

Goran Šinko

**INHIBICIJA KOLINESTERAZÂ ENANTIOMERIMA
ETOPROPAZINA**

Doktorska disertacija

Zagreb, 2007.

Goran Šinko

Inhibicija kolinesterazâ enantiomerima etopropazina

Doktorska disertacija

predložena Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog stupnja
doktora prirodnih znanosti (kemija)

Zagreb, siječanj 2007.

Disertacija je izrađena u Jedinici za biokemiju i organsku analitičku kemiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada pod vodstvom dr. sc. Vere Simeon. Enantiomeri etopropazina razdvojeni su stereoselektivnom tekućinskom kromatografijom u Laboratoriju za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu Instituta „Ruđer Bošković” pod vodstvom prof. Vitomira Šunjića i dr. sc. Vladimira Vinkovića. Dio mjerenja metodom zaustavljenog protoka obavljen je u Institutu za biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani pod vodstvom prof. Jurija Stojana. Mjerenja metodom gašenja fluorescencije provedena su u Department of Pharmacology, School of Medicine, University of California at San Diego u suradnji sa prof. Palmerom Taylorom i dr. sc. Zoranom Radićem. NMR i CD spektri etopropazina snimljeni su i analizirani u Istraživačkom institutu Plive d.d., Zagreb, u suradnji s prof. Predragom Novakom i dr. sc. Dinkom Žiherom.

Zahvala

Želim zahvaliti mentorici dr. sc. Veri Simeon na znanstvenom i stručnom vodstvu, te potpori.

Zahvaljujem prof. Juriju Stojanu na šestomjesečnoj stipendiji tijekom koje sam boravio u Institutu za biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Ljubljani, gdje sam obavio dio mjerenja za disertaciju. Također mu zahvaljujem što mi je ustupio računalni program za analizu kinetičkih rezultata i na stručnoj pomoći oko interpretacije rezultata. Ujedno se želim zahvaliti dr. sc. Marku Goličniku i drugim djelatnicima Instituta u Ljubljani na pomoći i gostoprimstvu.

Hvala prof. Vitomiru Šunjiću i dr. sc. Vladimiru Vinkoviću što su mi omogućili da u Laboratoriju za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu Instituta „Ruđer Bošković” provedem razdvajanje enantiomera etopropazina.

Zahvaljujem se prof. Predragu Novaku i dr. sc. Dinku Žiheru za obavljenju analizu i interpretaciju CD i NMR spektara etopropazina.

Hvala prof. Palmeru Tayloru i dr. sc. Zoranu Radiću za uzorke rekombinantnih enzima, te na gostoprimstvu u Department of Pharmacology, School of Medicine, University of California at San Diego, gdje sam načinio dio eksperimentalnog rada.

Hvala dr. sc. Elsi Reiner na stalnom zanimanju i sugestijama tijekom izrade disertacije. Također se zahvaljujem suradnicima Jedinice za biokemiju i organsku analitičku kemiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, a posebno dr. sc. Zrinki Kovarik, mr. sc. Aniti Bosak i dipl. ing. Maji Čalić. Najljepša hvala mojoj supruzi Renati, roditeljima i obitelji na potpori i razumijevanju.

Goran Šinko

SADRŽAJ

Sažetak	IV
Abstract	V
1. UVOD	
1.1. Kolinesteraze	1
1.1.1. Klasifikacija i uloga kolinesterazâ	1
1.1.2. Strukturna svojstva acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze	2
1.1.3. Prirodne varijante čovječe butirilkolinesteraze	3
1.2. Inhibitori kolinesterazâ	3
1.2.1. Reverzibilni i progresivni inhibitori	3
1.2.3. Etopropazin	5
1.3. Stereoselektivnost kolinesterazâ	6
1.3.1. Kiralnost i nomenklatura enantiomera	6
1.3.2. Stereoselektivne interakcije kolinesterazâ	7
1.4. Mehanizam interakcija kolinesterazâ sa supstratima i inhibitorima	8
1.4.1. Kinetički modeli i jednačbe	8
1.4.1.1. L. Michaelis—M. L. Menten	8
1.4.1.2. D. D. van Slyke—G. E. Cullen	11
1.4.1.3. J. L. Webb	12
1.4.1.4. T. L. Rosenberry	14
1.4.1.5. J. Stojan—D. Fournier	15
1.4.2. Učinak temperature na enzimsku aktivnost	19
2. CILJ RADA	21
3. MATERIJALI I METODE	
3.1. Enzimski preparati	23
3.2. Supstrati i inhibitori	23
3.3. Puferi i reagensi	23
3.4. Odjeljivanje enantiomera etopropazina	24
3.4.1. Frakcijska kristalizacija	24
3.4.2. Kiralna tekućinska kromatografija (HPLC)	25
3.4.3. Cirkularni dikroizam (CD)	25
3.4.4. Optičko zakretanje	25
3.4.5. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR)	26
3.5. Mjerenje aktivnosti kolinesterazâ	27
3.5.1. Standardna spektrofotometrijska metoda	27
3.5.2. Spektrofotometrijska metoda zaustavljenog protoka	28
3.6. Metoda gašenja fluorescencije	30
3.7. Jednačbe primijenjene u obradi rezultata	30

4. REZULTATI	
4.1. Inhibicija čovječe acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze etopropazinom	39
4.2. Odjeljivanje i određivanje konfiguracije enantiomera etopropazina	42
4.2.1. Stereoselektivna tekućinska kromatografija (HPLC)	42
4.2.2. Frakcijska kristalizacija	43
4.2.3. Cirkularni dikroizam (CD) i nuklearna magnetska rezonancija (NMR)	44
4.3. Inhibicija kolinesterazâ enantiomerima etopropazina	48
4.3.1. Inhibicija butirilkolinesteraze konja	48
4.3.1.1. Standardna metoda	49
4.3.1.2. Metoda zaustavljenog protoka	56
4.3.2. Inhibicija rekombinantnih kolinesterazâ miša	80
4.3.3. Određivanje afiniteta kolinesterazâ za etopropazin metodom gašenja fluorescencije	82
5. RASPRAVA	
5.1 Etopropazin kao selektivni inhibitor BChE	85
5.1.1 Inhibicija fenotipova čovječe BChE etopropazinom	86
5.2 Stereoselektivna inhibicija kolinesterazâ enantiomerima etopropazina	86
5.2.1 Inhibicija mišje AChE, mutanata AChE i BChE etopropazinom	86
5.2.2 Usporedba konstanta disocijacije K_D i K_I	88
5.3 Kinetički modeli hidrolize supstrata i inhibicije	89
5.3.1 Michaelis-Menten-in model	89
5.3.2 Webb-ov model	91
5.3.3 Stojan-Fournier-ovi kinetički modeli	94
5.4 Proširenje modela sa 7 parametra sa parametrom temperature	97
6. ZAKLJUČCI	99
7. PRILOG	
7.1 Izvod jednadžbe za enzimsku aktivnost po Webb-u	101
7.2 Izvod jednadžbe za enzimsku aktivnost prema Stojan-Fournier-ovom modelu	103
7.2.1 Model sa 6 parametara	103
7.2.2 Model sa 7 parametara	105
7.3 Proširenje modela sa 7 parametara sa parametrom za temperaturu	107
7.4 Izvod jednadžbe za prividnu konstantu inhibicije $K_{I,app}$	108
8. LITERATurna VRELA	111
9. ŽIVOTOPIS	117

INHIBICIJA KOLINESTERAZA ENANTIOMERIMA ETOPROPAZINA

GORAN ŠINKO

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada
Ksaverska cesta 2, Zagreb

Istraživane su stereoselektivne interakcije acetilkolinesteraze (EC 3.1.1.7) i butirilkolinesteraze (EC 3.1.1.8) sa *R*- i *S*-enantiomerima etopropazina (10-(2-dietilaminopropil) fenotiazin hidroklorida). Enantiomeri su priređeni odjeljivanjem iz racemata primjenom stereoselektivne tekućinske kromatografije i frakcijskom kristalizacijom. Aktivnost butirilkolinesteraze iz seruma konja u odsutnosti i prisutnosti enantiomera etopropazina, mjerena je sa supstratom acetiltiokolinom spektrofotometrijskom metodom, koja omogućava početak mjerenja aktivnosti unutar nekoliko desetaka milisekundi. Objedinjenim postupkom prilagodbe teoretske krivulje eksperimentalnim vrijednostima određene su konstante za reakciju enzima sa supstratom i reverzibilnu inhibiciju etopropazinom, primjenom tri kinetička modela opisana u literaturi i četiri inačice tih modela. Modeli su se razlikovali po pretpostavljenim molekulskim vrstama, koje nastaju između enzima, supstrata i etopropazina. Konstante inhibicije izračunane iz svih modela pokazale su da je afinitet butirilkolinesteraze za *R*-enantiomer oko 2,5 puta veći nego za *S*-enantiomer u rasponu temperature od 12 do 37 °C. Model, koji pretpostavlja šest parametara za hidrolizu supstrata i dva parametra za inhibiciju enzima, najbolje je pristajao eksperimentalnim podacima. Na mutantima rekombinantne acetilkolinesteraze miša pokazano je da se promjenom strukture aktivnog mjesta enzima stereoselektivnost za enantiomere može povećati (Y337A) ili pak biti obrnutog smjera (Y124Q i W286A) u odnosu na stereoselektivnost butirilkolinesteraze miša, konja i čovjeka. Acetilkolinesteraza miša oko 1600 puta slabije je inhibirana racematom etopropazinom nego butirilkolinesteraza i nije stereoselektivna prema enantiomerima.

(121 stranice uključuju 44 slike, 17 tablica i 65 literaturnih vrela; jezik: hrvatski)

Teza je pohranjena u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu i u knjižnici Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

Ključne riječi: kolinesteraze, etopropazin, kinetički modeli, mutanti, enantiomeri, metoda zaustavljenog protoka

Mentor: Dr. sc. Vera Simeon, zn.savj.

Ocjenjivači: Dr. sc. Srđanka Tomić-Pisarović, red. prof.
Dr. sc. Vera Simeon, zn. savj.
Dr. sc. Jurij Stojan, red. prof.
Dr. sc. Ivana Weygand-Đurašević, red. prof.
Dr. sc. Predrag Novak, izv. prof.

Disertacija je prihvaćena: 31. siječnja 2007.

INHIBITION OF CHOLINESTERASES WITH ETHOPROPAZINE ENANTIOMERS

GORAN ŠINKO

Institute for Medical Research and Occupational Health
Ksaverska cesta 2, Zagreb, Croatia

This study examined the stereoselective interactions of acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8) with *R*- and *S*-ethopropazine enantiomers (10-(2-diethyl-aminopropyl)phenothiazine hydrochloride). Enantiomers were prepared using the chiral liquid chromatography and fractional crystallization. The activity of equine serum butyrylcholinesterase was measured with acetylthiocholine as a substrate in the absence and presence of ethopropazine enantiomers using a fast spectrophotometric method that allows activity measurement within tens of milliseconds. Constants for the reaction of enzyme with substrate, and the reversible inhibitor were determined using simultaneous fit of theoretical curve to the experimental data applying three kinetic models, described in literature, and four modifications of these models. The kinetic models differed in presumed molecular species, formed among the enzyme, substrate and ethopropazine. Inhibition constants calculated from all kinetic models revealed that butyrylcholinesterase had 2.5 times higher affinity for *R*-ethopropazine than for *S*-ethopropazine at a temperature range 12-37°C. The kinetic model with six parameters for substrate hydrolysis and two parameters for enzyme inhibition best fitted the experimental data. Recombinant mouse acetylcholinesterase with mutations in enzyme active site showed that stereoselectivity can be increased (Y337A) or reversed (Y124Q and W286A) in comparison with stereoselectivity of mouse, equine or human butyrylcholinesterase. Recombinant acetylcholinesterase (wild type) inhibition by racemic ethopropazine was about 1600 times lower than that of butyrylcholinesterase, and had no stereoselectivity towards ethopropazine enantiomers.

(121 pages including 44 figures, 17 tables and 65 references; original in Croatian)

Thesis is deposited at the National and University Library in Zagreb and at the Library of the Institute for Medical Research and Occupational Health in Zagreb.

Keywords: Cholinesterases, Ethopropazine, Kinetic models, Mutants, Enantiomers, Stopped flow method

Supervisor: Dr Vera Simeon

Reviewers: Professor Srđanka Tomić-Pisarović
Dr Vera Simeon
Professor Jurij Stojan
Professor Ivana Weygand-Đurašević
Professor Predrag Novak

Thesis accepted: January 31, 2007

1. UVOD

1.1. Kolinesteraze

1.1.1. Klasifikacija i uloga kolinesterazâ

Acetilkinesteraza (AChE, EC 3.1.1.7) je enzim koji u živčano-mišićnim sinapsama vrlo učinkovito hidrolizira neurotransmiter acetilkolin (ACh). AChE je jedan od najučinkovitijih enzima u prirodi, zaslužan za izuzetno brz prijenos živčanih impulsa. Ideju o enzimu koji može razgraditi acetilkolinski ester predstavio je H. Dale 1914. god.

Istraživanjima kolinesteraza i njihovim izoliranjem iz različitih bioloških izvora stvorilo je potrebu klasifikacije kolinesteraza. Uočilo se da kolinesteraze iz raznih izvora pokazuju različitu supstratnu specifičnost i različito bivaju inhibirane raznovrsnim inhibitorima.¹ Ovo svojstvo kolinesteraza dovelo je do njihove podjele na AChE i pseudokolinesteraze odnosno butirilkolinesterazu (BChE, EC 3.1.1.8). Već je spomenuto da AChE vrlo učinkovito hidrolizira acetilkolin, a BChE osim što hidrolizira acetilkolin hidrolizira i veće kolinske estere s obzirom na acilnu skupinu. To je ključ njihova imena iako za BChE nije poznat fiziološki supstrat kao ni jednoznačna fiziološka uloga. Kolinesteraze se pojavljuju osim kod sisavaca i kod drugih kralježnjaka, ali i kod beskralježnjaka. AChE beskralježnjaka nije toliko specifična prema acetilkolinu kao supstratu tako da je klasifikacija enzima prema supstratnoj specifičnosti u njihovom primjeru nedostatna.

Kolinesteraze su prisutne u raznim tkivima u organizmima kralježnjaka pa uloga AChE izvan sinapsi nije razjašnjena, primjerice uloga AChE vezane na membrani eritrocita.² BChE je također prisutna u raznim tkivima, a najviše je ima u krvnoj plazmi. Pretpostavka je da BChE ima važnu ulogu u organizmu s farmakološkog i toksikološkog stajališta budući je sposobna hidrolizirati različite estere, kao što su veliki neutralni esteri ili čak negativni esteri na pr. aspirin® jednako učinkovito kao i butirilkolin.¹ BChE u plazmi može značajno doprinositi perifernoj kolinergičnoj ravnoteži, koja regulira ključne funkcije hematopoetičkog i imunološkog sustava.³ Zanimljivo je da se i AChE i BChE javljaju tijekom neurogeneze, prije pojave sinapsi, zbog čega je cjelokupnost njihove fiziološke uloge još pod velom tajne.

AChE je enzim koji se povezuje s nekoliko bolesti kao što su Alzheimer-ova bolest, Parkinson-ova bolest i miastenia gravis (lat. *myasthenia gravis*).

1.1.2. Strukturna svojstva acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze

Kolinesteraze pripadaju porodici enzima, hidrolazama, koje karakterizira α/β smatanje.⁴ Hidrolaze (EC 3) čine veliku skupinu proteina sa raznim funkcijama te ih dijelimo na lipaze, peptidaze, dehalogenaze i adhezijske proteine. AChE i BChE su srodni enzimi uz 54%-tnu identičnost proteinske sekvencije kada se usporede riblja AChE (lat. *Torpedo californica*; TcAChE) i čovječja BChE.⁵ Usporedbom trodimenzionalne strukture aminokiselinskih kostura ovih enzima, bez bočnih lanaca, uočava se poklapanje preko 95%. U strukturi oba enzima konzervirani su cisteina koji tvore tri disulfidna mosta u monomeru, te cistein preko kojeg se monomeri povezuju u dimer.⁵ Među konzerviranim aminokiselinama su i aminokiseline katalitičke trijade serin, histidin i glutamat. Katalitička trijada kolinesteraza razlikuje se od one serinskih proteaza po tome što je aspartat zamijenjen već spomenutim glutamatom.

Nakon kristalizacije TcAChE koju su načinili Sussman i suradnici 1991. god. otkriveno je da se aktivno mjesto AChE nalazi na dnu ždrijela koje je duboko oko 20 Å i široko na ulazu oko 5 Å.⁶ To je bilo iznenađujuće s obzirom da je ovaj enzim jedan od najučinkovitijih poznatih enzima, koji može hidrolizirati 16 000 molekula supstrata u sekundi, pa se očekivalo aktivno mjesto na površini enzima. Zapravo enzim hidrolizira supstrat dobro izdvojen od okolnog medija. Aktivno mjesto čovječje BChE je za nekih 200 Å³ veće od onog AChE ($\approx 500 \text{ Å}^3$ prema 200 Å³) i to zato što se kod BChE umjesto 14 aromatskih aminokiselina aktivnog mjesta AChE nalazi njih 8, a umjesto šest se nalaze manje alifatske ili polarne aminokiseline. Ova razlika smatra se odgovornom za različita kinetička svojstva AChE i BChE. Daljnjim istraživanjima aktivnog mjesta AChE i BChE kristalografskim metodama, metodama genetičkog inženjerstva i kinetičkim mjerenjima utvrđena su četiri domene unutar aktivnog mjesta.^{7,8} To su periferno mjesto na ulazu u aktivno mjesto enzima na koje se prvo vežu pozitivno nabijeni supstrati i inhibitori, kationsko vezivno mjesto koje stabilizira vezanje kvaternog dušika acetilkolina, acilirajuće mjesto sa oksianionskom šupljinom i mjesto vezanja acilnog dijela supstrata (acilni džep).

1.1.3. Prirodne varijante čovječke butirilkolinesteraze

Genetika čovječke BChE posebno je istraživana tako da je otkriveno više od trideset prirodnih inačica s različitim mutacijama. Pojava mutacija koje dokidaju enzimsku aktivnost, tihe mutacije (eng. *silent*), dovele su do zaključka da BChE nema esencijalnu ulogu u organizmu, koja bi ograničavala prirodnu mutagenezu. Pojavnost mutacija BChE praćena je diljem svijeta kao pokazatelj povijesnih migracija i prilagodbe.^{9,10}

Procjena je da gotovo četvrtina populacije zapadnoeuropskih zemalja ima u organizmu neku inačicu BChE.¹¹ Česta inačica BChE je atipčna inačica sa točkastom mutacijom aspartata 70 u glicin (D70G) koja smanjuje specifičnost enzima. Posljedica ove mutacije je nemogućnost hidrolize sukcinilkolina koji se koristi tijekom operativnih zahvata za opuštanje mišića, također djeluje kao inhibitor AChE. Takve osobe su vitalno ugrožene ako ih se tretira sa sukcinilkolinom tijekom anestezije. Općenito osobe sa inačicama BChE različito reagiraju na inhibitore kolinesteraza, a to je svojstvo iskorišteno za laboratorijski postupak utvrđivanja inačica BChE.^{12,13}

Uvriježeno je mišljenje da BChE, budući da dobro hidrolizira ACh, štiti AChE od toksičnih ksenobiotika s ciljem održavanja vitalne funkcije neurotransmisije.^{1,14}

1.2. Inhibitori kolinesteraza

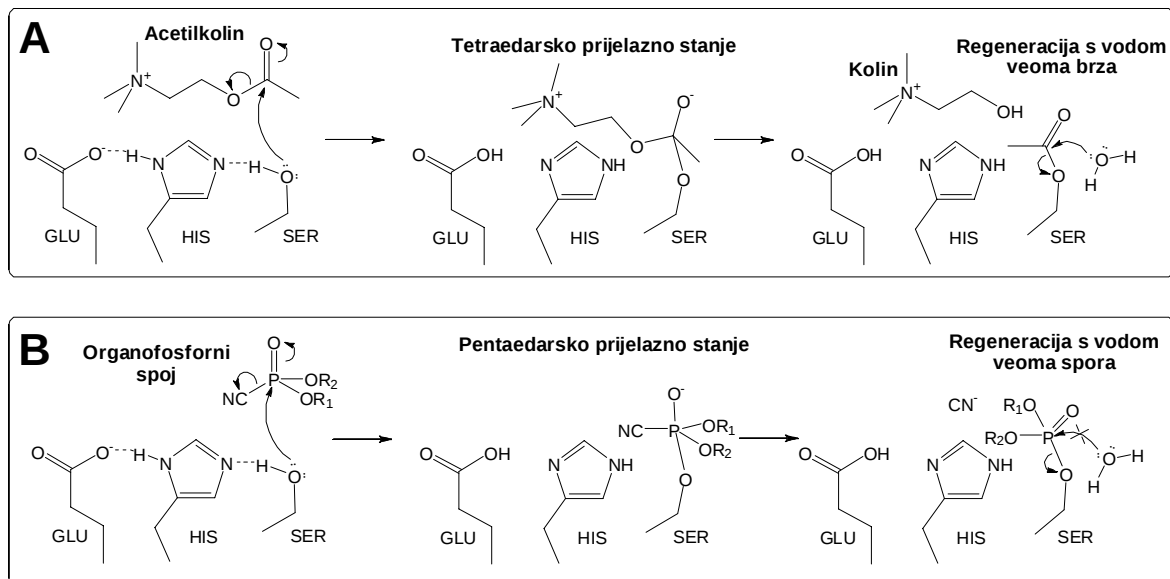
1.2.1. Reverzibilni i progresivni inhibitori

Inhibitori su spojevi koji ometaju ili onemogućuju aktivnost enzima, a njihovo djelovanje može biti reverzibilno ili ireverzibilno. Da bi neki inhibitor bio ireverzibilan njegova struktura mora oponašati strukturu prijelaznog stanja koja se javlja u enzimu tijekom katalitičkog ciklusa i kovalentno se vezati na aminokiselinu koja sudjeluje u reakciji sa supstratom.

Reverzibilni inhibitori vežu se nekovalentno u aktivno mjesto kolinesteraza (etopropazin, edrofonij, takrin, huperzin A i dr.) ili se vežu na periferno mjesto enzima na ulazu u aktivno mjesto (propidij, galantamin, tubokurarin i dr.).¹ Također su sintetizirani inhibitori koji se istovremeno mogu reverzibilno vezati na oba mjesta na enzimu kao što su dekametonij i donepezil.¹ Donepezil je lijek (Aricept®) koji se daje bolesnicima s Alzheimer-ovom bolešću kako bi im se povećala razina kortikalnog acetilkolina.

