b - duljina puta zračenja kroz uzorak, a c - koncentracija apsorbirajuće vrste. Budući da je apsorbancija veličina bez dimenzija, jedinice za apsorpcijski koeficijent određuju se uz pretpostavku da je lijeva strana jednadžbe bezdimenzijska.

2.5.1. Ellmanova metoda

Ellmanova metoda je spektrofotometrijska metoda koja se koristi za mjerenje aktivnosti enzima acetilkolinesteraze (AChE). Metoda se temelji na reakciji Ellmanovog reagensa, DTNB (5,5□-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina)) s tiolnim skupinama supstrata koji nastaje djelovanjem AchE, pri čemu nastaje 2-nitro-5-merkaptobenzojeva kiselina (TNB), koja dalje u vodi ionizira u TNB^- anion kod neutralnog ili alkalnog pH. Oslobođeni TNB^- ion ima intenzivno žutu boju. Metoda po Ellmanu se temelji na brzoj reakciji kod koje se dodatkom jednog mola tiola oslobađa jedan mol TNB^--a. Dok je apsorpcijski maksimum DTNB-a pri 320 nm, količina oslobođenog TNB^--a mjeri se kod valne duljine od 412 nm (apsorpcijski maksimum TNB^--a).



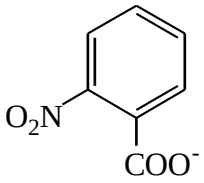
Slika 9. Ellmanova reakcija za određivanje tiola[9]

Ellmanova reakcija za određivanje inhibicijske sposobnosti enzima AChE se odvija prema sljedećim jednadžbama[9]:

$$(CH_3)_3\overset{+}{N}CH_2CH_2SCOCH_3 + H_2O \xrightarrow{AChE} (CH_3)_3\overset{+}{N}CH_2CH_2S^- + CH_3COO^- + 2H^+$$

$$(CH_3)_3\overset{+}{N}CH_2CH_2S^- + RSSR \longrightarrow RS^- \text{ (obojeni kompleks)} + (CH_3)_3\overset{+}{N}CH_2CH_2SSR$$

R =



3. EKSPERIMENTALNI DIO

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 kao inhibitor enzima testirani su *α*-jonon i *β*-jonon. Za ispitivanje sposobnosti inhibicije AChE korištena je modificirana spektrofotometrijska metoda po Ellmanu, kod koje je kao tiolni reagens korišten DTNB.

3.1. 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, koncentracije 0,03 U mL^{-1}
- 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 uzorka (inhibitora) *α*-jonona u etanolu, koncentracija u sustavu: 45,5; 56,8; 68,1; 79,5 i 90,9 μg mL^{-1}
- otopine uzorka (inhibitora) *β*-jonona u etanolu, koncentracija u sustavu: 68,1; 79,5; 90,9; 102,3 i 113,6 μg mL^{-1}.



Slika 10. Priprava kemikalija

3.2. Postupak

Uzorci se otpipetiraju u jažice, prema shemi iz tablice 4, s tim da se supstrat, acetiltiokolin (ATChI), dodaje neposredno prije početka mjerenja budući da se 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.

Tablica 4. Shema priprave reakcijske smjese

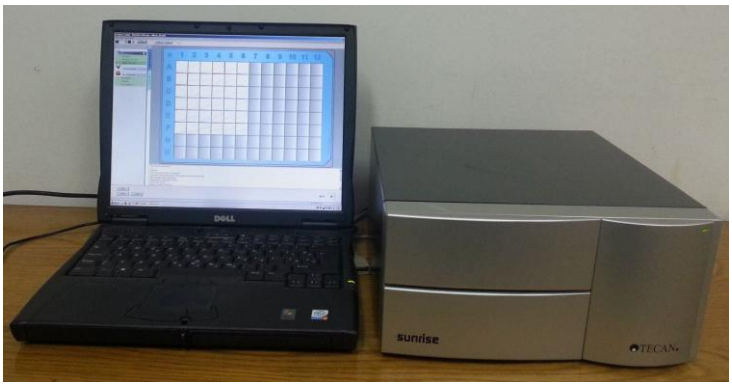
	Kontrola	**BL1**	**BL2**	**Uzorak M**	**Uzorak BL**
Pufer	190	200	200	180	190
DTNB	10	10	10	10	10
Uzorak	/	/	/	10	10
AChE	10	/	10	10	/
ATChI	10	10	/	10	10

Mjerenje se vršilo pomoću višekanalnog čitača mikrotitarskih pločica "Sunrise" (Tecan, GmbH, Austrija), (slika 11), uz automatsko miješanje i pohranjivanje podataka na računalo.

Sposobnost inhibicije enzima računa se po formuli:

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

gdje je A_A apsorbancija test otopine, a A_K je apsorbancija kontrolnog uzorka.



Slika11. Višekanalni čitač mikrotitarskih pločica "Sunrise"



Slika 12. Automatska mikropipeta i otopine različitih koncentracija inhibitora

4. REZULTATI

U ovom radu ispitana je sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze uz inhibitore iz grupe jonona (α- i β-jonon).