Ireverzibilni inhibitori djeluju tako da se kovalentno vežu na serin katalitičke trijade čime je onemogućena normalna hidroliza supstrata ACh (Slika 1.1B). U

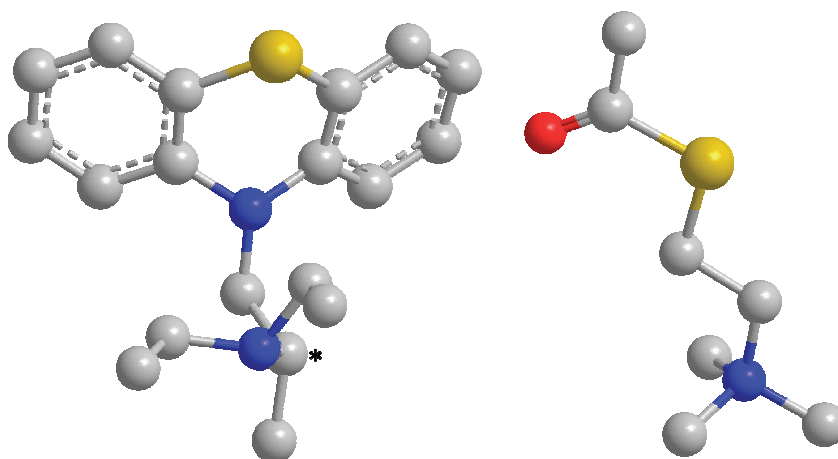
ireverzibilne inhibitore kolinesteraza ubrajamo karbamate (bambuterol, ezerin i dr.) i organofosforne spojeve od kojih su najjači inhibitori kemijski bojni otrovi (sarin, soman, tabun, VX i dr.). Neki od ovih spojeva ne dokidaju enzimsku aktivnost u potpunosti budući da voda spontano regenerira serin katalitičke trijade. Vrijeme poluraspada ($t_{1/2}$) za reakciju dekarbamoilacije i defosforilacije kolinesteraza inhibiranih može iznositi od dvadesetak minuta pa do nekoliko sati.^{15,16} Enzim može ireverzibilno izgubiti aktivnost nakon inhibicije organofosfornim spojevima kao što su bojni otrovi.



Slika 1.1 Usporedba mehanizama hidrolize supstrata i ireverzibilne inhibicije kolinesteraza. Mehanizam hidrolize acetilkolina kolinesterazama odvija se preko tetraedarskog prijelaznog stanja. Nakon nukleofilnog napada na karbonilni ugljik acetilkolina nastaje ester serina i octene kiseline koji biva naknadno izrazito brzo hidroliziran od strane vode (A).¹⁷ Mehanizam inhibicije kolinesteraze organofosfornim spojem je sličan, jer također nastaje ester serina i organofosforne kiseline (B). Budući je atom fosfora okružen s četiri atoma kisika, regeneracija serina hidrolizom estera vodom je jako usporena. Vodi je onemogućen nukleofilni napad zbog odbijanja negativnih naboja na kisicima organofosfornog spoja i onog vode. Organofosforni spoj strukturom oponaša tetraedarsko prijelazno stanje što ga čini jakim inhibitorom kolinesteraza.

1.2.3. Etopropazin

Etopropazin (10-(2-dietilaminopropil)fenotiazin hidroklorid; Slika 1.2) iz grupe spojeva fenotiazina, koristi se kao neuroleptični lijek u tretmanu Parkinsonove bolesti. Spomenuto je da je etopropazin selektivni reverzibilni inhibitor BChE koji se primjenjuje tijekom mjerenja aktivnosti AChE u uzorcima kada su prisutna oba enzima AChE i BChE.¹⁸⁻²⁰ Etopropazin je kiralni spoj sa asimetričnim ugljikovim atomom u pobočnom lancu. Opravdano je očekivati da bi pojedini enantiomeri etopropazina mogli pokazivati razliku u inhibiciji kolinesteraza budući da su one građene od kiralnih aminokiselina.^{21,22} Poznato je da će se enantiomeri međusobno razlikovati u kiralnom okruženju pa se ova pojava koristi prilikom odjeljivanja enantiomera iz racemične smjese tj. ekvimolarne smjese enantiomera.

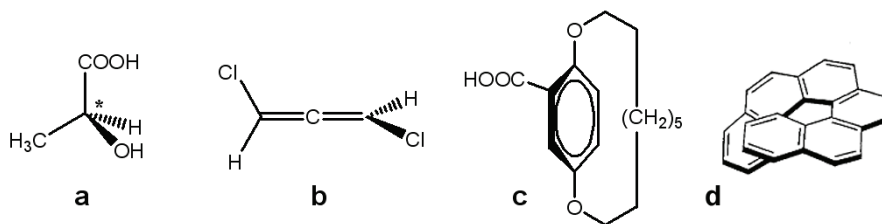


Slika 1.2 Kemijske sturukture inhibitora etopropazina i supstrata acetiltiokolina (ATCh). Kiralni ugljikov atom etopropazina označen je zvjezdicom. Atom dušika je označen plavom, kisika crvenom, ugljika sivom i sumpora žutom bojom. Vodikovi atomi nisu prikazani radi preglednosti.

1.3. Stereoselektivnost kolinesteraza

1.3.1. Kiralnost i nomenklatura enantiomera

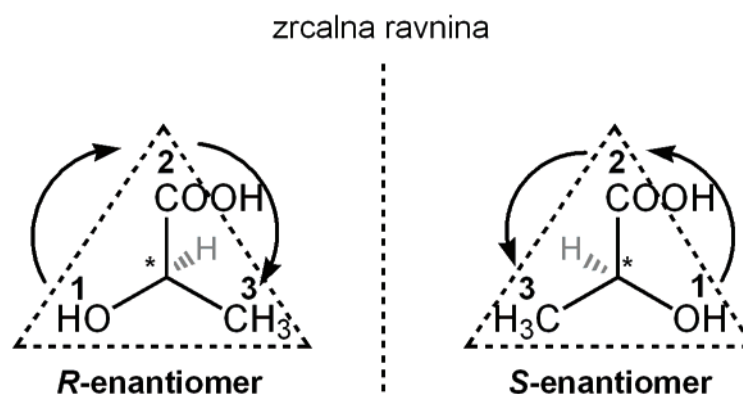
Kiralnost, vrsta stereoizomerije, jedna je od osnovnih pojava u prirodi i karakteristična je za živi svijet i njegove osnovne građevne jedinice aminokiseline, šećere i lipide. Molekula je kiralna kada se ne može preklopiti s vlastitom zrcalnom slikom, poput dlanova ruke (grč. *χείρ* (cheír) - ruka). Enantiomerima se naziva par kiralnih molekula koje se odnose kao predmet i zrcalna slika, a smjesa dvaju enantiomera u molarnom omjeru 1:1 racemičnom smjesom. Stereoizomeri imaju identičnu kemijsku strukturu, tj. atomi su u molekuli povezani na isti način, ali je prostorni raspored atoma drugačiji. Stereoizomeri se dijele na konformacijske i konfiguracijske, a konfiguracijski opet na geometrijske i optičke. U geometrijske stereoizomere ubrajamo *cis*- i *trans*-izomere. Optičke stereoizomere čine enantiomeri i diastereomeri. Razlika u prostornom rasporedu atoma unutar molekule može uzrokovati razliku u biološkim svojstvima optičkih stereoizomera, odnosno enantiomera i diastereomera.²¹⁻²⁷ Enantiomeri zakreću ravninu polariziranog svjetla, a to svojstvo prvi je uočio J. B. Biot 1815. god. Na osnovi prostornog, trodimenzionalnog, modela molekula J. H. van't Hoff i J.-A. Le Bell neovisno su 1874. god. postavili teoriju podrijetla optičke aktivnosti. Razlikuju se četiri oblika kiralnosti: središnja, osna, planarna i helikoidalna kiralnost (Slika 1.3 a, b, c i d). Kod molekula je najčešća središnja kiralnost. Kiralna molekula (slika 1.3 a) ima asimetrično središte, tj. centar asimetrije kada su na nekom atomu (ugljik, dušik, fosfor, sumpor i drugi) vezana četiri različita supstituenta usmjerena u vrhove tetraedra. Molekule koje imaju dva, tri ili n kiralnih centara imaju 2^n stereoizomera. Neki od tih stereoizomera su enantiomeri, dok su ostali diastereomeri, tj. ne odnose se kao predmet i zrcalna slika.



Slika 1.3 Četiri oblika kiralnosti: središnja (a), osna (b), planarna (c) i helikoidalna (d).²⁵

Sustav nomenklature enantiomera, Cahn-Ingold-Prelogova (CIP) nomenklatura²⁸, označava apsolutne strukture kiralnog centra oznakama konfiguracije *R* (lat. *rectus* - desno) ili *S* (lat. *sinister* - lijevo) s obzirom na raspored prioriternih skupina oko kiralnog, asimetričnog, središta (Slika 1.4). Ova nomenklatura rangira supstituente na

kiralnom centru s obzirom na atomski broj atoma vezanog na kiralni atom. Atomi većeg atomskog broja imaju viši prioritet. Ako dva supstituenta na kiralnom središtu imaju isti prioritet, sljedeći atomi vezani na prvi atom također se rangiraju dok se ne uoči razlika. Višestruke veze se promatraju kao odgovarajući broj jednostrukih veza s atomom istog atomskog broja.



Slika 1.4 Primjer određivanja apsolutne konfiguracije enantiomera (mliječna kiselina). Redoslijed skupina prema stupnjevima prioriteta je $\text{OH} > \text{COOH} > \text{CH}_3 > \text{H}$ odnosno brojčano $1 > 2 > 3 > 4$. Gledanjem u smjeru kiralnog središta i skupine najnižeg stupnja prioriteta (atom vodika) određuje se slijed preostalih skupina. Ako je redoslijed preostalih skupina u vrhovima imaginarnog trokuta sukladan smjeru kazaljki na satu, onda se radi o *R*-enantiomeru, a ako je taj redoslijed suprotan, radi se o *S*-enantiomeru.²⁸

1.3.2. Stereoselektivne interakcije kolinesteraza

Acetilkolinesteraza i butirilkolinesteraza su stereoselektivni enzimi što se očituje u njihovoj interakciji s kiralnim supstratima i inhibitorima kao što su kiralni kinuklidinski esteri, karbamati i organofosforni spojevi, koji se kovalentno vežu u katalitičko mjesto enzima.²⁹⁻³⁵ Kod skupine kiralnih organofosfornih spojeva (OP-spojevi) uočena je razlika u djelovanju pojedinih enantiomera iako se u praksi ovi spojevi rabe u racemičnom obliku. Kako bi se utvrdila toksičnost pojedinih enantiomera živčanih bojnih otrova sarina, somana i VX-a, oni su priređeni u istraživačke svrhe. Toksično djelovanje OP-spojeva temelji se na inhibiciji acetilkolinesteraze (AChE) čijom se inhibicijom onemogućava hidroliza neurotransmitera acetilkolina i prijenos živčanih impulsa. Toksičnost OP-spojeva izražava se kao doza spoja kod koje ugiba 50% tretiranih životinja

(LD₅₀). Soman je spoj sa dva kiralna centra, na fosforu P(±) i ugljiku C(±), i ima četiri diastereomera. Pokazalo se da P(-) stereoizomeri somana imaju približno 50 puta višu akutnu toksičnost u odnosu na P(+) stereoizomere.³³ Stereoizomeri P(-)-soman i (-)-sarina pokazuju sličnu toksičnost na miševima (LD₅₀ ~ 40 µg/kg). U slučaju VX-a pokazalo se da je (-)-VX 12 puta toksičniji od (+)-VX-a.^{34,35} Enantiomerno čisti OP-pojevi priređeni su kombiniranjem sintetskih i enzimskih metoda. C(+) i C(-) enantiomeri somana sintetizirani su iz optički čistih enantiomera pinakoilnog alkohola, a P(+) i P(-) enantiomeri somana odvojeni su inkubacijom s α-kimotripsinom koji specifično veže P(-)-soman.³⁴ Enantiomeri VX-a priređeni su sintetski polazeći od optički čistih preteča.³⁵

1.4. Mehanizam interakcija kolinesteraza sa supstratima i inhibitorima

1.4.1. Kinetički modeli i jednačbe

1.4.1.1. L. Michaelis—M. L. Menten³⁶

Michaelis i Menten-ova predstavili su model hidrolize supstrata enzimom 1913 god. Njihov model razvijen je na proučavanju aktivnosti invertaze (β-fruktofuranozidaza, EC 3.2.1.26), enzima koji hidrolizira saharozu na glukozu i fruktozu, i temelji se na pretpostavci da enzim i supstrat prvo stvaraju reverzibilni kompleks ES, Michaelis-ov kompleks, definiran konstantom disocijacije K_s. Nakon stvaranja tog kompleksa enzim prevodi supstrat u produkt ili produkte reakcijom prvog reda, koju opisuje konstanta brzine k. G. E. Briggs i J. B. S. Haldane predložili su 1925. g. izvod Michaelis-Menten-ina jednačbe iz stacionarnog stanja, koje nastupa onda kad je koncentracija ES kompleksa u vremenu stalna tj. kompleks nastaje i nestaje istom brzinom (Slika 1.5). Ovu jednačbu također se može izvesti i iz predstacionarnog stanja odnosno kada je koncentracija nastalog produkta zanemariva (P=0), a koncentraciju supstrata možemo smatrati jednaku početnoj (S=S₀).



Slika 1.5 Shema Michaelis-Menten-ina modela reakcije enzima sa supstratom prema Briggs—Haldane-u. Konstante brzine k₁ i k₋₁ odnose se na stvaranje i raspadanje Michaelis-ovog kompleksa ES, a konstanta brzine k₃ odnosi se na stvaranje produkta P.

Da bi izveli Michaelis-Menten-inu jednadžbu potrebno je napisati diferencijalnu jednadžbu promjene koncentracije Michaelis-ova kompleksa ES u vremenu koja predstavlja razliku brzina nastajanja i nestajanja ovog kompleksa.

$$\frac{\partial ES}{\partial t} = k_{+1}E \cdot S - (k_{-1}ES + k_3ES) = 0 \quad (1.1)$$

Iz pretpostavke stacionarnog stanja vrijedi da je dani diferencijal jednak nuli

$$k_{+1}E \cdot S = ES(k_{-1} + k_3) \quad (1.1a)$$

Sređivanjem izraza i prebacivanjem konstanta na istu stranu dobivamo izraz za Michaelis-ovu konstantu K_m

$$\frac{E \cdot S}{ES} = \frac{k_{-1} + k_3}{k_{+1}} = K_m \quad (1.1b)$$

Aktivnost enzima, v , definirana se kao produkt konstante brzine k_3 i koncentracije Michaelis-ova kompleksa ES,

$$v = k_3 \cdot ES \quad (1.2)$$

a maksimalna aktivnost enzima, V_m , kao produkt ukupne koncentracije enzima E_0 i k_3

$$V_m = k_3 \cdot E_0 \quad (1.2a)$$

Katalitička konstanta k_3 može se poistovjetiti s k_{cat} , koja predstavlja korak (ili korake) kojim enzim prevodi supstrat u produkt.

Supstitucijom u jed. 1.1b koncentracije enzima E sa razlikom ukupne koncentracije enzima E_0 i koncentracije Michaelis-ovog kompleksa ES dobiva se

$$\frac{E \cdot S}{ES} = \frac{(E_0 - ES) \cdot S}{ES} = K_m \quad (1.1c)$$

Izlučivanjem Michaelis-ovog kompleksa ES na lijevu stranu jednakosti dobiva se

$$ES = \frac{E_0}{K_m / S + 1} \quad (1.1d)$$

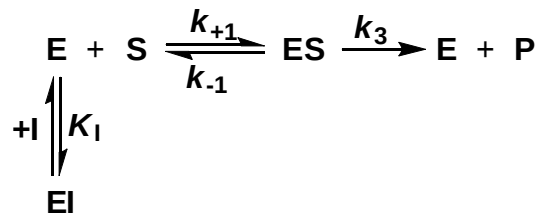
te supstitucijom u jed. 1.2 koncentracije ES dobivenim izrazom

$$v = k_3 \frac{E_0}{K_m / S + 1} = \frac{V_m}{K_m / S + 1} \quad (1.3)$$

dobiva se poznati oblik Michaelis-Menten-ine jednadžbe.

Mehanizmi inhibicije enzima temeljeni na Michaelis-Menten-inom modelu

Iz Michaelis-Menten-ina modela može se izvesti jednadžba za kompetitivnu inhibiciju enzima gdje supstrat i inhibitor kompetiraju za isto mjesto vezanja na enzimu. Stvaranjem enzim-inhibitor kompleksa EI smanjuje se koncentracija enzima koji može hidrolizirati supstrat.



Slika 1.6 Shema mehanizma kompetitivne inhibicije reakcije enzima sa supstratom.

Vezanje inhibitora na slobodni enzim mijenja koncentraciju slobodnog enzima E dostupnog za reakciju sa supstratom, a ukupna koncentracija enzima iznosi

$$E_o = E + ES + EI \quad (1.4)$$

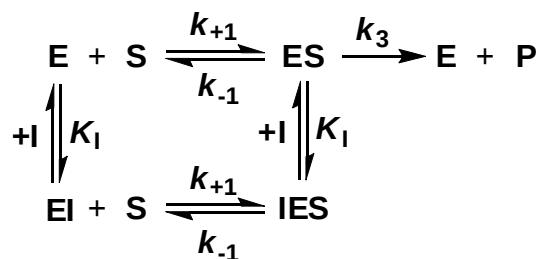
Koncentracija slobodnog enzima E nakon supstitucije EI kompleksa sa konstantom disocijacije enzim-inhibitor kompleksa K_I iznosi

$$E = (E_o - ES) / (1 + I/K_I) \quad (1.4a)$$

Uvrštavanjem jed. 1.4a u jed. 1.1c i daljnjim transformacijama dobiva se izraz za kompetitivnu inhibiciju enzima

$$v = \frac{V_m}{K_m(1 + I/K_I) / S + 1} \quad (1.5)$$

Iz Michaelis-Menten-ina modela može se izvesti i jednadžbu za nekompetitivnu inhibiciju enzima u kojoj inhibitor onemogućuje stvaranje produkta nakon što se veže na Michaelis-ov kompleks.



Slika 1.7 Shema mehanizma nekompetitivne inhibicije reakcije enzima sa supstratom.

Vezanje inhibitora na Michaelis-ov kompleks smanjuje koncentraciju Michaelis-ovog kompleksa zbog čega pada brzina nastajanja produkta u enzimskoj reakciji

$$E_o = E + ES + EI + IES \quad (1.6)$$

Koncentracija slobodnog enzima E iznosi

$$E = E_o / (1 + I/K_I) - ES \quad (1.6a)$$

Uvrštavanjem jed. 1.6a u jed. 1.1c i daljnjim transformacijama dobiva se izraz za nekompetitivnu inhibiciju enzima

$$v = \frac{V_m / (1 + I/K_i)}{K_m / S + 1} \quad (1.7)$$

Iako se ranije Michaelis-Menten-in model koristio u opisivanju aktivnosti kolinesteraza pokazalo se da on nije prikladan budući da teoretska krivulja ne opisuje eksperimentalne podatke bilo da AChE pokazuje inhibiciju supstratom ili da BChE pokazuje prividnu „aktivaciju“ odnosno „inhibiciju“ supstratom kada je koncentracija supstrata manja ili viša od K_m .

1.4.1.2. D. D. van Slyke—G. E. Cullen³⁶

U isto vrijeme kada su L. Michaelis i M. L. Menten razvijali svoj model reakcije između enzima i supstrata, istraživači D. D. van Slyke i G. E. Cullen predložili su 1914. g. drugačiji mehanizam od njihova proučavajući kinetiku ureaze.^{cf 36} Van Slyke i Cullen pretpostavili su da prvi korak u reakciji između enzima i supstrata nije reverzibilan već ireverzibilan (Slika 1.8).



Slika 1.8 Shema reakcije između enzima i supstrata prema van Slyke i Cullen-u.

Budući da nema ravnotežne reakcije između ES i E promjena koncentracije ES u vremenu t rezultira nešto drugačijom jednadžbom od one izvedene iz Michaelis-Menten-ina modela.

$$\frac{\partial ES}{\partial t} = k_{+1}E \cdot S - k_3ES \quad (1.8)$$

Van Slyke i Cullen pretpostavili su također da se koncentracija kompleksa ES ne mijenja tijekom reakcije, odnosno pretpostavili su stacionarno stanje reakcije. Ta pretpostavka znači da se jed. 1.8 može izjednačiti s nulom. Izlučivanjem koncentracije kompleksa ES na lijevu stranu jednakosti i supstitucijom koncentracije slobodnog enzima E sa razlikom ukupne koncentracije enzima E_0 i koncentracije kompleksa ES dobiva se izraz

$$ES = \frac{E_0}{(k_3 / k_{+1}) / S + 1} \quad (1.8a)$$

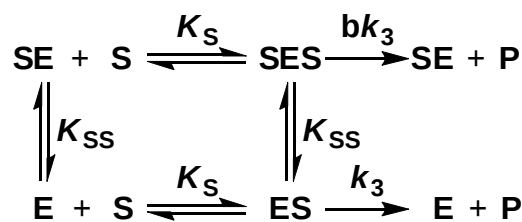
Uvrštavanjem izraza za ES u jed. enzimске aktivnosti (jed. 2) dobiva se slijedeći izraz

$$v = \frac{V_m}{\frac{k_3}{k_{+1}} \cdot \frac{1}{S} + 1} \quad (1.9)$$

Ova jednadžba enzimske aktivnosti vrlo je slična Michaelis-Menten-inoj jednadžbi 1.3 s tom razlikom da je konstanta K_m zamijenjena kvocijentom k_3/k_{+1} . Budući da je kvocijent konstanta također konstanta nije moguće razlikovati kvocijent k_3/k_{+1} od konstante K_m .

1.4.1.3. J. L. Webb

Webb je predložio mehanizam reakcije između enzima i supstrata koji predviđa vezanje druge molekule supstrata na periferno mjesto na enzimu te promjenu u enzimskoj aktivnosti.³⁷ U osnovi enzim reagira sa supstratom kao kod Michaelis-Menten-ina modela kada je koncentracija supstrata toliko mala da je vezanje supstrata na periferno mjesto enzima zanemarivo, odnosno koncentracija SES kompleksa je zanemariva. Porastom koncentracije supstrata povećava se udio SES kompleksa u reakcijskoj smjesi pa se mehanizam reakcije enzima sa supstratom mijenja (Slika 1.9).



Slika 1.9 Shema reakcije između enzima i supstrata prema Webb-u.³⁷

Jedna od pretpostavki u Webb-ovom modelu, je ta da nema razlike u afinitetima enzima za supstrat bilo da se supstrat veže u aktivno mjesto enzima na slobodni enzim (K_S) ili na kompleks ES (K_{SS}). Također nema razlike u afinitetu kada se supstrat veže na periferno mjesto na slobodni enzim (K_{SS}) ili na reverzibilni kompleks ES kada je prva molekula supstrata vezana u aktivno mjesto enzima (K_{SS}). U modelu parametar b predstavlja utjecaj vezanja druge molekule supstrata na ES kompleks na cjelokupnu aktivnost enzima. Kada je b manji od jedan, supstrat inhibira enzim, a kada je b veći od jedan, supstrat aktivira enzim. Polazeći od istih pretpostavki kao u Michaelis-Menten-inom modelu, da je sustav u stacionarnom stanju tj. koncentracija kompleksa ES je stalna u vremenu, ovaj model opisuje slijedeća jednadžba aktivnosti (izvod u Prilogu)

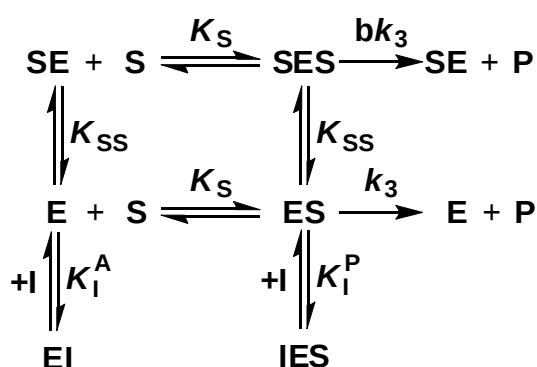
$$v = \frac{V_m}{\left(\frac{K_S}{S} + 1\right)} \cdot \frac{(1 + b \cdot S/K_{SS})}{(1 + S/K_{SS})} \quad (1.10)$$

Usporedbom jed. 1.10 sa Michaelis-Menten-inom jed.1.3 uočavamo da se radi o produktu Michaelis-Menten-ine jed. sa kvocijentom koji u sebi sadrži parametre b i K_{SS} . Kada bi parametar b izjednačili s jedan, kvocijent bi se pokratio i jed. 1.10 poprimila bi oblik Michaelis-Menten-ine jed. 1.3. Konstanta K_S u tom slučaju postaje Michaelis-ova konstanta K_m .

G. Cauet i suradnici primijenili su Webb-ov model u opisu aktivnosti BChE konjskog seruma i uočili da se Webb-ov model može reducirati budući da su slijedeće enzimске specije E, ES, SE i SES u termodinamičkoj ravnoteži.³⁸ Iz termodinamike proizlazi da nije bitan put kojim se postiže neko stanje već razlika u slobodnim energijama početnog i konačnog stanja. Stoga ravnotežu $E \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons SES$ možemo zanemariti, a ako je vrijednost K_{SS} konstante puno veća od K_S konstante tada također omjer K_S / K_{SS} možemo zanemariti. Cauet-ova jednačba aktivnosti BChE glasi

$$v = \frac{V_m \cdot (1 + b \cdot S/K_{SS})}{(K_S / S + S/K_{SS} + 1)} \quad (1.11)$$

Iz Webb-ovog modela izveo sam model inhibicije enzima reverzibilnim inhibitorom. Pretpostavio sam vezanje inhibitora u aktivno i periferno mjesto na enzimu sa odgovarajućim konstantama disocijacije K_I^A i K_I^P . Budući da je etopropazin kompetitivni inhibitor BChE i kod koncentracija supstrata nižih od $100 \mu\text{mol dm}^{-3}$, u modelu sam ispustio ravnotežu između EI i IES kompleksa. Ta ravnoteža značila bi nekompetitivnu inhibiciju BChE (jed. 1.7) u području koncentracija supstrata nekoliko puta nižih od K_{SS} .



Slika 1.10 Shema reverzibilne inhibicije enzima izvedena iz Webb-ovog modela.

Iz ovog modela izveo sam slijedeću jednačbu inhibicije enzima

$$v = \frac{V_m \cdot (1 + b \cdot S/K_{SS})}{K_S (1 + I / K_I^A) / S + (1 + S/K_{SS} + I / K_I^P)} \quad (1.12)$$

U jednadžbi je prvi član nazivnika jednak onome u jed. za kompetitivnu inhibiciju izvedenu iz Michaelis-Menten-ina modela (jed. 1.5), dok drugi član nazivnika opisuje kompeticiju inhibitora i supstrata za periferno mjesto na enzimu. Načinio sam dvije izmjene modela inhibicije. U prvoj izmjeni ispustio sam konstantu K_I^P pa jednadžba aktivnosti glasi

$$v = \frac{V_m \cdot (1 + b \cdot S/K_{ss})}{K_s(1 + I/K_I^A) / S + (1 + S/K_{ss})} \quad (1.13)$$

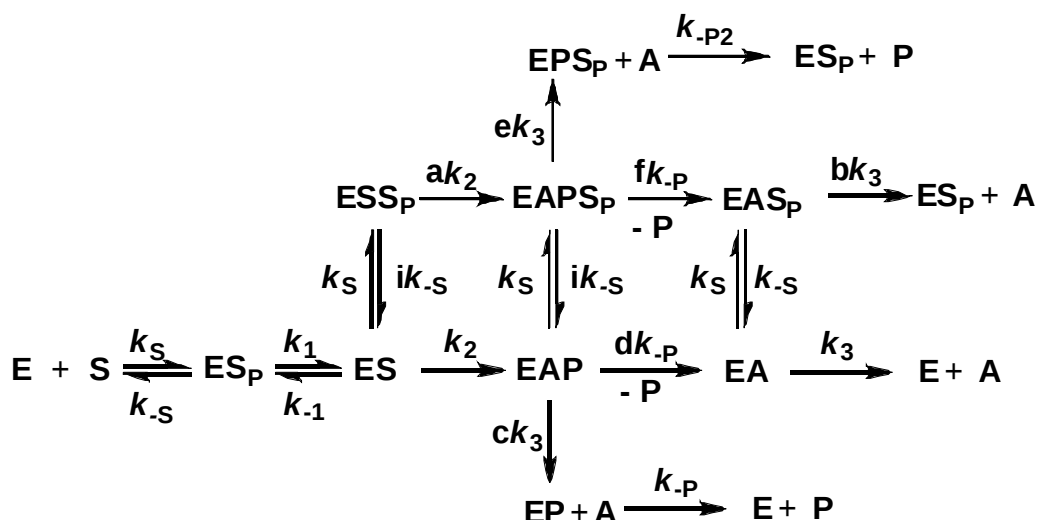
U drugoj izmjeni sam izjednačio konstante K_I^A i K_I^P , te se jednadžba za aktivnost mijenja u

$$v = \frac{V_m \cdot (1 + b \cdot S/K_{ss})}{K_s(1 + I/K_I^A) / S + (1 + S/K_{ss} + I/K_I^A)} \quad (1.14)$$

1.4.1.4. T. L. Rosenberry

T. L. Rosenberry i suradnici predložili su detaljan mehanizam hidrolize supstrata acetilkolinesterazom koji uključuje vezanje druge molekule supstrata na periferno mjesto na enzimu i njen utjecaj na cjelokupnu enzimsku aktivnost (Slika 1.11).³⁹ Model predviđa razlike u konstantama brzina aciliranja k_2 , deaciliranja k_3 , eliminacije produkta k_p pod utjecajem periferno vezane molekule supstrata. Model predviđa i dva alternativna puta nastajanja produkata i to da se u prvom stupnju oslobađa produkt P pa potom produkt A ili drugi put kod kojeg prvo nastaje produkt A pa potom produkt P. Ovaj model ne predviđa razliku u vezanju supstrata na periferno mjesto enzima bez obzira da li je aktivno mjesto slobodno ili acilirano, ali pretpostavlja razliku u afinitetu perifernog mjesta za supstrat ukoliko je produkt P još prisutan u aktivnom mjestu enzima.

Ovaj model je poprilično složen te ga nisam primijenio u analizi eksperimentalnih podataka budući da bi bilo vrlo teško evaluirati svih 13 kinetičkih parametara iz dostupnih eksperimentalnih podataka.

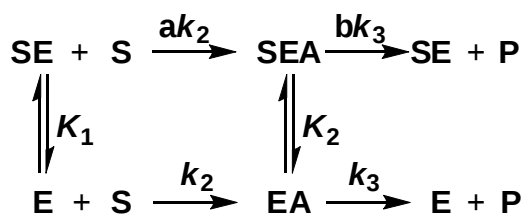


Slika 1.11 Shema reakcije hidrolize supstrata acetilkolinesterazom prema Rosenberry-u.³⁹

1.4.1.5. J. Stojan—D. Fournier

J. Stojan, D. Fournier i suradnici predložili su nekoliko kinetičkih modela koji opisuju enzimsku hidrolizu supstrata ATCh.⁴⁰⁻⁴² Eksperimentalno su koristili enzim AChE iz vinske mušice (lat. *Drosophila melanogaster*) koji pokazuje inhibiciju aktivnosti pri višim koncentracijama supstrata kao i AChE kralježnjaka. Osnovni kriterij u razvoju kinetičkog modela je taj da se sa minimalnim brojem kinetičkih parametara opiše složena kinetika kolinesteraza, a da se pri tome postigne najmanje odstupanje teoretske krivulje od eksperimentalnih podataka.

Kako bi se smanjio broj kinetičkih parametara u modelu (Slika 1.12) konstanta disocijacije reverzibilnog enzim-supstrat kompleksa K_s uključena je u konstantu aciliranja serina k_2 , budući da ne pretpostavlja nakupljanje ES kompleksa tijekom reakcije. U usporedbi sa Michaelis-Menten-inim modelom, to bi značilo da je povratna reakcija disocijacije ovog kompleksa izrazito spora, odnosno $k_{-1} \ll k_{+1}$. Mehanistički, to znači da će svaka molekula supstrata koja uđe u aktivno mjesto enzima biti hidrolizirana od strane enzima, analogno van Slyke—Cullen-ovom modelu. Uporište ovoj pretpostavci pruža izrazito velika katalitička moć kolinesteraza. U modelu se uz parametar b pojavljuje i parametar a . Parametar a predstavlja utjecaj druge molekule supstrata, vezane na periferno mjesto na enzimu, na konstantu aciliranja serina k_2 . Konstante disocijacije enzim-supstrat kompleksa K_1 i K_2 odnose se na periferno vezani supstrat uz pretpostavku da aciliranje serina može imati utjecaja na promjenu afiniteta enzima za periferno vezanje supstrata.

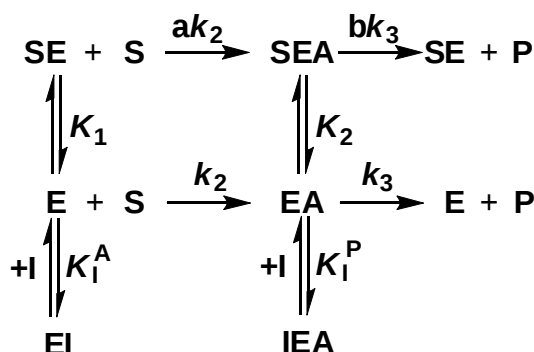


Slika 1.12 Shema reakcije između enzima i supstrata prema Stojanu i Fournier-u.⁴⁰

Iz navedenog modela izvodi se slijedeća jednačba enzimске aktivnosti

$$v = \frac{E_0 k_3 S}{S(1 + S/K_2)/(1 + b \cdot S/K_2) + k_3(1 + S/K_1)/[k_2(1 + a \cdot S/K_1)]} \quad (1.15)$$

Stojan-Fournier-ov model sam proširio tako da uključuje inhibiciju reverzibilnim inhibitorom (Slika 1.13). Pretpostavio sam dvije mogućnosti u modelu, kompeticiju inhibitora i supstrata u aktivnome mjestu enzima i također kompeticiju u perifernome mjestu enzima. Afinitet enzima za inhibitor predstavljaju konstante disocijacije enzim-inhibitor kompleksa u aktivnome mjestu K_I^A i u perifernome mjestu enzima K_I^P .



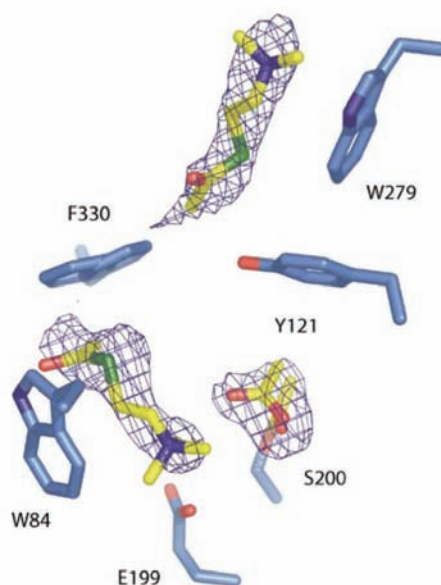
Slika 1.13 Shema reverzibilne inhibicije enzima izvedena iz Stojan-Fournier-ovog modela.

Iz sheme reverzibilne inhibicije enzima (Slika 1.13) izveo sam slijedeću jednačbu aktivnosti enzima u prisutnosti reverzibilnog inhibitora

$$v = \frac{E_0 k_3 S}{S(1 + \frac{S}{K_2} + \frac{I}{K_I^P})/(1 + b \cdot S/K_2) + k_3(1 + \frac{S}{K_1} + \frac{I}{K_I^A})/[k_2(1 + a \cdot S/K_1)]} \quad (1.16)$$

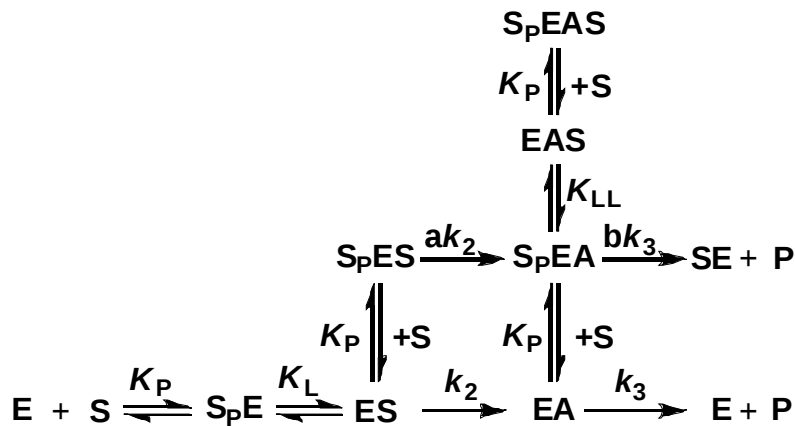
Stojan i Fournier proširili su svoj model reakcije između supstrata i kolinesteraze uključivši u njega najnovije kristalografske spoznaje o vezanju supstrata ATCh u aktivno

mjesto enzima (Slika 1.14).⁴² Uspjelo se prirediti kristalnu strukturu AChE iz ribe *Torpedo californica* sa supstratom koji je bio u tolikom suvišku da je u potpunosti inhibirao aktivnost enzima ($\text{ATCh} = 0,50 \text{ mol dm}^{-3}$). Budući da je aktivnost enzima bila inhibirana, u kristalima su se uspjele uočiti uz acilirani serin katalitičke trijade, još dvije molekule ATCh vezane u aktivnome mjestu enzima (Slika 1.14). Kako ovo nisu uobičajeni odnosi koncentracija enzima i supstrata, koji se inače primjenjuju u kinetičkim pokusima, nije bilo moguće do sada potvrditi ovakav mehanizam hidrolize temeljem kinetičkih mjerenja.



Slika 1.14 Kristalna struktura acetilkolinesteraze sa supstratom acetiltiokolinom (0.5 mol dm^{-3}) vezanim u aktivnom mjestu enzima. Slika je preuzeta iz Ref. 42.

Dosadašnji model (Slika 1.12) proširen je uvođenjem nekoliko dodatnih ravnotežnih reakcija koje se odnose na vezanje supstrata na enzim (Slika 1.14).^{41,42} Autori su izjednačili konstante disocijacije K_1 i K_2 koje se odnose na vezanje supstrata na periferno mjesto na enzimu i zamijenili ih konstantom K_p . Također su u model uvrstili reverzibilni kompleks enzima i supstrata u aktivnome mjestu ES sa konstantom ravnoteže K_L koja se odnosi na ravnotežu izomernih formi kompleksa enzima i supstrata u aktivnome ES i perifernome mjestu S_pE . Analogno konstanti K_L uvedena je konstanta K_{LL} koja se odnosi na acilirani enzim. Najveća razlika između dva Stojan-Fournier-ova modela (Slika 1.12 i Slika 1.15) je ta, što drugi model sada uključuje tercijarne komplekse enzima sa dvije molekule supstrata S_pES i S_pEAS .

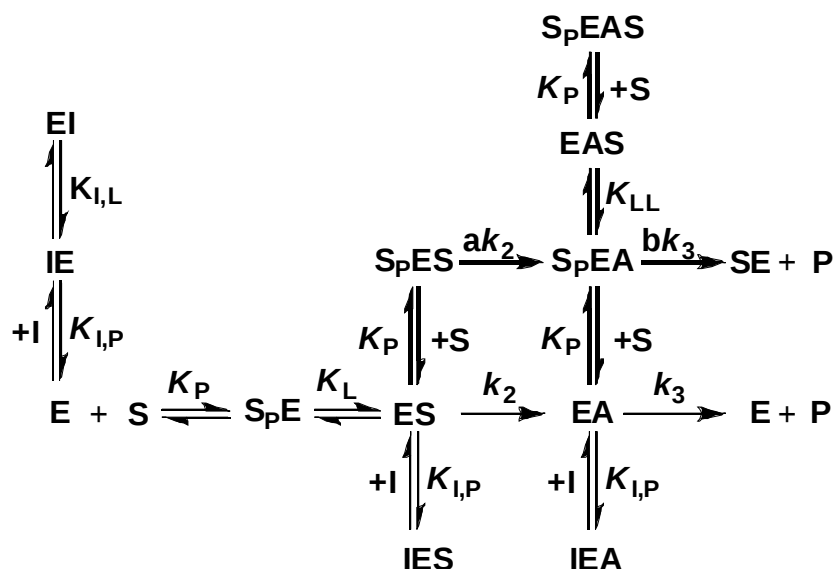


Slika 1.15 Proširena shema reakcije između enzima i supstrata prema Stojanu i Fournier-u.⁴² Dani kinetički model temelji se na modelu opisanom shemom 1.12.

Jednadžba reakcije enzima i supstrata izvedena iz proširenog Stojan-Fournier-ovog modela glasi

$$v = \frac{E_0 k_3 S}{S(1 + \frac{S}{K_P} + \frac{S}{K_P K_{LL}} + \frac{S^2}{K_P^2 K_{LL}})/(1 + b \cdot \frac{S}{K_P}) + k_3 K_P K_L (1 + \frac{S}{K_P} + \frac{S}{K_P K_L} + \frac{S^2}{K_P^2 K_L})/[k_2(1 + a \cdot \frac{S}{K_P})]} \quad (1.17)$$

Ovaj model sam također proširio uključivši kompeticiju inhibitora i supstrata u aktivnome mjestu enzima i također kompeticiju u perifernome mjestu enzima (Slika 1.16). Afinitet enzima za inhibitor predstavljaju konstante disocijacije enzim-inhibitor kompleksa u aktivnome mjestu K_I^A i u perifernome mjestu enzima K_I^P . Ponovno prema analogiji sa K_L konstantom K_I^A konstanta predstavlja ravnotežu izomernih formi enzima s inhibitorom vezanim u aktivnome i perifernome mjestu.



Slika 1.16 Shema reverzibilne inhibicije enzima izvedena iz proširenog Stojan-Fournier-ovog modela reakcije enzima i supstrata (Slika 1.15).

Iz modela proširenog za stvaranje reverzibilnih kompleksa inhibitora sa enzimom izveo sam slijedeću jednadžbu aktivnosti enzima u prisutnosti inhibitora

$$v = \frac{E_0 k_3 S}{A + B} \quad (1.18)$$

$$\begin{aligned} A &= S(1 + \frac{S}{K_P} + \frac{S}{K_P K_{LL}} + \frac{S^2}{K_P^2 K_{LL}} + \frac{I}{K_{I,P}})/(1 + b \cdot \frac{S}{K_P}) \\ B &= k_3 K_P K_L (1 + \frac{S}{K_P} + \frac{S}{K_P K_L} + \frac{S^2}{K_P^2 K_L} + \frac{SI}{K_P K_I K_{I,P}} + \frac{I}{K_{I,P}} + \frac{I}{K_{I,L} K_{I,P}})/[k_2 (1 + a \cdot \frac{S}{K_P})] \end{aligned} \quad (1.19)$$

1.4.2. Učinak temperature na enzimsku aktivnost⁴³

U kinetici je poznat utjecaj temperature na ireverzibilne kemijske reakcije koji je opisao S. A. Arrhenius i dok su J. W. Gibbs i J. H. van't Hoff opisali utjecaj na ravnotežne reakcije. Budući da su enzimi prirodni katalizatori, koji ubrzavaju kemijsku reakciju snižavanjem energije prijelaznog stanja bez utjecaja na ravnotežu između reaktanata i produkata, na njih se također mogu primijeniti zakoni koji vrijede i za enzimski ne katalizirane reakcije. Kod enzima je bitno spomenuti da zagrijavanjem enzima iznad fiziološke temperature nastupa denaturacija enzima. Tim procesom, iako ne dolazi do cijepanja kovalentnih veza, narušava se terciarna struktura enzima prekidanjem vodikovih veza i drugih slabih veza unutar polipeptidnog lanca enzima. To

je posljedica razlike u jačinama veza budući da energija prosječne vodikove veze iznosi 20 kJ mol^{-1} , a energija kovalentne veze oko 400 kJ mol^{-1} . Tijekom denaturacije zamjenjuju se intramolekulske vodikove veze s onima između polipeptidnog lanca i molekula otapala, odnosno vode. Kada se mjeri aktivnost nekog enzima kao funkcija temperature treba imati na umu da je donja granica temperature točka leđišta reakcijske smjese, a gornja granica je već spomenuta temperatura denaturacije enzima. Temperatura kod koje je 50% strukture enzima narušeno, definira se kao temperatura denaturacije enzima.

Rezultati koji se dobiju iz ovakvog eksperimentalnog pristupa nisu uvijek jednoznačni te njihova interpretacija zahtijeva oprez budući da promjena temperature može utjecati na promjenu konformacije enzima, uzrokovati pojavu izoformi enzima te može djelovati i na supstrat.

2. CILJ RADA

Acetilkolinesteraza i butirilkolinesteraza su stereoselektivni enzimi što se očituje u njihovoj interakciji s kiralnim supstratima kao što su kinuklidinski esteri i kiralnim inhibitorima kao što esteri fosforne i karbaminske kiseline. Ovi spojevi se kovalentno vezu u katalitičko mjesto enzima. Razlika u brzini reakcije između enantiomera kiralnog spoja posljedica je prostornog rasporeda radikala na kiralnom atomu i mogućnosti njihovog smještaja u aktivnom centru enzima. Enantiomer koji bolje pristaje u aktivni centar enzima brže i reagira s enzimom, odnosno ima veći afinitet za enzim nego drugi enantiomer.³⁰⁻³⁵

Ovim radom želio sam istražiti mehanizam inhibicije kolinesteraza enantiomerima i racematom etopropazina. Etopropazin je reverzibilni inhibitor butirilkolinesteraze koji stvara samo nekovalentne veze unutar aktivnog mjesta enzima. On se koristi kao specifični inhibitor butirilkolinesteraze prilikom mjerenja aktivnosti acetilkolinesteraze u preparatima koji sadrže oba enzima. Interakcije kolinesterazâ i etopropazina mjerio sam pomoću standardnih i brzih kinetičkih metoda mjerenja aktivnosti enzima u prisutnosti supstrata acetiltiokolina, te neposrednim mjerenjem vezanja etopropazina na enzime bez prisutnog supstrata.