Rezultati inhibicijskog učinka različitih koncentracija α- i β-jonona prikazani su u tablici 7. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da jononi pokazuju umjerenu sposobnost inhibicije te da porastom koncentracije inhibitora raste i postotak inhibicije enzima.

Maksimalan postotak inhibicije postignut je pri koncentraciji α-jonona 90,9 μg mL^{-1} i iznosi 17,1 %. Za β-jonon maksimalna inhibicija iznosi 24,17 % pri koncentraciji 113,6 μg mL^{-1}.

Tablica 5. Inhibicija AchE dodatkom različitih koncentracija α- jonona

koncentracija / μg mL^{-1}	**% inhibicije AChE**
45,5	4,7
56,8	5,6
68,1	8,6
79,5	16,7
90,9	17,1

Tablica 6. Inhibicija AchE dodatkom različitih koncentracija *β*-jonona

koncentracija / µg mL^{-1}	**% inhibicije**
68,1	1,1
79,5	7,2
90,9	17,71
102,3	20,25
113,6	24,17

5. RASPRAVA

Alzheimerova demencija je najčešći oblik demencije u modernom društvu, a pogađa više od 20 milijuna ljudi diljem svijeta. Uzrok bolesti još je uvijek nepoznat no postoji više teorija njenog nastanka. Najčešće se govori o genetskom porijeklu, ali postoje teorije da je u podlozi Alzheimerove demencije moždani deficit acetilkolina i poremćaj acetilkolinskog metabolizma. Enzimi potrebni za sintezu i razgradnju acetilkolina sniženi su za 30% kod pacijenata s Alzheimerovom bolesti u odnosu na zdrave osobe. Povišenje kolinergičke neurotransmisije može se postići na više načina, a jedan od njih je povećanje sinteze acetilkolina inhibicijom kolinesteraza.

Cilj ovoga rada bio je ispitati sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) korištenjem α- i β-jonona kao inhibitora primjenom spektrofotometrijske metode po Ellmanu.

Oba testirana spoja su pokazala umjerenu aktivnost inhibicije, a povećanjem koncentracije povećavao se i postotak inhibicije AChE. Maksimalna inhibicija AChE za α-jonon postignuta je pri koncentraciji od 90,9 $\mu g\ mL^{-1}$ i iznosi 17,1 %, a za β- jonon pri koncentraciji 113,6 $\mu g\ mL^{-1}$ te iznosi 24,17 %.

6. ZAKLJUČAK

- Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da α- i β-jonon pokazuju umjerenu sposobnost inhibicije acetilkolinesteraze.
- Povećanjem koncentracije jonona povećava se postotak inhibicije. Maksimalna inhibicija AChE za α-jonon iznosi 17,1 % pri koncentraciji 90,9 μg mL^{-1}, dok za β-jonon iznosi 24,17 % pri koncentraciji 113,6 μg mL^{-1}.

7. LITERATURA

1. URL:https://www.scribd.com/doc/306816437/Enzimi-i-Njihova-Podjela (20.08.2016.).
2. D. M. Quinn, *Chem. Rev*. **87** (1987).
3. H. Soreq, S. Seidman, *Nat. Rev. Neurosci.* **2** (2001.).
4. URL: http://www.unizg.hr/rektorova/upload_ 2012/Makaric%20i%20Morasi%20Pipercic-%20rad%20za%20rektorovu%20nagradu.pdf (20.08.2016.).
5. URL:http://digre.pmf.unizg.hr/3886/1/N%20Ma%C4%8Dek%20Hrvat_Doktorski%20rad%202015.pdf (20.08.2016).
6. F. Burčul, *Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae*, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2014.
7. URL: https://sh.wikipedia.org/wiki/Jonon (20.08.2016.).
8. A. Radanović, *Ispitivanje sposobnosti inhibicije acetilkolinesteraze i određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenog ekstrakta mirisne ljubice (Viola odorata L.)*, Završni rad, Sveučilište u Splitu, Split, 2015.
9. G. L. Ellman, D. K. Courtney, V. Andres, R. M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol*. **7** (1961.).
10. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013.
11. G. Šinko, *Inhibicija kolinesteraza enantionerima etopropazina*, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2007.
12. I. Silman, J. L. Sussman, *Chem.–Biol. Interact.* **175** (2008).
13. A. Bosak, M. Kalinić, Z. Kovarik, *Arh. Hig. Rada Toksikol*., 2011.
14. URL:http://neuron.mefst.hr/docs/katedre/neurologija/medicina/Demencije.pdf (13.6.2016.).
15. H. Soreq, S. Seidman, *Nat. Rev. Neurosci*. **2** (2001.).
16. P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, J. Wiley, U.K. 2009.
17. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
18. URL:http://digre.pmf.unizg.hr/4739/1/SEMINARSKI%20RAD-%20Alzheimerova%20bolest.pdf (19.08.2016.).