Rezultate eksperimentalno izmjerenih enzimskih aktivnosti u odsutnosti i prisutnosti etopropazina interpretirao sam primijenivši osam kinetičkih modela. Modeli se razlikuju po pretpostavkama vezanja inhibitora u aktivno i/ili periferno mjesto na enzimu i po vrsti kompleksâ enzima koji mogu nastati vezanjem supstrata i/ili inhibitora. Modeli su iskušani prilagodbom teoretskih jednadžbi izvedenih iz predloženih kinetičkih modela na eksperimentalno izmjerene enzimske aktivnosti u odsutnosti i prisutnosti etopropazina, te su izračunane katalitičke konstante hidrolize acetiltiokolina i konstante disocijacije etopropazina. Valjanost kinetičkog modela, dodatno sam iskušao prilagodbom teoretske krivulje na eksperimentalne podatke izmjerene pri raznim temperaturama. Promjena temperature utiče na enzimsku aktivnost te se očekuje da će pružiti dodatne podatke o mehanizmu enzimske reakcije sa supstratom i enzimom. Kako bih povezao stereoselektivnost butirilkolinesteraze sa strukturom aktivnog mjesta enzima, odredio sam konstante reverzibilne inhibicije butirilkolinesteraze čovjeka, miša i konja, te nekih mutanata mišje acetilkolinesteraze kojima su promijenjene aminokiseline unutar aktivnog mjesta.

Da bi se utvrdila stereoselektivnost kolinesteraza prema enantiomerima etopropazina, bilo je potrebno prethodno odijeliti enantiomere etopropazina iz racemata primjenom kiralne tekućinske kromatografije i frakcijske kristalizacije.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Enzimski preparati

Kao izvor enzima korištena je ljudska krv (acetilkolinesteraza iz eritrocita i butirilkolinesteraza iz seruma), pročišćeni preparat BChE seruma konja, te rekombinantna AChE, BChE i mutanti AChE miša.

Uzorci krvi, dobiveni od zdravih osoba, uzimani su u heparinizirane epruvete i centrifugirani 20 minuta, nakon čega je plazma odvojena od eritrocita. Za mjerenje enzimske aktivnosti eritrociti su dva puta isprani od ostataka plazme i razrijeđeni u fosfatnom puferu ($0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) do volumena pune krvi. Kao izvor BChE korištena je plazma više osoba koje imaju ili samo uobičajenu serumsku butirilkolinesterazu i/ili koju od varijanti (inačica) BChE. Fenotip BChE utvrđen je uobičajenom procedurom za fenotipiranje butirilkolinesteraze.^{12,13}

BChE iz konjskog seruma komercijalno je dostupan preparat (Sigma, SAD), kojoj se titracijom s organofosforim inhibitorom (DEPQ) poznate koncentracije odredila koncentracija aktivnih mjesta.^{44,45}

Rekombinantni enzimi AChE, BChE te mutanti AChE miša bili su poklon prof. P. Taylora sa kalifornijskog sveučilišta San Diego, SAD. Ovi enzimi priređeni su metodama genetičkog inženjerstva i ekspresijom u embrionalnim stanicama ljudskih bubrega (HEK 293).⁸

3.2. Supstrati i inhibitori

Kao supstrati kolinesteraza korišteni su: acetiltiokolinov jodid (ATCh; Fluka-BioChemika, Švicarska i Sigma, SAD) i butiriltiokolinov jodid (BTCh; Sigma, SAD). Kao inhibitori korišteni su racemični etopropazin (Sigma, SAD) i razdvojeni enantiomeri etopropazina te organofosforini inhibitor DEPQ (7-(O,O'-dietilfosfiniloksi)-1-metilkinolinijev metilsulfat).⁴⁴ Osnovne otopine ATCh (150 mmol dm^{-3}) i BTCh (100 mmol dm^{-3}) te racemičnog i enantiomerno čistog etopropazina ($1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$) pripremane su u deioniziranoj vodi.

3.3. Pufer i reagensi

Pufer korišten u eksperimentima opisanima u ovom radu bio je natrijev fosfatni pufer ($0,1 \text{ mol dm}^{-3}$; pH 7,4). Pufer je dobiven titracijom vodenih otopina odgovarajućih soli Na_2HPO_4 i NaH_2PO_4 , koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$. pH pufera određivan je SevenEasy

pH-meterom sa InLab[®] 413 kombiniranom elektrodom (Mettler-Toledo GmbH, Švicarska) na 25 °C. Za kalibraciju pH-metra korištena je standardna puferka otopina (pH 7.00 ± 0.01; Mettler-Toledo GmbH, Švicarska). Tiolni reagens DTNB (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina) (Sigma, SAD) priređivan je kao 6,6 mmol dm⁻³ otopina u fosfatnom puferu (0,1 mol dm⁻³; pH 7,4).

3.4. Odjeljivanje enantiomera etopropazina

3.4.1. Frakcijska kristalizacija

Za odjeljivanje enantiomera etopropazina u većim količinama primijenjena je frakcijska kristalizacija diastereoselektivnih soli dibenzoilne vinske kiseline. Ovaj postupak opisan je u literaturi za spoj prometazin koji je kemijski srodan etopropazinu.⁴⁶ Kako bi se dobila slobodna baza etopropazina dodano je 3,01 g (8,63 mmol) racemičnog etopropazin hidroklorida, etera i vodena otopina natrijeva hidroksida (2 mol dm⁻³). Eterski sloj je odijeljen od suspenzije, a preostali vodeni sloj dodatno je u dva navrata ispiran eterom. Eterski slojevi su spojeni i sušeni na kalijevom karbonatu. Nakon sušenja eter je uklonjen uparivanjem uz sniženi tlak i dobiveno je 2,71 g slobodne baze (8,67 mmol). Količina dobivene baze prividno je viša zato jer nije bilo moguće uparivanjem ukloniti sav eter. Ovako dobivena baza otopljena je sa suviškom O,O'-dibenzoil-D-vinske kiseline (8,67 mmol) u kipućem acetonu. Nakon spontanog hlađenja otopine istaložili su se bijeli kristali koji su potom izolirani filtriranjem te dodatno pročišćeni dvostrukom kristalizacijom iz acetona i završnom kristalizacijom iz apsolutnog etanola. Kristali etopropazinijevog dibenzoil-D-tartarata (1,08 g) prevedeni su u hidroklorid prevođenjem etopropazina u slobodnu bazu i taloženjem etopropazin hidroklorida iz eterske otopine propuhivanjem plinovitog vodikovog klorida. Kao finalni produkt dobiven je (-)-etopropazin hidroklorid, 0,60 g, uz iskorištenje 40% i enantiomernu čistoću 99,1% ([α]_D = -11,5°; c = 0,05, EtOH). Spajanjem matičnica i njihovim uparivanjem do suha te naknadnom ekstrakcijom slobodne baze etopropazina dobiveno je 1.50 g (4,80 mmol) etopropazina. Već opisanim postupkom kristalizacije etopropazina sa O,O'-dibenzoil-L-vinskom kiselinom (4,80 mmol) dobiven je u konačnici (+)-etopropazin hidroklorid, 0,76 g, uz iskorištenje 51% i enantiomernu čistoću 97,9% ([α]_D = +11,7°; c = 0,07, EtOH).

3.4.2. Kiralna tekućinska kromatografija (HPLC)

Kromatografija visoke učinkovitosti provedena je na Knauer HPLC sustavu (Knauer GmbH, Njemačka) koji se sastojao od Knauer WellChrom Maxi-Star K-1001 pumpe, injektora sa 20 μ L petljom (Knauer HPLC 6-port-valves) i UV detektora (KnauerWellChrom K-2500). Odjeljivanje pikova na koloni praćeno je na valnoj duljini $\lambda=254$ nm. Za računalnu analizu kromatograma korišten je računalni program Knauer Eurochrom 2000. Tijekom kromatografske analize praćeni su slijedeći parametri:

k_1' : faktor kapaciteta za prvoizlazeći enantiomer (t_1/t_0-1 , $t_{1(2)}$ -vrijeme zadržavanja analita na koloni, t_0 -vrijeme izlaska fronte otapala);

k_2' : faktor kapaciteta za drugoizlazeći enantiomer (t_2/t_0-1);

α : faktor selektivnosti ($\alpha=k_2'/k_1'$);

R_s : faktor rezolucije ($R_s=2(k_2'-k_1')/(w_1+w_2)$, w je širina kromatografskog pika na baznoj liniji koju ocrtavaju tangente kroz točke infleksije na bočnim stranicama kromatografskog pika).

HPLC kolone polisaharidnog tipa s kiralnim nepokretnim fazama proizvod su Daicel Chemical Industries, Ltd. (Japan), a kolone četkastog tipa također sa kiralnim nepokretnim fazama proizvodi Iris Technologies, Inc. (SAD). Sve su kolone bile analitičkog tipa, duljine 250 mm i unutrašnjeg promjera 4,6 mm.

3.4.3. Cirkularni dikroizam (CD)

CD spektri enantiomera etopropazin hidroklorida snimani su na JASCO J-810 spektropolarimetru (JASCO Research Ltd., Kanada) na 25 °C u kvarcnim kivetama s optičkim putom 1 cm. Koncentracije etopropazina tijekom mjerenja bile su u rasponu $(1-6) \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³.

3.4.4. Optičko zakretanje

Optičko zakretanje etanolskih otopina enantiomera etopropazin hidroklorida određivano je na PolAAR 21 automatskom polarimetru (Optical Activity Ltd., Engleska) pri sobnoj temperaturi (~ 25 °C) u kiveti optičkog puta 10 cm.

3.4.5. Nuklearna magnetska rezonancija (NMR)

Za snimanje NMR spektara korišten je Bruker Avance DRX500 spektrometar koji radi na frekvenciji protona od 500,13 MHz i sadrži 5 mm probu za obrnutu detekciju i dodatak za z-gradijente. ^1H -NMR spektri su snimani sa spektralnom širinom od 9 000 Hz, 65 000 točaka u spektru uz digitalnu rezoluciju od 0,05 Hz po točki i sa 8-16 skeniranja. Tetrametilsilan (TMS) je bio unutarnji standard. Uzorci od 20 mg bili su otapani u etanolu- d_6 , kloroformu- d_1 ili acetonitrilu- d_3 . ^{13}C APT NMR spektri su snimani sa spektralnom širinom od 25 000 Hz, 65 000 točaka u spektru uz digitalnu rezoluciju od 0,05 Hz po točki i sa 200-500 skeniranja (APT eng. *Attached Proton Test*).

Dvodimenzijски DQF COSY spektri snimani su uz 7 000 Hz spektralnu širinu u obje domene, 1 000 točaka u vremenskoj domeni i 512 inkrimenata za svaki set podataka uz linearnu predikciju i „zero filling” 1 000 točaka (DQF COSY eng. *Double Quantum Filtered - Correlation Spectroscopy*). Vrijeme relaksacije bilo je dvije sekunde, a spektri su obrađeni sa sinusnim uteznim funkcijama. Digitalna rezolucija bila je 6,8 Hz po točki u obje f1 i f2 domene nakon dva skeniranja.

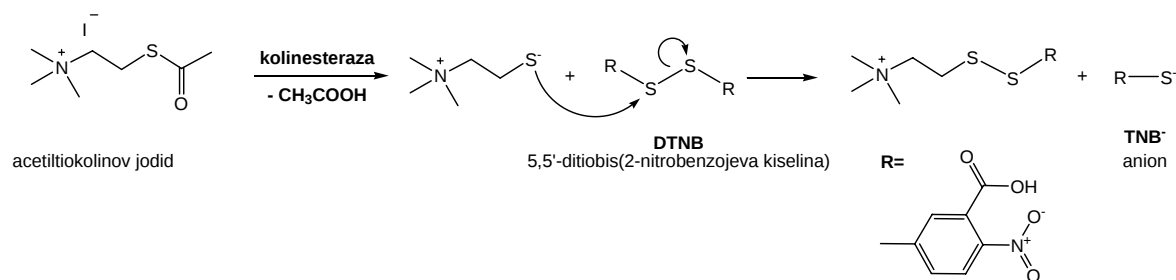
HSQC (eng. *Heteronuclear Single Quantum Correlation*) i HMBC (eng. *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) spektri snimani su uz vrijeme relaksacije od 1,5 sekundi i osam skeniranja po inkrementu. Širina spektra od 7 000 Hz bila je u akvizicijskoj domeni f2 i širina od 25 000 Hz u vremenskoj domeni f1. Podatci su prikupljeni u matricu (1024 X 256) i obrađeni pomoću transformirajuće matrice (2 000 x 1 000) uz „zero filling” u f1 domeni. Digitalna rezolucija bila je 2,4 Hz i 20,3 Hz po točki u odgovarajućim f1 i f2 domenama. Sinusna multiplikacija provedena je prije Fourierove transformacije. U HMBC spektrima, relaksacija sparivanja dugog dometa bila je podešena na 60 ms.

Dvodimenzijски TPPI NOESY spektri snimani su uz vrijeme miješanja od 400 ms i obrađeni sa sinusnom kvadratnom funkcijom pomaknutom za $\pi/2$ u obje domene (TPPI eng. *Time-Proportional Phase Increment*). Širina spektra bila je 7 000 Hz u obje domene i vrijeme relaksacije 1,5 sekundi. Podatci su prikupljeni u matricu (2 048 x 512) te obrađeni pomoću transformirajuće matrice (2 000 x 1 000). Spektri su snimani uz 8 skeniranja uz digitalnu rezoluciju 3,4 i 6,8 Hz po točki u pripadajućoj f1 i f2 domeni.

3.5. Mjerenje aktivnosti kolinesteraza

3.5.1. Standardna spektrofotometrijska metoda

Enzimsko aktivnost acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze prema ATCh i BTCh, u odsutnosti i u prisutnosti inhibitora, mjerena je spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu koristeći DTNB kao tiolni reagens.⁴⁷ Enzimskom hidrolizom supstrata nastaje tiokolin koji reagira s DTNB-om pri čemu se oslobađa žuto obojeni anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB⁻ anion, Slika 3.1), a porast apsorbancije aniona prati se na valnoj duljini $\lambda=412$ nm. Kao spektrofotometar korišten je CARY 300 s termostatiranjem (Varian Inc., Australija). Reakcijska smjesa sadržavala je 0,1 mol dm⁻³ fosfatni pufer pH=7,4, 0,33 mmol dm⁻³ DTNB, enzim (kontrolna proba) ili enzim i inhibitor (inhibirana proba), dok je ATCh dodavan na kraju. Usporedo je mjerena aktivnost inhibiranih i kontrolnih proba. Ukupni volumen reakcijske smjese bio je 1,0 mL. Konačno razrjeđenje eritrocita bilo je 600 puta, a mjerenja aktivnosti rađena su prema slijepoj probi koja je sadržavala eritrocite, DTNB i pufer. Konačno razrjeđenje plazme bilo je 300 puta, a mjerenja aktivnosti su rađena prema slijepoj probi koja je sadržavala pufer i DTNB. Mjerenje aktivnosti započeto je trideset sekundi nakon dodatka supstrata u reakcijsku smjesu. Kod svih mjerenja promjena apsorbancije $\Delta A/\text{min}$ bila je približno 0,1 i linearna s vremenom odnosno mjerenja su provedena u uvjetima nepromjenjivosti početne koncentracije supstrata. Na sličan je način mjerena aktivnost BChE iz konjskog seruma, rekombinantnih mišjih enzima: AChE, mutanata AChE i BChE. Aktivnost enzima izražena kao promjena apsorbancije po minuti ($\Delta A/\text{min}$) preračunana je i izražena u μmol -ovima hidroliziranog supstrata u minuti po mililitru uzorka krvi, plazme ili koncentraciji aktivnih mjesta enzima. Prilikom računa enzimске aktivnosti korištena je vrijednost molarog ekstinkcijskog koeficijenta (ϵ) koja odgovara temperaturi na kojoj su mjerenja izvođena.⁴⁸ Sve aktivnosti korigirane su za spontanu hidrolizu ATCh. Konačne koncentracije reagenasa bile su: DTNB (0,33 mmol dm⁻³), ATCh (0,0020–75 mmol dm⁻³), etopropazina (0,020–20 $\mu\text{mol dm}^{-3}$).



Slika 3.1 Shematski prikaz Ellman-ove metode.

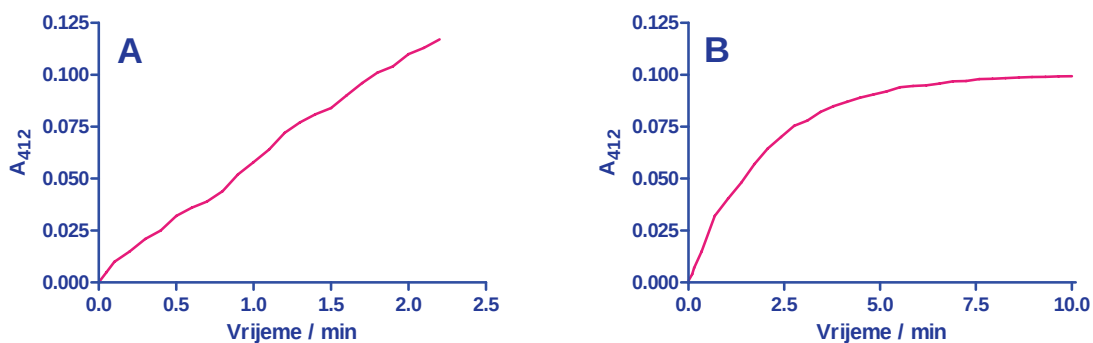
3.5.2. Spektrofotometrijska metoda zaustavljenog protoka

Tehnika zaustavljenog protoka omogućava spektrofotometrijsko mjerenje enzimske aktivnosti neposredno nakon miješanja reaktanata (desetak milisekundi, koliko iznosi mrtvo vrijeme uređaja odnosno vrijeme miješanja reaktanata) kao i precizno mjerenje aktivnosti pri malim koncentracijama supstrata u uvjetima njegove potpune hidrolize, odnosno visokih aktivnosti u uvjetima nepromjenjivosti početne koncentracije supstrata.

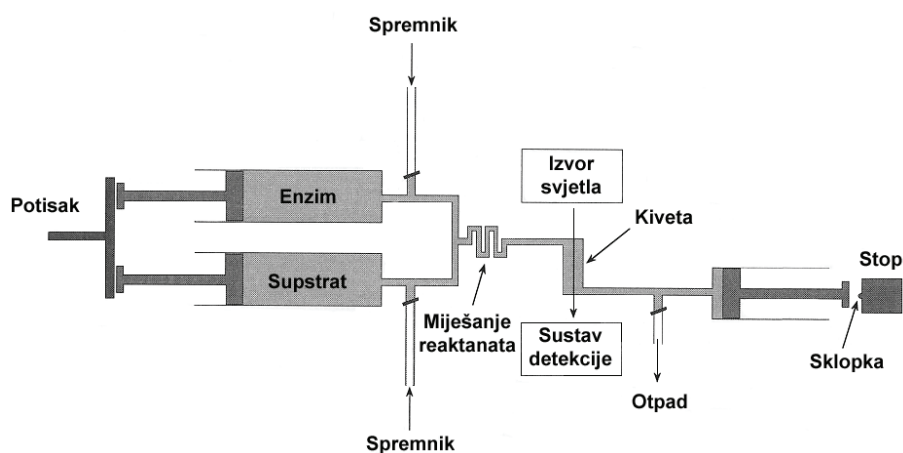
Mjerenje enzimske aktivnosti ovom tehnikom provedeno je na dva načina s obzirom na koncentraciju enzima i supstrata prisutnu tijekom mjerenja prema Ellman-ovoj metodi opisanoj u poglavlju 3.5.1. Prvi način karakterizira prisutnost manje koncentracije enzima u reakcijskoj smjesi zbog čega sporije nastaje produkt odnosno koncentracija supstrata se ne mijenja tijekom mjerenja i to opažamo kao linearni porast apsorbancije kroz nekoliko minuta. Ovi uvjeti su istovjetni onima koji se primjenjuju prilikom mjerenja aktivnosti klasičnom spektrofotometrijskom metodom (Slika 3.2A). Drugi način mjerenja karakterizira potpuna hidroliza supstrata u produkte. Ovakvo mjerenje zahtijeva više enzima u reakcijskoj smjesi kako bi brže nastupila potpuna hidroliza. U ovom slučaju opažamo eksponencijalni porast apsorbancije produkta koja s vremenom postiže maksimalnu vrijednost i ostaje nepromijenjena što se očituje kao plato reakcijske krivulje (Slika 3.2B). Vrijednost apsorbancije na platou eksponencijalne krivulje odgovara početnoj koncentraciji supstrata koja je korištena prilikom mjerenja. Reverzibilna inhibicija enzima mjerena je tako da je mjerena aktivnost BChE konja prema ATCh uz prisutnost najmanje četiri koncentracije inhibitora čije su koncentracije bile odabrane tako da inhibiraju BChE od ~10% do ~90%. Usporedo s mjerenjem inhibiranih proba, mjerena je i aktivnost kontrolnih proba za svaku koncentraciju ATCh.

Mjerenja su provedena na spektrofotometru CARY 300 (Varian Inc., Aut) s temperaturnom kontrolom i sa „stopped flow“ dodatkom (SFA-20 MX, Hi-Tech Scientific Ltd., UK) i na PQ/SF 53 „stopped flow“ uređaju (Hi-Tech Scientific Ltd., UK). „Stopped flow“ uređaj sastoji se od štrcaljki, komore za miješanje reakcijske smjese i kivete za mjerenje enzimske aktivnosti (Slika 3.3). Od ukupno četiri štrcaljki, tri se mogu koristiti za pohranu reaktanata npr. enzim, supstrat i inhibitor, dok četvrta služi za prihvatanje sadržaja iz kivete u kojoj se mjeri enzimska aktivnost. Reakcijska smjesa pripremala se tako što se u jednu štrcaljku stavljao enzim i DTNB, a u drugu supstrat, odnosno supstrat i inhibitor. U trenutku miješanja sadržaji iz obje štrcaljke miješaju se u omjeru

1:1, pa koncentracije reaktanata u štrcaljkama moraju biti dvostruko veće od koncentracija u kiveti tijekom mjerenja enzimske aktivnosti.



Slika 3.2 Mjerenje enzimske aktivnosti korištenjem spektrofotometrijske metode zaustavljenog protoka. Koncentracija enzima u reakcijskoj smjesi tako je odabrana da apsorbancija produkta raste linearno s vremenom (A) i eksponencijalno do potpune hidrolize supstrata (B).



Slika 3.3 Shematski prikaz rada uređaja sa zaustavljenim protokom „stopped flow“.

Mjerenja aktivnosti BChE prema ATCh provedena su na valnoj duljini $\lambda=412$ nm. Konačno razrjeđenje ishodne otopine enzima (2 mg cm^{-3}) bilo je 100 puta u uvjetima iscrpljivanja supstrata ili 2000 puta u uvjetima nepromjenjivosti početne koncentracije supstrata. Konačne koncentracije reagenasa bile su: DTNB ($0,33\text{--}0,50 \text{ mmol dm}^{-3}$), ATCh ($0,020\text{--}75 \text{ mmol dm}^{-3}$), etopropazina ($0,020\text{--}20 \text{ }\mu\text{mol dm}^{-3}$).

3.6. Metoda gašenja fluorescencije

Ova metoda pokazala se pogodnom za neposredno mjerenje konstanti disocijacije kompleksa kolinesterazâ i reverzibilnih liganada, jer ne zahtijeva prisutnost enzimskog supstrata.⁴⁹ Metoda se temelji na fluorescenciji enzimskih kromofora, koji je u našem slučaju aminokiselina triptofan. Da bi došlo do fluorescencije prvo treba pobuditi triptofane iz osnovnog u više energetske stanje njihovim izlaganjem UV zračenju ($\lambda_{\text{ex}}=280$ nm), a potom se prati fluorescencija kao posljedica vraćanja u osnovno energetske stanje ($\lambda_{\text{em}}=337$ nm). Kada se u otopinu enzima doda određena količina nekog liganda, npr. etopropazina, stvara se ravnoteža između kompleksa enzim-ligand i slobodnog enzima odnosno liganda. Posljedica nastajanja enzim-ligand kompleksa je gašenje triptofanske fluorescencije u aktivnom mjestu enzima radi njihovog zasjenjenja molekulama etopropazina. Budući da ravnoteža ne nastaje trenutno, moguće je mjeriti konstante brzine asocijacije (k_{+1}) i disocijacije (k_{-1}) kompleksa, a omjer tih konstanta daje ravnotežnu konstantu disocijacije (K_D). Ovom metodom određivane su konstante disocijacije (K_D) kompleksa etopropazina, u racemičnom i enantiomerno čistom obliku, i BChE konja, BChE miša, te mutanata AChE miša.

3.7. Jednadžbe primijenjene u obradi rezultata

Računalni programi

Komercijalni računalni programi korišteni prilikom izračunavanja kinetičkih konstanti bili su Excel 2002 (Microsoft Corp., SAD) i GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software Inc., SAD). Korišten je i nekomercijalni računalni program za izračun kinetičkih konstanta koji je originalno razvio Duggleby, a prilagodio Stojan.^{40,50}

Aktivnost enzima

Enzimsku aktivnost (v) računa se iz linearnog porasta apsorbancije ($\Delta A/\text{min}$) TNB aniona prema slijedećoj jednadžbi:

$$v = \frac{\Delta A/\text{min}}{\epsilon} \cdot \text{dil} \quad (3.1)$$

gdje je molarni ekstinkcijski koeficijent TNB aniona (ϵ) i faktor razrjeđenja osnovne otopine enzima (dil). Prilikom mjerenja aktivnosti s iscrpljivanjem supstrata (metoda zaustavljenog protoka) početna enzimsku aktivnost računa se prema danom izrazu:

$$v = \frac{A \cdot k}{\varepsilon} \cdot \text{dil} \quad (3.2)$$

gdje je A apsorbancija postignuta nakon potpune hidrolize supstrata (plato eksponencijalne krivulje) i k konstanta brzine. Produkt $A \cdot k$ predstavlja tangentu (nagib pravca) na eksponencijalnu krivulju koju opisuje jed. 3.3 u vremenu ($t=0$).

$$y = A \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) \quad (3.3)$$

Ostale jednadžbe enzimске aktivnosti koje su izvedene iz kinetičkih modela biti će opisane u poglavljima u kojima se raspravljaaju ti modeli.

Konstante disocijacije (Hunter-Downs prikaz)

Konstante disocijacije enzim-inhibitor kompleksa moguće je odrediti mjerenjem aktivnosti enzima u odsutnosti i prisutnosti inhibitora pri raznim koncentracijama supstrata. Osnovnu jednadžbu po kojoj se može provesti račun izveli su Hunter i Downs⁵¹, a u knjizi Aldridge-Reiner¹⁵ izvedene su jednadžbe za računanje konstanti disocijacije enzim-inhibitor kompleksâ uzevši u obzir vezanje supstrata i/ili inhibitora na alosteričko i/ili aktivno mjesto enzima.

Pravidna konstanta inhibicije enzima $K_{i,app}$ reverzibilnim inhibitorom definirana je slijedećim izrazom

$$K_{i,app} = \frac{I}{\frac{v_o}{v_i} - 1} \quad (3.4)$$

gdje je enzimska aktivnost u odsustvu inhibitora v_o , enzimska aktivnost u prisutnosti inhibitora v_i i koncentracija inhibitora I u reakcijskoj smjesi. Dani izraz može se transformirati u drugu jednadžbu pravca

$$\frac{v_o}{v_i} = \frac{I}{K_{i,app}} + 1 \quad (3.5)$$

Također se jed. 3.5 može prevesti u jednadžbu hiperbole poznatiju kao Hill-ova jednadžba

$$D.I. = 1 - \frac{v_i}{v_o} = \frac{A}{(K_{i,app} / I)^n + 1} \quad (3.6)$$

kojom se inhibicija iskazuje kao doseg inhibicije ($D.I.$; $0 \leq D.I. \leq 1$), A je maksimalni doseg inhibicije i parametar n je mjera idealnosti krivulje ili kooperativnost ($n > 0$). Jednadžba 3.6 preuredi se tako da nije u obliku razlomka i da v_o bude na lijevoj strani, a v_i na desnoj strani jednakosti

$$v_o \cdot K_{i,app} = v_i \cdot (I + K_{i,app}) \quad (3.5a)$$

Sada se može napisati jednačba recipročna jed. 3.5

$$\frac{v_i}{v_o} = \frac{K_{i,app}}{I + K_{i,app}} \quad (3.5b)$$

Množenjem jed. 3.5b sa -1 i naknadnim dodavanjem jedinice sa lijeve i desne strane dobiva se slijedeći izraz

$$1 - \frac{v_i}{v_o} = 1 - \frac{K_{i,app}}{I + K_{i,app}} = \frac{I + K_{i,app} - K_{i,app}}{I + K_{i,app}} = \frac{I}{I + K_{i,app}} \quad (3.5c)$$

koji je potrebno dodatno urediti dijeljenjem brojnika i nazivnika s koncentracijom inhibitora (I)

$$1 - \frac{v_i}{v_o} = \frac{I}{I + K_{i,app}} = \frac{1}{1 + K_{i,app}/I} \quad (3.5d)$$

Zamjenom jedinice u brojniku sa A i potenciranjem omjera ($K_{i,app}/I$) u nazivniku na n-tu dobiva se Hill-ova jed. 3.6.

Kako bi se iz niza prividnih konstanti inhibicije enzima ($K_{i,app}$) reverzibilnim inhibitorom odredila konstanta inhibicije enzima (K_i) koristi se Hunter-Downs jednačba:⁵¹

$$K_{i,app} = \frac{K_i}{K_{(S)}} \cdot S + K_i \quad (3.7)$$

U toj jednačbi S je koncentracija supstrata kod koje je određena prividna konstanta inhibicije ($K_{i,app}$) i ($K_{(S)}$) reverzibilna konstanta supstrata za slobodni enzim. Ako se pretpostavi da enzim ima alosteričko mjesto na koje se mogu vezati supstrati i/ili inhibitori dolazi se do izraza koji objedinjuje kompeticiju supstrata i inhibitora u aktivnom i alosteričkom mjestu enzima.¹⁵

$$K_{i,app} = \frac{(1 + K_{(S)}/S) \cdot (1 + S/K_{SS})}{(K_{(S)}/S) \cdot (1/K_a + 1/K_i + i/(K_a K_i)) + 1/K_i + K_{(S)}/(K_a K_{SS})} \quad (3.8)$$

U jed. 3.8 prividna konstanta inhibicije enzima ($K_{i,app}$) ovisi o koncentraciji inhibitora (i), ali i o koncentraciji supstrata (S). Konstante disocijacije kompleksa enzim-supstrat i enzim inhibitor u aktivnom mjestu enzima su $K_{(S)}$ i K_a , a konstante disocijacije kompleksa enzim-supstrat i enzim inhibitor u alosteričkom mjestu enzima su K_{SS} i K_i .

Konstante disocijacije (metoda gašenja fluorescencije)

Konstante disocijacije (K_d) za etopropazin i ChE preparate računane su prema slijedećim izrazima:

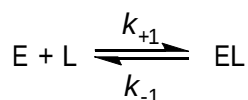
$$y = C \cdot e^{-k_{\text{obs}} \cdot t} \quad (3.9)$$

$$k_{\text{obs}} = k_{+1} \cdot L + k_{-1} \quad (3.10)$$

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \quad (3.11)$$

Jednadžbom 3.9 određuje se konstanta brzine gašenja fluorescencije (k_{obs}) koja eksponencijalno ovisi o vremenu (t). Eksponencijalna jednadžba (3.9) također je definirana platom (C) koji odgovara koncentraciji nastalog kompleksa enzim-etopropazin. Koreliranjem niza (k_{obs}) sa odgovarajućim početnim koncentracijama etopropazina (C_0), jed. 3.10., dobiva se pravac nagiba (k_{+1}) i odsječka na ordinati (k_{-1}), a omjer ovih dviju veličina definira konstantu disocijacije (K_D), jed. 3.11.

Jednadžba 3.9 izvedena je iz ravnoteže nastajanja i disocijacije kompleksa enzim-ligand (EL) gdje su slobodni enzim (E) i slobodni ligand (L), a konstanta brzine nastajanja kompleksa (k_{+1}) i konstanta brzine disocijacije kompleksa (k_{-1}).



Iz dane ravnoteže može se napisati diferencijalna jednadžba koja opisuje promjenu koncentracije kompleksa EL u vremenu t

$$\frac{\partial EL}{\partial t} = k_{+1} \cdot E \cdot L - k_{-1} \cdot EL, \quad (3.9a)$$

a supstituiranjem koncentracije slobodnog enzima E sa razlikom ukupne koncentracije enzima (E_0) i koncentracije nastalog EL kompleksa dobiva se slijedeći izraz:

$$E_0 = E + EL \Rightarrow \frac{\partial EL}{\partial t} = k_{+1} \cdot (E_0 - EL) \cdot L - k_{-1} \cdot EL \quad (3.9b)$$

Uređivanjem izraza sa desne strane jednakosti, odnosno izlučivanjem EL dobiva se izraz pogodan za integriranje uz supstituciju EL u x i uvođenjem parametara a i b .

$$\frac{\partial EL}{\partial t} = k_{+1} \cdot E_0 \cdot L - EL \cdot (k_{+1} \cdot L + k_{-1}) \Rightarrow \frac{\partial x}{\partial t} = a - b \cdot x \quad (3.9c)$$

$$a = k_{+1} E_0 L \quad b = k_{+1} L + k_{-1}$$

Uređivanjem izraza za integriranje i njegovim integriranjem uz granice integrala od 0 do ∞ dobiva se logaritamska jednadžba sa konstantom integriranja α .

$$\int_0^\infty \frac{\partial x}{a - b \cdot x} = \int_0^\infty \partial t \Rightarrow \frac{\ln(a - bx)}{-b} = t + \alpha \quad (3.9d)$$

Konstanta integriranja α izračuna se iz početnih uvjeta integriranja odnosno u $t=0$ koncentracija kompleksa EL jednaka je nuli ($x=0$)

$$t = 0 \Rightarrow x = 0 \quad \alpha = \frac{\ln a}{-b} \quad (3.9e)$$

Vrijednost konstante α uvrštava se u prijašnji izraz 3.9d

$$\frac{\ln(a - bx)}{-b} = t + \frac{\ln a}{-b} \quad (3.9f)$$

i logaritamski članovi se prebace na lijevu stranu i svedu pod zajedničko logaritmiranje uz množenje jednačbe sa $-b$.

$$\ln\left(\frac{a - bx}{a}\right) = -b \cdot t \quad (3.9g)$$

Nastali izraz pogodan je za antilogitmiranje i naknadno izlučivanje x koji predstavlja koncentraciju EL kompleksa sa lijeve strane jednačbe

$$1 - \frac{b}{a}x = e^{-bt} \Rightarrow x = \frac{a}{b}(1 - e^{-bt}) \quad (3.9h)$$

Budući da se eksperimentalno mjeri gašenje fluorescencije, promjena koncentracije enzima E , a dani izraz se odnosi na stvaranje kompleksa EL potrebno je jednačbu transformirati u oblik pogodan za praćenje gašenja fluorescencije. U prvom koraku lijeva i desna strana jed. se množi sa -1

$$x = \frac{a}{b}(1 - e^{-bt}) \mid \cdot (-1) \Rightarrow -x = -\frac{a}{b} + \frac{a}{b}e^{-bt} \quad (3.9i)$$

i u drugom koraku tako uredi da samo eksponencijalni dio ostane na desnoj strani, i tada se lijevu stranu može supstituirati sa y , a omjer a/b sa C

$$-x + \frac{a}{b} = \frac{a}{b}e^{-bt} \Rightarrow y = C \cdot e^{-bt} \quad (3.9j)$$

Uvrštavanjem umjesto b izraza sa konstantama brzina nastajanja i disocijacije kompleksa dobiva se jednačba koja opisuje gašenje fluorescencije:

$$y = C \cdot e^{-(k_{+1} \cdot L + k_{-1})t} \quad (3.9k)$$

Odnos konstanti disocijacije za racemat i enantiomere

S ciljem objedinjavanja inhibicije enzima enantiomerima i racematom etopropazina korišten je slijedeći izraz za K_i racemata kao funkciju $K_i^{R(S)}$ pojedinih enantiomera

$$K_i = \frac{2}{\frac{1}{K_i^R} + \frac{1}{K_i^S}} \quad (3.12)$$

Ova jednadžba izvodi se iz jed. za ravnotežnu konstantu disocijacije EI kompleksa (3.12a), gdje je I koncentracija racemata, odnosno ekvimolarne smjese enantiomera ($R:S=1:1$)

$$K_I = \frac{E \cdot I}{EI} \quad (3.12a)$$

pa koncentraciju kompleksa EI čini suma koncentracija kompleksa ER i ES

$$K_I = \frac{E \cdot I}{EI} = \frac{E \cdot I}{ER + ES} \quad (3.12b)$$

Supstitucijom kompleksa ER i ES sa pripadajućim konstantama disocijacije dobiva se slijedeći izraz

$$K_I = \frac{E \cdot I}{ER + ES} = \frac{E \cdot I}{\frac{E \cdot R}{K_I^R} + \frac{E \cdot S}{K_I^S}} \quad (3.12c)$$

Izraz je potrebno dodatno urediti izlučivanjem E u nazivniku te supstitucijom koncentracija enantiomera R i S sa I/2 budući da je racemat ekvimolarna smjesa enantiomera

$$K_I = \frac{E \cdot I}{\frac{E \cdot R}{K_I^R} + \frac{E \cdot S}{K_I^S}} = \frac{E \cdot I}{\frac{E \cdot I}{2} \left(\frac{1}{K_I^R} + \frac{1}{K_I^S} \right)} = \frac{2}{\frac{1}{K_I^R} + \frac{1}{K_I^S}} \quad (3.12d)$$

Utjecaj temperature na kinetičke konstante

Za praćenje temperaturnog utjecaja na brzinu enzimske hidrolize supstrata ATCh primijenjena je Arrhenius-ova jed.:

$$k = A \cdot e^{-E_A/RT} \quad (3.13)$$

koja definira eksponencijalnu promjenu konstante brzine reakcije k s temperaturom T uz energiju aktivacije E_A , opću plinsku konstantu R i predekspencijalni ili frekvencijski faktor A .⁴³ Logaritmiranjem Arrhenius-ove jed. dobiva je jednadžba pravca

$$\ln k = \ln A - E_a / RT \quad (3.14)$$

Također primjenom Gibbs-ove jednadžbe (3.15) moguće je odrediti entalpiju ($\Delta^\ddagger H$) i entropiju ($\Delta^\ddagger S$) aktivacije za enzimsku hidrolizu supstrata

$$\Delta^\ddagger G = RT \left(\ln \frac{k_B}{h} - \ln \frac{k}{T} \right) = \Delta^\ddagger H - T \Delta^\ddagger S \quad (3.15)$$

U ovoj jednadžbi k_B je Boltzmann-ova konstanta ($1,38062 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$), h je Planck-ova konstanta ($6,6262 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$) i k je konstanta brzine reakcije.

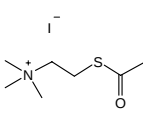
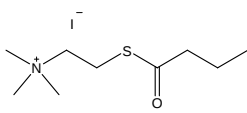
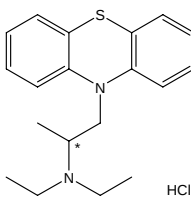
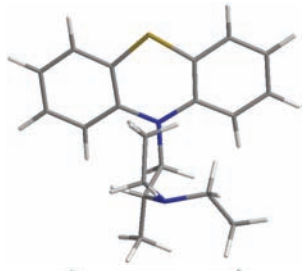
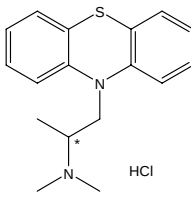
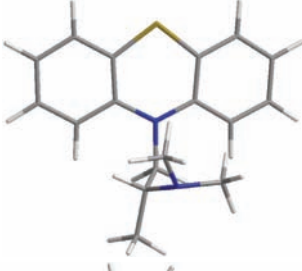
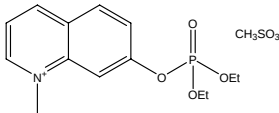
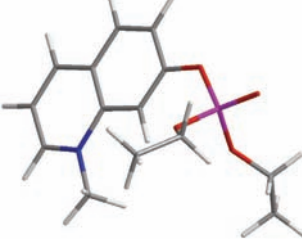
Gibbs-ova jednađžba (3.15) primijenjena je i u određivanju standardne entalpije (ΔH°) i entropije (ΔS°) stvaranja reverzibilnih kompleksa enzim-supstrat odnosno enzim-inhibitor.

$$\Delta G^\circ = -RT \cdot \ln K_{eq} = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (3.16)$$

U danoj jednađžbi K_{eq} označava ravnotežnu konstantu afiniteta koja je recipročna disocijacijskoj konstanti ($K_{eq}=1/K_D$). Dijeljenjem jed. 3.16 sa $-RT$ dobiva se van't Hoff-ova jednađžba

$$\ln K_{eq} = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (3.17)$$

Tablica 3.1 Strukturne formule spojeva korištenih u ovome radu, njihova kemijska imena i kratice.

Struktura spoja	Trodimenzionalna struktura spoja	Kemijsko ime spoja	Kratice spoja
Supstrati			
		acetiltiokolinov jodid	ATCh
		butiriltiokolinov jodid	BTCh
Ligandi			
		etopropazin hidroklorid	-
		prometazin hidroklorid	-
		7-(dietoksifosforiloksi)- 1-metil-kinolinijev metilsulfonat	DEPQ

4. REZULTATI

4.1. Inhibicija čovječe acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze etopropazinom

Procjena stupnja otrovanja ljudi antikolinesterazama (nekim pesticidima i nervnim bojnim otrovima) određuje se mjerenjem smanjenja aktivnosti eritrocitne AChE i/ili serumske BChE u ljudskoj krvi. Ako se aktivnost ovih enzima želi odrediti u punoj krvi, bez odjeljivanja eritrocita od plazme, potrebno je primijeniti specifični supstrat i/ili inhibitor AChE ili BChE, kako bi se utvrdila aktivnost svakog enzima ponaosob. Neki su autori^{52,53} zato predložili etopropazin kao specifični inhibitor BChE koji u koncentraciji od 20 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ gotovo u potpunosti inhibira BChE dok je stupanj inhibicije AChE veoma mali. Budući da se etopropazin koristi u obliku hidroklorida, odnosno kvaternarne amonijeve soli, mogla se očekivati razlika u stupnju inhibicije inačica čovječe BChE, jer je poznato iz literature da se inačice BChE razlikuju od uobičajene BChE u interakciji sa supstratima i inhibitorima, koji posjeduju naboj.^{9,11,12} Stoga smo zasebno odredili inhibiciju etopropazinom fenotipova BChE u serumu i inhibiciju AChE u eritrocitima ljudske krvi (Tablica 4.1). Nadalje odredili smo aktivnost AChE i BChE u punoj krvi uz etopropazin kao inhibitor bez odjeljivanja eritrocita od plazme. Kolinesterazna aktivnost u punoj krvi ($7,16 \mu\text{mol min}^{-1} \text{cm}^{-3}$) dobro se je složila s onom izračunanom kao suma aktivnosti eritrocita i plazme ($6,97 \mu\text{mol min}^{-1} \text{cm}^{-3}$). Ova mjerenja su obavljena na uzorcima krvi 15 osoba.²⁰

Tablica 4.1 Aktivnosti AChE ljudskih eritrocita i fenotipova ljudske serumske BChE mjerene sa ATCh ($1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$) te inhibicija ovih enzima etopropazinom ($20 \mu\text{mol dm}^{-3}$). U tablici su navedene srednje vrijednosti i standardna odstupanja (SD) izračunana iz mjerenja n broja uzoraka eritrocita odnosno seruma različitih osoba. Aktivnost i inhibicija enzima provedena je pri 37 °C.²⁰

Enzim	n	Aktivnost $\pm$ SD $\mu\text{mol min}^{-1} \text{cm}^{-3}$	Inhibicija $\pm$ SD %
ATCh (eritrociti)	6	$4,66 \pm 1,08$	8 ± 4
BChE-fenotip (serum)			
UU	4	$2,86 \pm 0,57$	98 ± 2
UA	4	$1,92 \pm 0,33$	94 ± 1
FF/FS	5	$0,66 \pm 0,11$	92 ± 1
AF	3	$0,85 \pm 0,26$	87 ± 1
AJ/AK	6	$0,51 \pm 0,14$	85 ± 3
AA/AS	5	$0,41 \pm 0,04$	74 ± 4

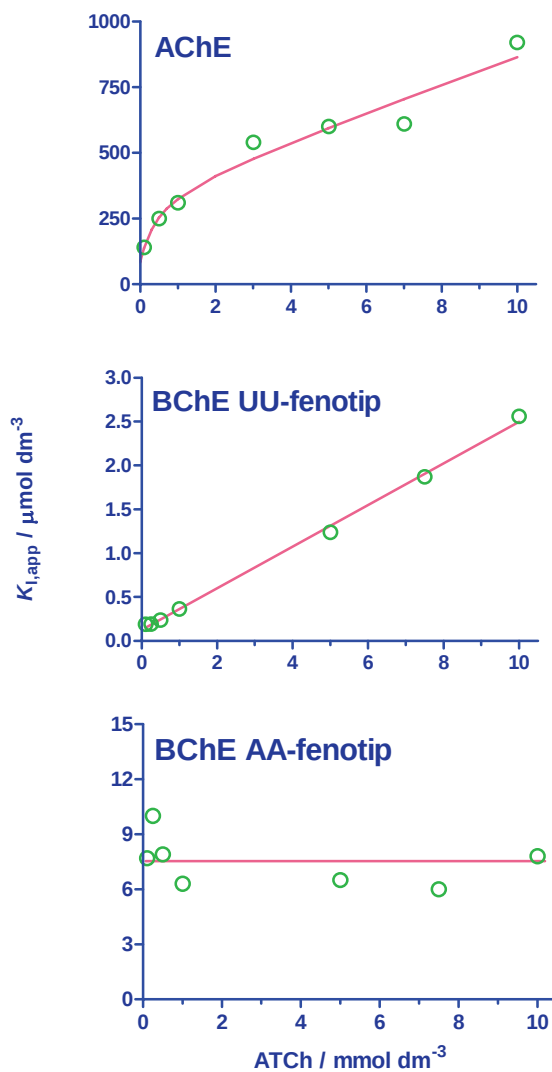
Srednje vrijednosti aktivnosti ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ cm}^{-3}$) proučavanih BChE fenotipova kretala se u rasponu od 2,86 za homozigotni uobičajeni fenotip (UU) do 0,41 za atipičnu BChE (AA/AS-fenotip). Svih šest fenotipova BChE bilo je inhibirano primijenjenom koncentracijom etopropazina, a stupanj inhibicije opadao je: UU-fenotip bio 98% inhibiran dok je AA/AS-fenotip bio samo 74% inhibiran. Uočeni pad aktivnosti BChE i smanjenje inhibicije, posljedica je promjena aminokiselina u aktivnom mjestu inačica BChE, koje sadrži fenotip. Tako promjena aspartata 70 u glicin kod atipične BChE uzrokuje manji afinitet prema pozitivno nabijenom supstratu i inhibitoru t.j. manju aktivnost i manju inhibiciju. Pod istim eksperimentalnim uvjetima etopropazin je inhibirao eritrocitnu AChE svega 8% što je u skladu s 5%-tnom inhibicijom, koju su izmjerili Worek i suradnici.¹⁸

Kako bi se utvrdile disocijacijske konstante kompleksa etopropazina sa AChE ili BChE, mjerena je inhibicija sa širokim rasponom koncentracija etopropazina da bi se postigla inhibicija aktivnosti između 20% i 80%. U interpretaciji eksperimentalnih podataka korišteni su kinetički modeli opisani jed. 3.4, 3.7 i 3.8. Pomoću Hunter-Downs prikaza određene su konstante disocijacije (K_i) iz odnosa prividnih konstanata inhibicije ($K_{i,app}$) AChE i BChE etopropazinom i odgovarajućih koncentracija supstrata ATCh (Slika 4.1). Konstante inhibicije za inhibitor K_i i za supstrat K_s i K_{ss} dane su u Tablici 4.2.

Tablica 4.2 Disocijacijske konstante enzim-inhibitor (K_i ili K_a) i enzim-supstrat kompleksa (K_s i K_{ss}) ljudske AChE i fenotipova serumske BChE s etopropazinom odnosno supstratom. Inhibicija je provedena etopropazinom uz supstrat ATCh ($1,0\text{--}10 \text{ mmol dm}^{-3}$) pri 37°C . Konstante su izračunane pomoću Jed. 3.4, 3.7 i 3.8. Standardna odstupanja vrijednosti konstanata bila su do 15%.²⁰

Enzim	Etopropazin $\mu\text{mol dm}^{-3}$	Konstante za enzim-inhibitor $\mu\text{mol dm}^{-3}$	Konstante za enzim-supstrat mmol dm^{-3}
Eritrocitna AChE	200	$K_a = 161$ $K_i = 393$	$K_s = 0,10$ $K_{ss} = 7,3$
UU-fenotip BChE	0,25 – 2,0	$K_i = 0,16$	$K_{(s)} = 0,69$
AA-fenotip BChE	2,0 - 10	$K_i = 7,5$	–

Vrijednosti konstanata K_s i K_{ss} određenih iz inhibicije (Tablica 4.1) dobro se slažu sa konstantama K_s i K_{ss} koje su dobivene mjerenjem hidrolize ATCh eritrocitnom AChE bez prisustva etopropazina izračunane pomoću jed. 1.10 (pS-krivulje): $K_s = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ i $K_{ss} = 5,7 \text{ mmol dm}^{-3}$.



Slika 4.1 Inhibicija čovječeje eritrocitne AChE i fenotipova serumske BChE (UU- i AA-fenotip) sa etopropazinom uz supstrat ATCh. Svaka točka predstavlja srednju vrijednost 4-7 eksperimenata mjerenih pri 37 °C. Prividne konstante inhibicije izračunane su pomoću jed. 3.4, a pomoću jed. 3.7 i 3.8 konstante K_i odnosno K_a za UU-fenotip i AChE.²⁰

4.2. Odjeljivanje i određivanje konfiguracije enantiomera etopropazina

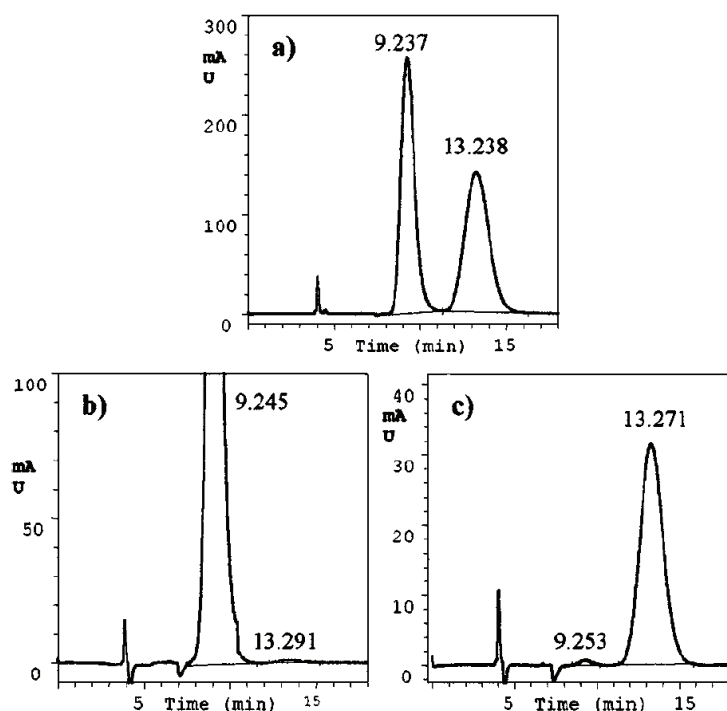
4.2.1. Stereoselektivna tekućinska kromatografija (HPLC)[‡]

Poznato je da enantiomeri biološki aktivnih spojeva mogu posjedovati različita farmakološka svojstva pa je tako za očekivati da bi i enantiomeri etopropazina mogli pokazivati razliku u inhibiciji čovječe BChE. Pristupilo se odjeljivanju enantiomera kako bi se ova pretpostavka mogla provjeriti. U literaturi je bio opisan postupak odjeljivanja enantiomera etopropazina metodom stereoselektivne tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC), ali samo na analitičkom nivou.^{54,55} Budući da je za eksperimente inhibicije BChE bila potrebna veća količina enantiomera etopropazina pokušala se pronaći učinkovitija HPLC metoda ili primijeniti druga metoda kao što je frakcijska kristalizacija.

U pokušaju da se razdvoje enantiomeri etopropazina prema metodi koju su opisali Ponder i suradnici⁵⁴ koristeći Chiacel OJ kolonu, punjenu sa celuloza tris(4-metilbenzoatom) kao kiralnim izbornikom uz smjesu *n*-heksan/*iso*-propanol (80:20, v/v) kao pokretnu fazu, nije postignuto zadovoljavajuće odjeljivanje enantiomera. Stoga smo ispitali nekoliko polisaharidnih kolona odnosno kolona četkastog tipa kako bi se postiglo zadovoljavajuće odjeljivanje enantiomera. Testirane kolone bile su: Chiris-D3, Chiris-AD1, Chiralcel OD, Chiralpak AS, i Chiralcel OB-H, ali samo je Chiacel OJ pokazala djelomično odjeljivanje enantiomera (*n*-heksan/*iso*-propanol (97:3, v/v)). Dodatak male količine trietilamina u pokretnu fazu bitno je poboljšao odjeljivanje enantiomera, ali još nije bilo postignuto potpuno odjeljivanje kromatografskih pikova, sve do bazne linije. Supstitucijom *iso*-propanola sa *tert*-butanolom uspjelo se postići potpuno odjeljivanje enantiomera etopropazina (Slika 4.2a; *n*-heksan/*t*-butanol/trietilamin=100:3:0,5; protok pokretne faze 1,0 mL min⁻¹, $k_1' = 1,90$, $\alpha = 1,68$, $R_s = 1,81$). Nakon što su utvrđeni uvjeti odjeljivanja enantiomera pristupilo se odjeljivanju veće količine na analitičkoj Chiracel OJ koloni. Mana ovakvog odjeljivanja enantiomera je mali kapacitet kolone tj. količina spoja koja se odijeli u jednom ciklusu. Stoga se pribjeglo frakcijskoj kristalizaciji diastereoselektivnih soli kao učinkovitijoj metodi pripreve veće količine enantiomera. Ipak HPLC metoda s Chiracel OJ kolonom poslužila je utvrđivanju enantiomerne čistoće kristalizacijom priređenih enantiomera etopropazina (Slika 4.2b i c). Korištenjem navedenih eksperimentalnih uvjeta postignuto

[‡] Postupak kiralne tekućinske kromatografije proveo sam u Laboratoriju za stereoselektivnu sintezu i biokatalizu, Instituta "Ruđer Bošković" pod vodstvom prof. V. Šunjića.

je bolje odjeljivanje enantiomera ($\alpha = 1,68$) nego što su opisali Ponder i suradnici za Chiracel OJ kolonu ($\alpha = 1,05$).



Slika 4.2 Kromatogrami racemata i enantiomera etopropazina na kiralnoj koloni. Kromatogrami racemata (a) te (+)- i (–)-enantiomera etopropazina priređenih frakcijskom kristalizacijom (b) i (c). Kromatografski uvjeti: Chiracel OJ kolona (duljina 250 mm, unutarnji promjer 4,6 mm), Chiracel OJ pretkolona (duljina 50 mm, unutarnji promjer 4,6 mm), pokretna faza *n*-heksan/*t*-butanol/trietilamin (100:3:0,5), protok 1,0 mL min⁻¹ i UV detekcija pikova pri 254 nm. Slika je preuzeta iz Ref. 56.

4.2.2. Frakcijska kristalizacija

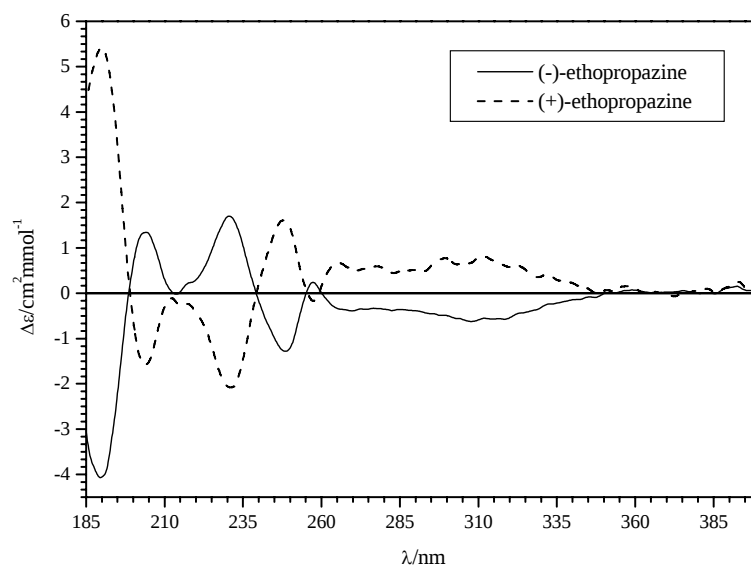
Odjeljivanje enantiomera etopropazina u obliku slobodne baze (tercijarnog amina) provedeno je sličnim postupkom onome kojeg su opisali Nilsson i suradnici.⁴⁶ Da bi se etopropazin preveo u slobodnu bazu, racemičan etopropazin hidroklorid (3,01 g, 8,63 mmol) dodan je u smjesu etera i natrijevog hidroksida (2 mol dm⁻³). Eterski sloj je odijeljen od nastale suspenzije koja je opetovano dva puta izmučkana s eterom. Eterski slojevi su zatim spojeni i sušeni pomoću kalijevog karbonata. Nakon uparivanja etera dobiveno je 2,71 g (8,67 mmol) slobodne baze. Prividno veća količina slobodne baze, u odnosu na racemat, posljedica je nemogućnosti potpunog uklanjanja etera putem

uparivanja uz vakuum. Slobodna baza otopljena je u kipućem acetonu uz suvišak O,O'-dibenzoil-D-tartarska kiseline (8.67 mmol). Nakon spontanog hlađenja otopine iskristalizirala je sol, čiji kristali su nakon filtriranja opetovano dvaput prekrizalizirani iz acetona i konačno iz apsolutnog etanola. Nastali etopropazinijev dibenzoil-D-tartarat (1,08 g) preveden je ponovno u slobodnu bazu ranije opisanim postupkom, a etopropazin hidroklorid dobiven je taloženjem etopropazina iz eterske otopine propuhivanjem hidroklorida kroz otopinu. Finalni produkt je (–)-etopropazin (0,60 g, 40% iskorištenje) sa optičkim zakretanjem u etanolu $[\alpha]_D = -11,5$ ($c=0,05$, 25 °C) i enantiomernim viškom (ev = 99,1%). Matičnice od kristalizacije su spojene i uparene, te je ponovljen postupak prevođenja etopropazina u slobodnu bazu (1,50 g, 4,80 mmol). Ponavljanjem postupka kristalizacije sa O,O'-dibenzoil-L-tartarskom kiselinom (4,80 mmol) dobiven je (+)-etopropazin (0,76 g, 51% iskorištenje) sa optičkim zakretanjem u etanolu $[\alpha]_D = +11,7$ ($c=0,05$, 25 °C) i enantiomernim viškom (ev = 97,9%).

4.2.3. Cirkularni dikroizam (CD) i nuklearna magnetska rezonancija (NMR)[§]

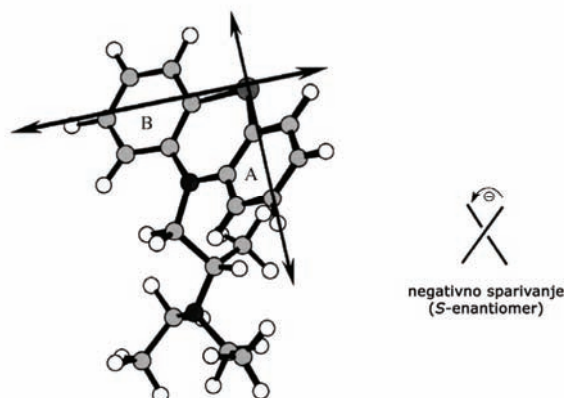
Spektri enantiomera etopropazina snimljeni pomoću cirkularnog dikroizma (Slika 4.3) pokazuju zanimljivo svojstvo enantiomorskih krivulja da posjeduju sparene minimume i maksimume kod približno 250 nm i 230 nm. Tako (–)-enantiomer ima minimum, a suprotno njemu (+)-enantiomer maksimum kod približno 250 nm ($\Delta\epsilon=+1,14$), a nultu točku odnosno sjecište krivulja kod približno 240 nm. Kod 250 nm očekuje se 1L_a prijelaz dva aromatska prstena etopropazina s prijelaznim momentima u antiparalelnim ravninama. Stoga će i mala kiralna perturbacija tih ravnina uzrokovati kiralni raspored dvaju vektora (Slika 4.3).

[§] Snimanje CD i NMR spektara te njihovu interpretaciju načinili su prof. P. Novak i dr. D. Žiher, Pliva, Istraživački institut.



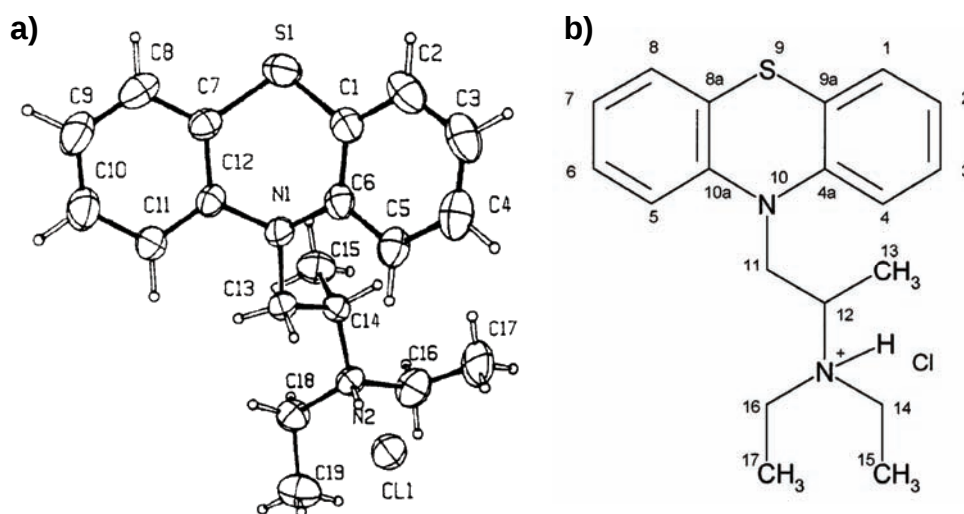
Slika 4.3 CD spektar (+)- i (-)-etopropazin hidroklorida u vodi pri 25 °C. Na slici je prikazana razlika promjena intenziteta apsorbancije lijevo i desno cirkularno polariziranog svjetla s promjenom valne duljine. Slika je preuzeta iz *Ref. 56*.

Dva prijelazna vektora opisuju negativan torzijski kut za (+)-enantiomer koji rezultira negativnim sparivanjem odnosno negativnim Cotton-ovim učinkom, dok se pozitivni Cotton-ov učinak javlja kod (-)-enantiomera. Negativno sparivanje koje se javlja kod (+)-enantiomera može se objasniti perturbacijom prstena A i B jakim neveznim hidrofobnim interakcijama između njih i metilne skupine. Metilna skupina remeti simetriju dvaju prijelaza, a nalazi se ispod „krova“ tri kondenzirana prstena na strani prstena A što potvrđuje kristalna struktura i dvodimenzijski NOESY NMR spektar sniman u otopini (NOESY eng. *Nuclear Overhauser enhancement spectroscopy*). Sukladno ovome pozitivno sparivanje uočeno kod (-)-enantiomera rezultira sa zrcalnim rasporedom prijelaznih vektora. Negativna konformacijska kiralnost (*M*) otkriva *S*-konfiguraciju na kiralnom centru (-)-enantiomera, dok pozitivna konformacijska kiralnost (*P*) otkriva *R*-apsolutnu konfiguraciju na kiralnom centru (+)-enantiomera. Ovako dodijeljene apsolutne konfiguracije u skladu su s kristalnom strukturom (+)-enantiomera prometazin hidroklorida, *N*-dimetilamino kongenera etopropazina, kojem je objavljena *R*-apsolutna konfiguracija.⁴⁶



Slika 4.4 Određivanje konfiguracije enantiomera etopropazina ekscitonskom kiralnom metodom. Negativna kiralnost između 1L_a prijelaznih dipola u S-enantiomeru. Slika je preuzeta iz Ref. 56.

Triciklički ne planarni dio molekule etopropazina posjeduje ravninu simetrije te može poprimiti dvije konformacije u obliku čamca. Ove konformacije su enantiotopne kada u blizini nema prisutnih elemenata kiralnosti. Budući da molekula etopropazina posjeduje kiralni centar u pokrajnjem lancu, kod svakog enantiomera konformacije tricikličkog dijela molekule postaju diastereotopne te jedna od njih postaje energetski stabilnija u osnovnome stanju. Kristalografski podaci za racemični etopropazin⁵⁷ pokazuju zanimljiva strukturna svojstva molekule u krutom stanju koja mogu poslužiti za objašnjenje konformacije etopropazina u otopini (Slika 4.5). Triciklički prsten je blago i asimetrično izbačen iz dviju aromatskih ravnina, a atom sumpora nalazi se 0,111 Å udaljen od ravnine B i samo 0,036 Å od ravnine A (Slika 4.4). Istovjetne udaljenosti za atom dušika jesu 0,003 i 0,034 Å.

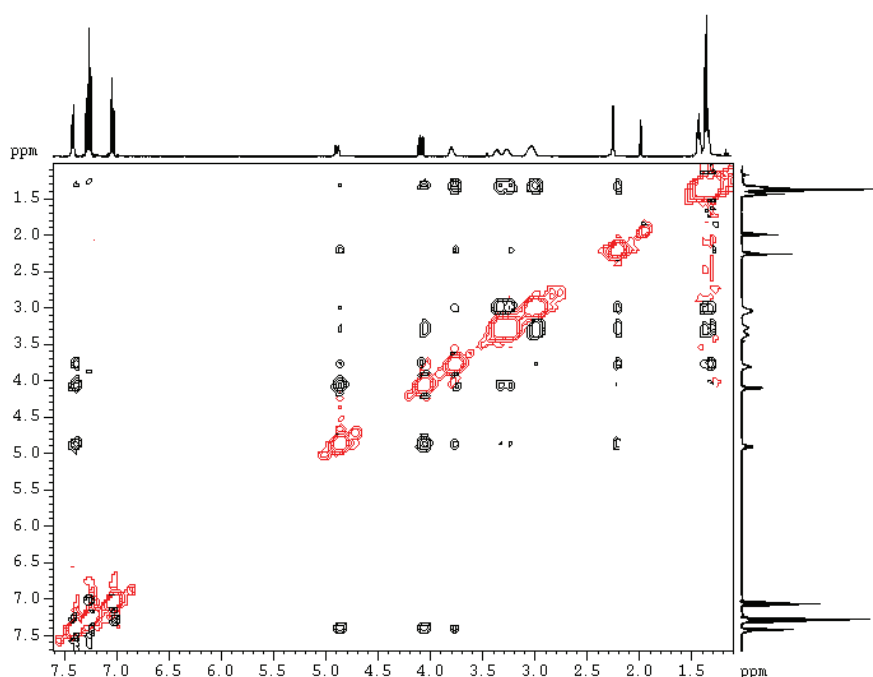


Slika 4.5 Kristalna struktura racemičnog etopropazina (a; prikazan je S-enantiomer) i kemijska struktura sa numeracijom atoma (b). Slike su preuzete iz Ref.56 i 57.

Asimetrični raspored dva aromatska prstena također se očituje u torzijskim kutovima veza oko N i S atoma. Stoga dihedralni kut C(4a)-N(10)-C(10a)-C(8a) iznosi $+45,01^\circ$ a njemu istovjetan kut C(10a)-N(10)-C(4a)-C(9a) u nasuprotnom prstenu A iznosi $-43,57^\circ$ ($\Delta=1,44^\circ$) također dihedralni kut C(8a)-S(9)-C(9a)-C(4a) iznosi $+38,04^\circ$ dok njemu istovjetan kut na suprotnom prstenu B C(9a)-S(9)-C(8a)-C(10a) iznosi $-36,57^\circ$ ($\Delta=1,47^\circ$).

Snimanje protonskih i ugljikovih NMR spektara etopropazina kombinacijom jedno- i dvodimenzijских metoda pokazalo je da tri seta metilenskih protona na položajima 11, 14 i 16 imaju svojstvo diastereotopnosti odnosno pokazuju različite kemijske pomake kao posljedicu kiralne perturbacije u samoj molekuli. Najveća magnetska neekvivalentnost uočena je u kloroformu za CH_2 protone neposredno uz kiralni centar, a signali im se pojavljuju kod 4,97 i 3,97 ppm. 2D NOESY spektar pokazuje zanimljive kontakte između H13-H4 i H13-H3 protona (Slika 4.6) otkrivajući prostornu bliskost između C-13 metilne skupine i aromatskog dijela molekule koja je usporediva s strukturom S-etopropazina u kristalnom stanju (Slika 4.5).⁵⁷ Dodatno linije H4,5 dubleta u ^1H -NMR spektru, snimanom u acetonitrilu, nešto su šire što upućuje na moguću interakciju ovih protona sa π -sustavom tricikličkog prstena. Također je uočeno da dvije etilne skupine vezane na dušik imaju različite kemijske pomake u ^{13}C -NMR

spektru što može biti posljedica ili kiralne perturbacije u molekuli ili preferirane orijentacije ovih strukturnih dijelova u otopini.



Slika 4.6 NOESY NMR spektar etopropazina u acetonitrilu (CD_3CN). Spektar prikazuje križne signale između prostorno bliskih protona (atoma) na udaljenostima manjima od 5Å. Slika je preuzeta iz Ref. 56.

4.3. Inhibicija kolinesterazâ enantiomerima i racematom etopropazina

4.3.1. Inhibicija butirilkolinesteraze konja

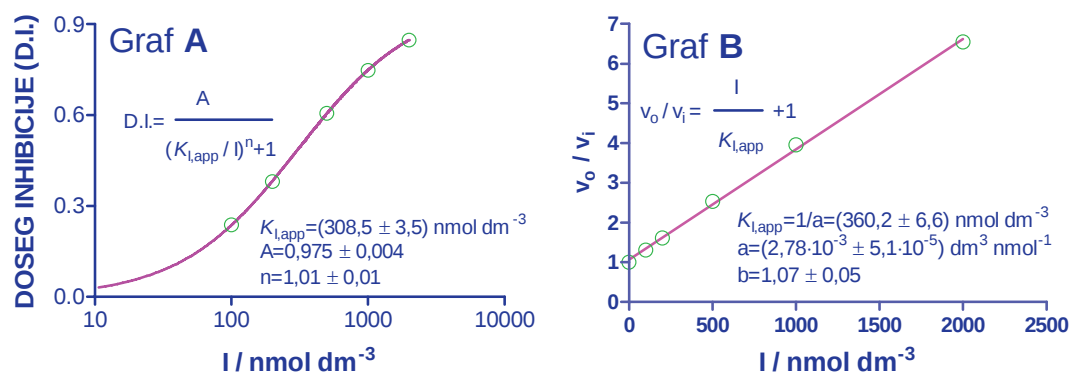
Komercijalno dostupna pročišćena butirilkolinesteraza iz seruma konja pokazala se kao pogodan enzimski pripravak jer sadrži mnogo manje drugih proteina nego nativna plazma iz ljudske krvi pa su nespecifična vezanja inhibitora na protein zanemariva. Kako bi se odredile konstante disocijacije enzim-inhibitor kompleksa, provedena su mjerenja inhibicije BChE konja racemičnim etopropazinom u prvom navratu, a potom i s pojedinačnim enantiomerima etopropazina. U preliminarnom pokusu inhibicije ljudske BChE enantiomerima etopropazina utvrđena je stereoselektivnost prema enantiomerima uz približno dva puta veći afinitet BChE za *R*-etopropazin ($K_i(R) = 0,15 \mu\text{mol dm}^{-3}$ i $K_i(S) = 0,27 \mu\text{mol dm}^{-3}$ na 10°C).

4.3.1.1. Standardna metoda

Standardnom spektrofotometrijskom metodom⁴⁷ izmjerene su aktivnosti pročišćenog preparata BChE iz konjskog seruma sa i bez prisutnosti etopropazina. Raspon koncentracija racemičnog etopropazina kretao se od 50,0-10 000 nmol dm⁻³, a raspon koncentracija supstrata ATCh od 20,0-10 000 μmol dm⁻³. Eksperiment je bio tako proveden da se je mjerila inhibicija aktivnosti BChE kod određene koncentracije supstrata s nekoliko odabranih koncentracija etopropazina (Tablica 4.3). Koncentracije etopropazina odabrane su tako da njihova vrijednost bude manja i viša od vrijednosti prividne konstante inhibicije s obzirom na koncentraciju supstrata kod koje se mjerenje provodi (Slika 4.7). Također je provedena usporedna analiza rezultata računanjem prividne konstante inhibicije ($K_{i,app}$) primjenom linearne jed. 3.4 i nelinearne jednadžbe 3.6. Dobiveni eksperimentalni podatci inhibicije mogu se korelirati sa koncentracijom inhibitora kao doseg inhibicije ($1-v_i/v_o$) ili kao omjer aktivnosti izmjerene bez inhibitora i aktivnosti izmjerene u prisutnosti inhibitora (v_o/v_i). Na istovjetan način je provedena i analizirana inhibicija BChE konja pojedinačnim enantiomerima etopropazina.

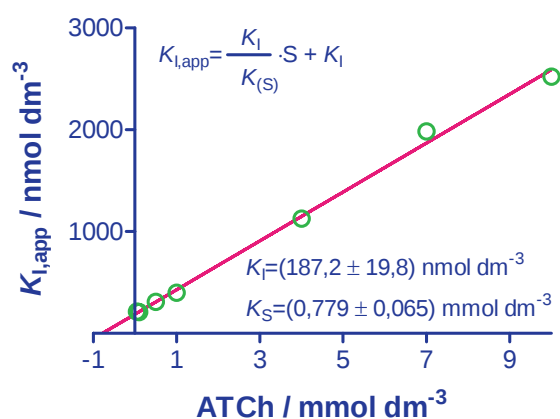
Tablica 4.3 Inhibicija konjske BChE etopropazinom uz 1,0 mmol dm⁻³ supstrat ATCh pri 25 °C. Aktivnosti enzima izmjerene su u odsutnosti (v_o) i prisutnosti (v_i) etopropazina. Koncentracije inhibitora tako su odabrane da omogućuju raspon inhibicije aktivnosti enzima od 20% do 80%.

Etopropazin nmol dm ⁻³	Aktivnost BChE μmol min ⁻¹ cm ⁻³	v_o / v_i	Doseg inhibicije ($1-v_i/v_o$)
0	7,73	1,000	0,000
100	5,90	1,311	0,237
200	4,79	1,614	0,380
500	3,05	2,535	0,605
1000	1,95	3,959	0,747
2000	1,18	6,549	0,847



Slika 4.7 Inhibicija BChE konja etopropazinom (I) uz $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ ATCh kao supstrat pri 25°C . Nelinearna ovisnost doseg inihibicije ($1-v_i/v_0$) o koncentraciji etopropazina i linearna ovisnost omjera (v_0/v_i) i koncentracije etopropazina prikazane su na Grafu A i B. Parametar A predstavlja maksimalni doseg inihibicije dok parametar n odstupanje od idealnosti krivulje. Ako je $n=1$ krivulja je idealna. Konstante su izračunane prema jed. 3.4 i 3.6. Podatci su iz Tablice 4.3.

Iz odnosa prividnih konstanata inihibicije $K_{I,app}$ (određenih iz nelinearne regresije) i koncentracije supstrata (Hunter-Downs prikaz, jed. 3.6 i 3.7) određena je konstanta inihibicije konjske BChE etopropazinom (Slika 4.8).



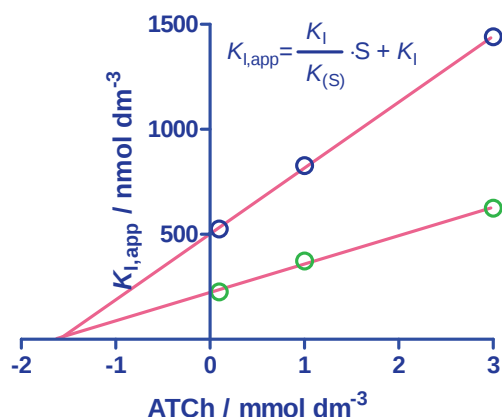
Slika 4.8 Konstante inihibicije BChE konja racematom etopropazina (Hunter-Downs prikaz) pri temperaturi 25°C . Svaka pojedina prividna konstanta inihibicije ($K_{I,app}$) izračunana je iz inihibicije s minimalno pet koncentracija etopropazina kod pripadajućih koncentracija supstrata ($0,05, 0,10, 0,50, 1,0, 4,0, 7,0$ i $10,0 \text{ mmol dm}^{-3}$). Konstante su izračunane prema jed. 3.6 i 3.7.

Utjecaj temperature na inhibiciju enantiomerima

Inhibicije BChE konja provedena je kako s racemičnim etopropazinom (25, 37 °C) tako i s pojedinačnim enantiomerima (12, 20, 25, 30 i 37 °C) kako bi se utvrdio doprinos pojedinačnih enantiomera u inhibiciji racematom.⁵⁸ Vidljivo je da s porastom temperature afinitet enzima za enantiomere opada, a istu pojavu uočavamo i za supstrat ATCh što se očituje u povećanju vrijednosti K_i i $K_{(S)}$ (Tablica 4.4). Stereoselektivnost enzima, izražena kao omjer konstanti disocijacije kompleksa enzim-inhibitor, mijenja se s temperaturom 1,84–2,77, ali ne ukazuje na njen sustavan porast odnosno pad. Može se primijetiti da je najniža stereoselektivnost pri 12 i 37 °C. Budući da se enantiomeri etopropazina reverzibilno vežu u aktivno mjesto BChE konja, interakcije koje ostvaruju unutar aktivnog mjesta nisu izrazito stereoselektivne što ima za posljedicu relativno nizak omjer afiniteta enzima prema enantiomerima. Vrijednosti K_s konstanta minimalno se razlikuju između enantiomera na određenoj temperaturi što jasno upućuje da se enantiomeri vežu na isto mjesto u aktivnom mjestu enzima (Slika 4.9).

Tablica 4.4 Stereoselektivnost inhibicije BChE konja enantiomerima etopropazina pri raznim temperaturama. Disocijacijske konstante inhibicije K_i (R) i K_i (S) kompleksa enantiomera etopropazina ($0,050 - 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$) i BChE izračunane iz jed. 3.7. Konstante disocijacije $K_{(S)}$ enzim-supstrat kompleksa dobivene su iz pokusa sa R- i S-etopropazinom uz supstrat ATCh ($0,10, 1,0$ i $3,0 \text{ mmol dm}^{-3}$). Svaka pojedinačna prividna konstanta inhibicije izračunana je iz inhibicije s minimalno pet koncentracija inhibitora.

t / °C	K_i (R)	K_i (S)	Stereoselektivnost K_i (S) / K_i (R)	$K_{(S)}$ / mmol dm^{-3}	
	nmol dm^{-3}			S-enantiomer	R-enantiomer
12	100 ± 11	185 ± 20	$1,85 \pm 0,28$	$0,44 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,02$
20	124 ± 9	342 ± 29	$2,77 \pm 0,31$	$0,78 \pm 0,06$	$0,76 \pm 0,09$
25	147 ± 12	352 ± 33	$2,40 \pm 0,30$	$1,16 \pm 0,09$	$1,12 \pm 0,09$
30	222 ± 25	507 ± 47	$2,29 \pm 0,33$	$1,63 \pm 0,13$	$1,67 \pm 0,14$
37	455 ± 44	836 ± 76	$1,84 \pm 0,24$	$2,71 \pm 0,16$	$2,73 \pm 0,22$



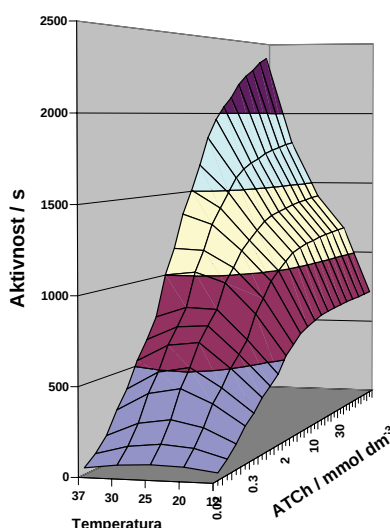
Slika 4.9 Inihibicija BChE konja enantiomerima etopropazina pri 30 °C (Hunter-Downs prikaz). Inihibicija je provedena sa *R*-etopropazinom (○) i *S*-etopropazinom (○) (0,050 - 10 μmol dm⁻³) uz supstrat ATCh (0,10, 1,0 i 3,0 mmol dm⁻³). Svaka pojedinačna prividna konstanta inihibicije izračunana je iz inihibicije s minimalno pet koncentracija inhibitora. Konstante su izračunane prema jed. 3.5 i 3.7.

Za potrebe određivanja konstante inihibicije K_i BChE konja korišteno je nekoliko koncentracija supstrata (0,10 - 3,0 mmol dm⁻³). U svrhu boljeg kinetičkog opisa enzimске hidrolize supstrata ATCh, primijenjene su koncentracije u rasponu od 0,050 do 40,0 mmol dm⁻³, a u analizi rezultata primijenjena je kinetička jednadžba 1.11 izvedena iz Cauet-ovog modela (Tablica 4.5). Porastom temperature opada afinitet enzima u katalitičkom i perifernom mjestu vezanja supstrata na što upućuje porast vrijednosti obiju disocijacijskih konstanta enzim-supstrat K_s i K_{ss} . Budući da enzimska aktivnost raste s porastom temperature, također raste i vrijednost konstante k_{cat} koja se utrostručila porastom temperature sa 12 na 37 °C. S koncentracijom supstrata 1,0 mmol dm⁻³ i nižom, na 25 °C postiže se maksimalna enzimska aktivnost dok daljnjim porastom temperature aktivnost opada (Slika 4.10). Iz rezultata također je vidljivo da se parametar b praktični ne mijenja s temperaturom i srednja vrijednost iznosi 2,2 ako se izuzme vrijednost određena pri 25 °C. Vrijednosti standardnih odstupanja potvrđuju ovu činjenicu. Parametar b u Cauet-ovom modelu predstavlja mjeru kooperativnog utjecaja druge molekule supstrata na enzimsku aktivnost odnosno stvaranje terciarnog kompleksa enzim-supstrat, SES. Stoga maksimalnu enzimsku aktivnost predstavlja produkt $b \cdot k_{cat}$. Kada se usporede vrijednosti $K_{(s)}$ konstanta određenih iz inihibicije (Tablica 4.4) s ovima za danu temperaturu, vidljivo je da se vrijednosti $K_{(s)}$ konstanta izračunanih iz pokusa inihibicije nalaze između vrijednosti K_s i K_{ss} .

Tablica 4.5 Konstante disocijacije enzim-supstrat kompleksa K_S i K_{SS} , katalitička konstanta k_{cat} i parametar b sa standardnim odstupanjima ($\pm$ SD) za hidrolizu ATCh konjskom BChE pri različitim temperaturama. Konstante su izračunane upotrebom jed. 1.11. Koncentracije supstrata ATCh bile su u rasponu od 0,05 do 40 mmol dm⁻³.

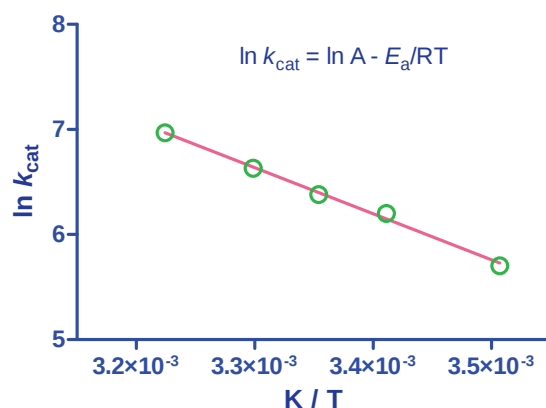
t / °C	K_S	K_{SS}	$\frac{k_{cat}^*}{s^{-1}}$	b
	mmol dm ⁻³			
12	0,14 ± 0,01	1,78 ± 0,15	300 ± 16	2,2 ± 0,1
20	0,15 ± 0,01	2,60 ± 0,26	493 ± 52	2,2 ± 0,2
25	0,25 ± 0,02	4,45 ± 0,40	591 ± 28	1,6 ± 0,3
30	0,27 ± 0,02	4,79 ± 0,33	758 ± 45	2,1 ± 0,2
37	0,48 ± 0,04	9,09 ± 0,80	1062 ± 81	2,4 ± 0,4

* Koncentracija aktivnih mjesta BChE konja iznosila je 160 nmol dm⁻³.



Slika 4.10 Hidroliza ATCh konjskom BChE pri različitim temperaturama. Krivulje aktivnosti rekonstruirane su iz kinetičkih konstanti određenih za hidrolizu ATCh konjskom BChE (Tablica 4.5, jed. 1.11). Koncentracije supstrata ATCh bile su u rasponu od 0,050 do 40 mmol dm⁻³.

Provođenje mjerenja enzimske hidrolize ATCh i njene inhibicije enantiomerima etopropazina pri navedenim temperaturama omogućilo je utvrđivanje termodinamičkih parametara entalpije i entropije za ove reakcije. U analizi podataka primijenjene su Arrhenius-ova, Gibbs-ova i van't Hoff-ova jednadžba. Primjenom Arrhenius-ove jed. 3.13 određene su energija aktivacije ($E_a = 36,2 \pm 1,2$ kJ mol⁻¹) i frekvencijski faktor ($A = 1,31 \pm 0,61 \cdot 10^9$ s⁻¹) za enzimsku hidrolizu ATCh (Slika 4.11).



Slika 4.11 Energija aktivacije za enzimsku hidrolizu supstrata ATCh sa BChE konjskog seruma. Podatci za konstantu brzine hidrolize k_{cat} preuzeti su iz Tablice 4.5, a energija aktivacije E_a je izračunana upotrebom jed. 3.13.

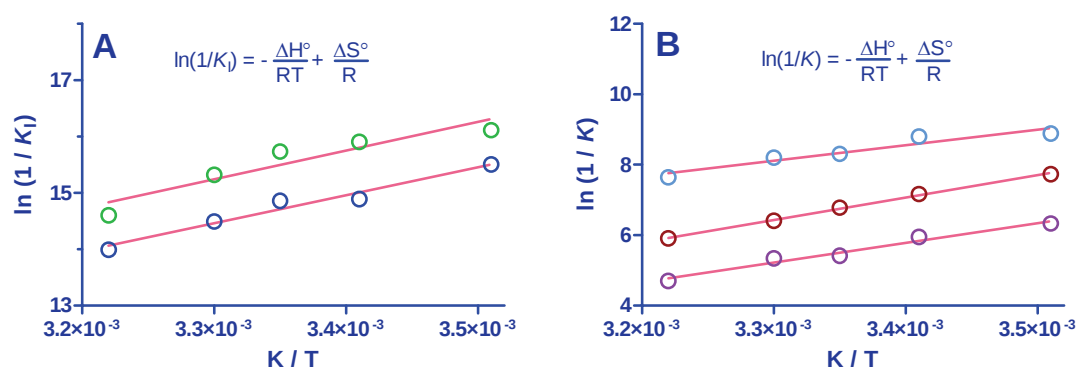
Entalpija i entropija aktivacije izračunane su pomoću jed. 3.15 te entalpija aktivacije iznosi ($\Delta^\ddagger H = -34,02 \pm 1,37 \text{ kJ mol}^{-1}$), a entropija aktivacije ($\Delta^\ddagger S = 77,6 \pm 4,6 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) što je u skladu s očekivanjem budući da enzimu raste aktivnost porastom temperature, odnosno enzimski reakcija je endotermna i enzim cijepa molekulu supstrata na dvije molekule produkta što doprinosi povećanju entropije.

Vrijednosti entalpije dobivene za vezanje enantiomera etopropazina na BChE primjenom Gibbs-ove jed. slične su po iznosu ($\Delta H^\circ = -42,5 \pm 8,9$ i $-41,4 \pm 4,5 \text{ kJ mol}^{-1}$; Tablica 4.6) i između njih nema razlike ($p = 0.81$). To se također vidi i na Slici 4.12A gdje su pravci koji prolaze kroz točke gotovo paralelni, nagib pravca predstavlja entalpiju. Razlika u entropiji vezanja enantiomera na enzim također nije jako izražena, ali je u skladu s eksperimentalnim rezultatima budući da *R*-enantiomer jače inhibira BChE konja.

Tablica 4.6 Entalpija i entropija stvaranja kompleksa enzim-inhibitor (EI) i enzim-supstrat (ES) za BChE konja, enantiomere etopropazina i supstrata ATCh. Odgovarajuće konstante disocijacije K_I , $K_{(S)}$, K_S i K_{SS} (Tablica 4.4 i 4.5) izmjerene pri 12, 20, 25, 30 i 37 °C, prevedene su u recipročne konstante afiniteta pomoću kojih je određena entalpija i entropija korištenjem jed. 3.17.

Enzimski kompleks	Inhibicija BChE		Aktivnost BChE		
	EI		ES/SES	ES	SES
	K_I		$K_{(S)}$	K_S	K_{SS}
	R-enantiomer	S-enantiomer	Iz Hunter-Downs-a	Iz pS-krivulje	Iz pS-krivulje
$\Delta H^\circ / \text{kJ mol}^{-1}$	$-42,5 \pm 8,9$	$-41,4 \pm 4,5$	$-53,8 \pm 1,1$	$-36,5 \pm 6,4$	$-46,5 \pm 4,6$
$\Delta S^\circ / \text{J K}^{-1}\text{mol}^{-1}$	$-13,6 \pm 29,8$	$-16,3 \pm 15,1$	$-124,3 \pm 3,6$	$-53,0 \pm 21,4$	$-110,0 \pm 15,5$

Usporedo s određivanjem entalpije i entropije za inhibiciju određeni su ovi termodinamički parametri i za enzimsku hidrolizu supstrata ATCh. U računu su korištena dva seta podataka. Prvi set disocijacijskih konstanta $K_{(S)}$ su one određene iz inhibicije enzimске aktivnosti enantiomerima etopropazina (jed. 3.7) i po vrijednostima su bliže K_{SS} konstantama iz pS-krivulje. Uz disocijacijsku konstantu K_{SS} određena je i konstanta K_S također iz pS-krivulje (jed. 1.11). Najniže vrijednosti entalpije i entropije utvrđene su za nastajanje kompleksa enzima-supstrat iz pokusa inhibicije. Nastajanje tercijarnog SES kompleksa je energetski nepovoljnije ($\Delta\Delta H^\circ = -10,0 \text{ kJ mol}^{-1}$) kao i entropijski ($\Delta\Delta S^\circ = -57,0 \text{ J K}^{-1}\text{mol}^{-1}$) od nastajanja ES kompleksa. Ovaj rezultat je u skladu s očekivanjima, jer je energetski zahtjevnije stvaranje kompleksa sačinjenog od tri entiteta, te se ujedno povećava red u sustavu što rezultira gubitkom entropije.



Slika 4.12 Konstante inhibicije BChE konja etopropazinom (K_i) i konstante za hidrolizu ATCh (K_S i K_{SS}) pri različitim temperaturama (12–37 °C). Inhibicija BChE sa R-etopropazinom (●) i S-etopropazinom (○) prikazana je na grafu A. Konstante disocijacije enzim-supstrat kompleksa $K_{(S)}$ (●) iz Hunter-Downs prikaza te K_S (○) i K_{SS} (○) iz pS-krivulje prikazane su na grafu B. Konstante disocijacije su preuzete iz Tablica 4.4 i 4.5 i računane prema jed. 3.17.

4.3.1.2. Metoda zaustavljenog protoka

Spektrofotometrijskom metodom zaustavljenog protoka mjerena je aktivnost BChE iz konjskog seruma s ATCh u prisutnosti i odsutnosti enantiomera i racemata etopropazina. Raspon koncentracija enantiomera i racemata etopropazina kretao se od 0,50–20,0 $\mu\text{mol dm}^{-3}$, a raspon koncentracija supstrata ATCh od 2,0–75 000 $\mu\text{mol dm}^{-3}$. U analizi eksperimentalnih podataka primijenjeno je nekoliko kinetičkih modela i to Michaelis-Menten-in model te Webb-ov model enzimске hidrolize supstrata koji je primijenjen u više inačica s obzirom na mehanizam inhibicije opisan u modelu. Primijenjeni su i modeli koje su razvili J. Stojan i D. Fournier sa suradnicima.^{40–42} Kinetičke konstante računane su istovremenom prilagodbom jednadžbi, izvedenih iz modela, na eksperimentalne podatke tj. početne aktivnosti izmjerene u odsustvu i prisustvu enantiomera i racemata etopropazina, na određenoj temperaturi. Svi modeli su iskušani na istim eksperimentalnim podacima.

Usporedbom kinetičkih modela i rezultata koji iz njih proizlaze želio sam naći najprikladniji model koji bi zadovoljavajuće opisivao mehanizam enzimске hidrolize supstrata u prisutnosti inhibitora. Također su modeli dodatno uspoređivani prema konstantama inhibicije koje su izračunane za enantiomere i racemat etopropazina s

ciljem utvrđivanja zajedničkog mehanizma inhibicije za enantiomere i racemat. Kriteriji za ocjenu modela bili su: konvergiranje rezultata prilagodbe, vrijednost standardnog odstupanja neke konstante nije smjela biti veća od vrijednosti te konstante i suma kvadrata odstupanja trebala je biti što manja.

Michaelis-Menten-in kinetički model

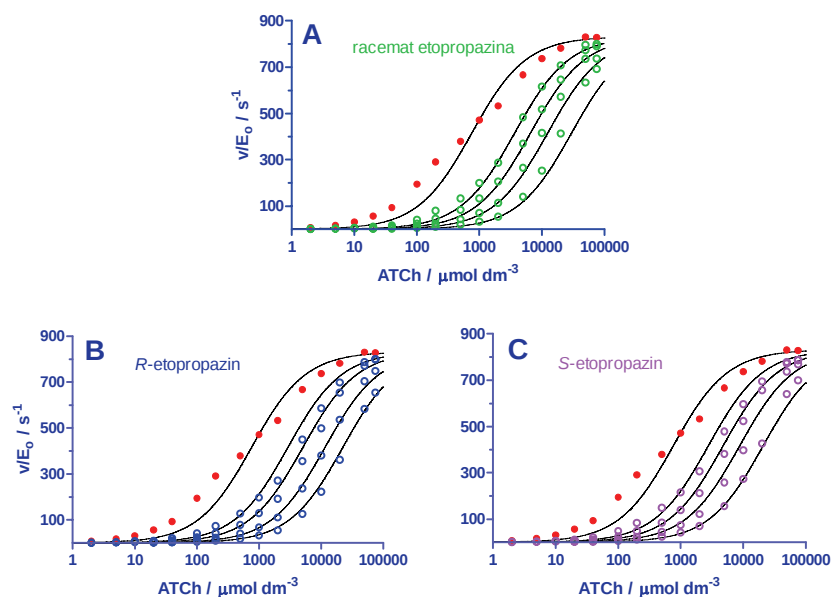
Kinetika acetilkolinesterazâ i butirilkolinesterazâ ne može se zadovoljavajuće opisati Michaelis-Menten-inim kinetičkim modelom što je činjenica poznata iz literature.^{16,17,37,38} Ipak ovaj model primijenio sam u analizi podataka kako bi rezultate usporedio sa drugim kinetičkim modelima koji su izvedeni iz Michaelis-Menten-ina modela. Konstante izračunane pomoću ovog modela (Tablica 4.7) u suglasju su sa konstantama dobivenima iz pokusa mjerenja aktivnosti standardnom spektrofotometrijskom metodom (Tablica 4.4). Porast temperature utiče na porast vrijednosti konstante brzine hidrolize supstrata (k_{cat} od 488 do 1592 s⁻¹) odnosno enzim je aktivniji pri višim temperaturama. Također je vidljiv utjecaj porasta temperature na afinitet enzima za supstrat (K_m) kao i za inhibitor etopropazin (K_i) pa je afinitet enzima pri 37 °C preko pet puta manji nego na 12 °C. Stereoselektivnost enzima prema enantiomerima etopropazina, omjer $K_i(S) / K_i(R)$, najveća je pri 12 °C (2,94) te najniža pri 25 °C (1,95) uz prosječnu stereoselektivnost od 2,4, što znači da BChE konjskog seruma ima preko dva puta veći afinitet za *R*- nego za *S*-etopropazin. Kada se usporede vrijednosti konstanta disocijacije enzim-inhibitor kompleksa K_i eksperimentalno određene iz inhibicije racematom i one izračunane iz konstanta inhibicije enantiomerima (jed. 3.12) uočava se dobro slaganje na danoj temperaturi uz najveće odstupanje 7,5% na 37 °C. Vrijednosti sume kvadrata odstupanja, koje ukazuju na dobrotu prilagodbe jed. eksperimentalnim podacima, kreću se od 3,8 do 33,7·10⁵ te ne pokazuju sustavnu ovisnost o temperaturi. Promatrajući sukladnost eksperimentalnih točaka i krivulje dobivene prilagodbom (Slika 4.13) uočava se karakteristično odstupanje aktivnosti u odsutnosti etopropazina od teoretske krivulje, odnosno krivulja kao da dijeli točke u dvije skupine. Prvu skupinu čine one točke čija su vrijednosti više od krivulje, dok drugu skupinu karakteriziraju vrijednosti niže od krivulje. Točke koje predstavljaju aktivnosti mjerene u prisutnost etopropazina po vrijednostima su bliže pripadajućim krivuljama, odnosno enzimsku hidrolizu ATCh uz inhibitor bolje opisuje Michaelis-Menten-ina jednadžba (Slika 4.13).

Tablica 4.7 Michaelis-Menten-in model: Michaelis-ova konstanta K_m , katalitička konstanta brzine hidrolize supstrata k_{cat} i konstante disocijacije enzim-inhibitor kompleksa K_i (sa standardnim odstupanjima) za hidrolizu supstrata ATCh s BChE iz konjskog seruma (160 nmol dm⁻³) i inhibiciju BChE enantiomerima i racematom etopropazina. Stereoselektivnost BChE za enantiomere etopropazina izračunana je kao omjer disocijacijskih konstanta K_i S- i R-etopropazina. Mjerenja su provedena uz supstrat ATCh (0,002-75 mmol dm⁻³), enantiomere i racemat etopropazina (0,5-20 μmol dm⁻³) na raznim temperaturama. Konstante su računane prema Michaelis-Menten kinetičkom modelu, odnosno jed. 1.5, te su navedene vrijednosti sume kvadrata odstupanja.

t / °C	k_{cat} / s^{-1}	$K_m / mmol dm^{-3}$	$K_i / nmol dm^{-3}$				$\frac{K_i (S)}{K_i (R)}$		Suma kvadrata odstupanja
			R-etopropazin	S-etopropazin	racemat	racemat*	$K_i (S)$	$K_i (R)$	
12	487,7 ± 3,7	0,63 ± 0,04	98,0 ± 7,6	287,7 ± 22,9	146,5 ± 11,7	146,3	2,94	3,822 · 10 ⁴	
20	832,3 ± 6,2	0,75 ± 0,05	140,0 ± 11,0	357,4 ± 28,6	165,6 ± 13,1	190,1	2,55	1,075 · 10 ⁵	
25	1058,1 ± 12,0	0,79 ± 0,07	148,3 ± 16,3	289,5 ± 32,0	198,0 ± 22,4	196,7	1,95	3,365 · 10 ⁵	
30	1245,8 ± 10,7	1,19 ± 0,08	188,0 ± 15,5	429,1 ± 39,1	290,7 ± 23,4	260,0	2,24	2,795 · 10 ⁵	
37	1592,0 ± 15,0	3,18 ± 0,18	659,3 ± 45,9	1559 ± 110	843,6 ± 60,8	907,4	2,37	2,922 · 10 ⁵	

* Vrijednost konstante K_i za racemat, izračunana je iz vrijednosti konstanta K_i za enantiomere.





Slika 4.13 Ovisnost početnih aktivnosti BChE konjskog seruma o koncentraciji etopropazina (racemat i enantiomeri) pri 20 °C. Mjerenje aktivnosti je provedeno uz supstrat ATCh ($2,0\text{--}75\,000\,\mu\text{mol dm}^{-3}$), R-etopropazin ($0,5$, $1,0$, $2,0$ i $5,0\,\mu\text{mol dm}^{-3}$), S-etopropazin ($1,0$, $2,0$, $5,0$ i $10,0\,\mu\text{mol dm}^{-3}$) i racemat etopropazina ($0,5$, $1,0$, $2,0$ i $5,0\,\mu\text{mol dm}^{-3}$) i BChE konjskog seruma ($160\,\text{nmol dm}^{-3}$). Aktivnost enzima u odsutnosti inhibitora (●) i u prisutnosti racemata (○), R- (○) i S-etopropazina (○). Podacima na grafovima A, B i C istovremeno je prilagođavana jed. 1.7 izvedena iz Michaelis-Menten-ina kinetičkog modela.

Webb-ov kinetički model

Ovaj model, za razliku od prethodnog, pretpostavlja vezanje dvije molekule supstrata na enzim te uvodi parametar b koji opisuje utjecaj druge molekule supstrata na ukupnu enzimsku aktivnosti.³⁷ U analizi eksperimentalnih podataka enzimsku aktivnosti primijenio sam tri inačice Webb-ovog modela koje se međusobno razlikuju prema načinu na koji opisuju inhibiciju enzima. Prva inačica Webb-ovog modela (Webb-1) pretpostavlja dvije disocijacijske konstante za enzim-inhibitor kompleks odnosno pretpostavlja dva vezna mjesta inhibitora na enzim.

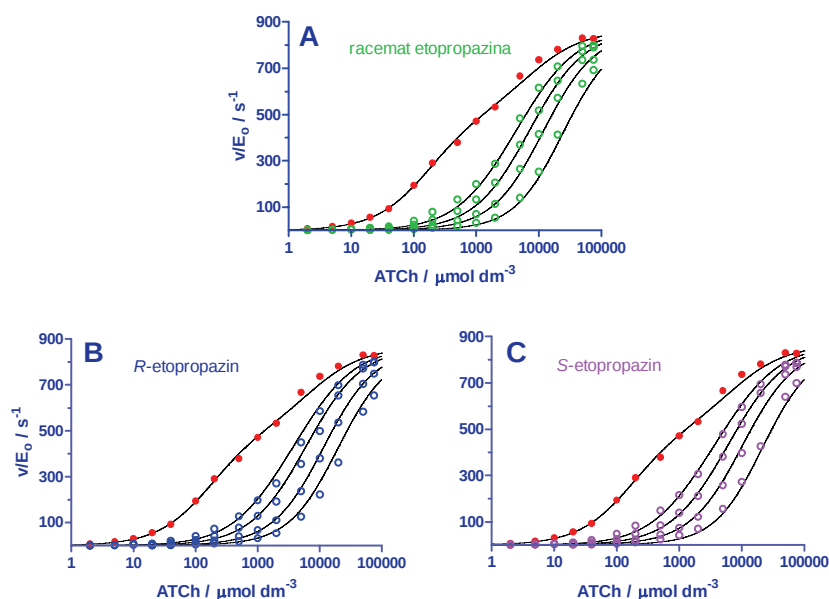
Kinetička jednadžba 1.13 izvedena iz Webb-1 modela bolje opisuje eksperimentalne podatke od Michaelis-Menten-ina modela što potvrđuju niže vrijednosti suma kvadrata odstupanja (Slika 4.14). Uvođenje parametra b u jednadžbu prividno snižava vrijednosti k_{cat} u odnosu na Michaelis-Menten-in model, pa u ovom modelu

maksimalnu enzimsku aktivnost predstavlja produkt $b \cdot k_{\text{cat}}$ (Tablica 4.8). Porast vrijednosti k_{cat} prate porast temperature od 266 do 866 s⁻¹, dok parametar b ne pokazuje sustavnu promjenu s temperaturom uz prosječnu vrijednost od 1,83. Vrijednosti konstanta K_s također su niže po vrijednosti od odgovarajućih K_m konstanta, s time da se afinitet enzima za supstrat također smanjuje preko pet puta povećanjem temperature s 12 na 37 °C. Konstante disocijacije periferno vezanog supstrata na enzim K_{ss} i do dva reda veličine su više od odgovarajućih K_s konstanta. Primjerice, na 37 °C BChE konjskog seruma ima preko trideset puta manji afinitet za vezanje supstrata na periferno mjesto nego za vezanje supstrata u aktivno mjesto enzima. Konstante disocijacije za enzim-inhibitor kompleks u aktivnom mjestu enzima K_i^A i perifernom mjestu enzima K_i^P razlikuju se do četiri reda veličina s time da su vrijednosti K_i^A konstanta trostruko niže od K_i konstanta izračunanih pomoću jednadžbe izvedene iz Michaelis-Menten-ina modela. Te konstante su bliske konstantama disocijacije K_D određenima pomoću metode gašenja fluorescencije, na pr. na 25 °C K_i^A za racemat etopropazina iznosi 58 nmol dm⁻³, a K_D pri 23 °C iznosi 67 nmol dm⁻³. Konstante K_i^P predstavljaju konstante disocijacije periferno vezanog inhibitora i pokazuju znatno niži afinitet enzima za periferno vezanje etopropazina te promjene njihove vrijednosti s temperaturom ne upućuju na sustavnu ovisnost o temperaturi. Ovim modelom dobiva se stereoselektivnost BChE za enantiomere etopropazina slična onoj određenoj pomoću Michaelis-Menten-ina modela s time da je ona veća na 12 °C, tj. enzim ima preko pet puta veći afinitet za *R*-etopropazin. Pogreške K_i^P veće su od samih konstanta.

Tablica 4.8 Webb-ov model (Webb-1): Katalitičke konstante K_S , K_{SS} , b , konstanta brzine hidrolize supstrata k_{cat} i konstante disocijacije enzim-inhibitor kompleksa K_I^A i K_I^P sa standardnim odstupanjima za hidrolizu supstrata ATCh sa BChE iz konjskog seruma (160 nmol dm^{-3}) i inhibiciju sa enantiomerima i racematom etopropazina. Stereoselektivnost BChE za enantiomere etopropazina izračunana je kao omjer disocijacijskih konstanta K_I^A S- i R-etopropazina. Mjerenja su provedena uz supstrat ATCh ($0,002\text{--}75 \text{ mmol dm}^{-3}$), enantiomere i racemat etopropazina ($0,5\text{--}20 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) na raznim temperaturama. Konstante su računane prema jed. 1.12. , te su navedene vrijednosti sume kvadrata odstupanja.

t / °C	12	20	25	30	37
k_{cat} / s^{-1}	$265,7 \pm 4,0$	$524,6 \pm 19,3$	$617,5 \pm 32,4$	$676,8 \pm 34,6$	$865,8 \pm 24,2$
$K_S / \text{mmol dm}^{-3}$	$0,107 \pm 0,005$	$0,179 \pm 0,019$	$0,143 \pm 0,022$	$0,210 \pm 0,028$	$0,570 \pm 0,040$
$K_{SS} / \text{mmol dm}^{-3}$	$5,880 \pm 0,320$	$8,027 \pm 1,034$	$8,042 \pm 1,200$	$8,426 \pm 1,078$	$18,34 \pm 1,53$
b	$1,90 \pm 0,03$	$1,65 \pm 0,06$	$1,78 \pm 0,10$	$1,93 \pm 0,09$	$1,97 \pm 0,03$
R-etopropazin					
$K_I^A / \text{nmol dm}^{-3}$	$22,5 \pm 1,9$	$52,4 \pm 5,6$	$35,8 \pm 6,3$	$47,8 \pm 6,9$	$205,6 \pm 13,6$
$K_I^P / \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$	$11,86 \pm 2,08$	$12,05 \pm 5,96$	$255,0 \pm 380,0$	$23,06 \pm 24,47$	—
S-etopropazin					
$K_I^A / \text{nmol dm}^{-3}$	$122,2 \pm 12,7$	$117,9 \pm 12,2$	$73,2 \pm 10,9$	$168,2 \pm 22,3$	$388,5 \pm 28,1$
$K_I^P / \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$	$6,48 \pm 0,67$	189 ± 491	—	$9,50 \pm 3,12$	310 ± 374
racemat					
$K_I^A / \text{nmol dm}^{-3}$	$38,7 \pm 3,3$	$55,1 \pm 5,7$	$58,2 \pm 1,3$	$66,8 \pm 9,3$	$205,6 \pm 13,6$
$K_I^P / \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$	$14,39 \pm 3,18$	$56,05 \pm 92,50$	$15,01 \pm 6,04$	$172,5 \pm 638,2$	—
racemat*					
$K_I^A / \text{nmol dm}^{-3}$	38,7	64,2	49,3	72,0	215,3
$K_I^A (S) / K_I^A (R)$	5,43	2,25	2,04	3,52	2,48
Suma kvadrata odstupanja	$8,535 \cdot 10^3$	$3,216 \cdot 10^4$	$1,621 \cdot 10^5$	$8,818 \cdot 10^4$	$3,819 \cdot 10^4$

* Vrijednost konstante K_I za racemat, izračunana je iz vrijednosti konstanta K_I za enantiomere.



Slika 4.14 Ovisnost početnih aktivnosti BChE konjskog seruma o koncentraciji etopropazina (racemat i enantiomeri) pri 20 °C. Mjerenje aktivnosti je provedeno uz supstrat ATCh (2,0-75 000 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), *R*-etopropazin (0,5, 1,0, 2,0 i 5,0 $\mu\text{mol dm}^{-3}$), *S*-etopropazin (1,0, 2,0, 5,0 i 10,0 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) i racemat etopropazina (0,5, 1,0, 2,0 i 5,0 $\mu\text{mol dm}^{-3}$) i BChE konjskog seruma (160 nmol dm^{-3}). Aktivnost enzima u odsutnosti inhibitora (●) i u prisutnosti racemata (○), *R*- (○) i *S*-etopropazina (○). Podacima na grafovima A, B i C istovremeno je prilagođavana jed. 1.12 izvedena iz Webb-1 kinetičkog modela.

Druga inačica Webb-ovog modela, Webb-2 model, pretpostavlja samo jedno mjesto vezanja inhibitora na enzimu dok druge kinetičke konstante na pr. koje opisuju hidrolizu supstrata nisu mijenjane. Ovu izmjenju uveo sam potaknut činjenicom da modelom Webb-1 nije bilo moguće odrediti K_I^P konstante na 25 °C za *S*-etopropazin i na 37 °C za *R*-etopropazin i racemat. Konstante izračunane za hidrolizu supstrata prema ovom modelu minimalno odstupaju od onih izračunanih pomoću jed. 1.12 izvede iz Webb-1 modela. Također isti trend prate i konstante disocijacije enzim-inhibitor kompleksa K_I^A što opet ima za posljedicu dobro slaganje između konstanata K_I^A za racemat i izračunanih K_I^A konstanata za racemat pomoću konstanata za enantiomere.

Vidljiv je pad vrijednosti za stereoselektivnost sa 5,4 na 3,1 pri 12°C. Kada se uzme u obzir da Webb-1 i Webb-2 model rezultiraju sa vrlo sličnim sumama kvadrata odstupanja može se zaključiti da Webb-2 model bolje opisuje enzimsku aktivnost i inhibiciju u ovom konkretnom slučaju. Pogreške konstanta izračunane pomoću Webb-1 i Webb-2 modela su manje nego one izračunane primjenom Michaelis-Menten-ina modela.

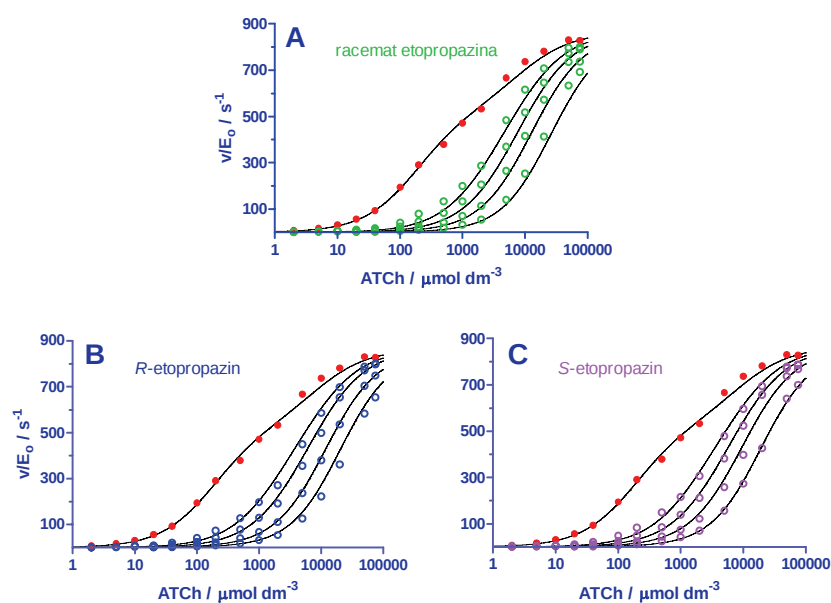
Treća inačica Webb-ovog modela, Webb-3 model, pretpostavlja vezanje inhibitora na aktivno i periferno mjesto enzima sa istim afinitetom odnosno ista disocijacijska konstanta opisuje disocijaciju periferno i aktivno vezanog etopropazina. Kinetičke konstante za hidrolizu supstrata nisu mijenjane. Prvo što se uočava je povećanje sume kvadrata odstupanja i izgled krivulje koju definira jed. 1.14 podsjeća na onu izvedenu iz Michaelis-Menten-ina modela što znači lošiju prilagodbu jed. na eksperimentalne podatke. Vrijednosti za k_{cat} su dvostruko niže uz povećanje vrijednosti parametra b . Vrijednosti K_i konstanta su više od odgovarajućih konstanta izračunanih pomoću Michaelis-Menten-ina modela s time da se opetovano dobro slažu konstante K_i za racemat i one izračunane za racemat pomoću konstanta za enantiomere. Također stereoselektivnost iz Webb-1 modela nije utjecana izjednačenjem konstanta K_i^A i K_i^P u Webb-3 modelu.

Tablica 4.9 Webb-ov model: Katalitičke konstante za enzimsku hidrolizu supstrata ATCh s BChE konjskog seruma, K_S , K_{SS} , k_{cat} i b , te konstante disocijacije enzim–inhibitor kompleksa K_I^A (sa standardnim odstupanjima). Stereoselektivnost BChE za enantiomere etopropazina izračunana je kao omjer disocijacijskih konstanata K_I S- i R-etopropazina. Mjerenja su provedena uz supstrat ATCh (0,002-75 mmol dm^{-3}), BChE (160 mmol dm^{-3}) te enantiomere i racemat etopropazina (0,5-20 $\mu mol\ dm^{-3}$) na raznim temperaturama. Konstante su računane prema kinetičkom modelu (Webb-2), odnosno jed. 1.13, te su navedene vrijednosti sume kvadrata odstupanja.

t / °C	k_{cat} / s^{-1}	$K_S / mmol\ dm^{-3}$	$K_{SS} / mmol\ dm^{-3}$	b	$K_I^A / nmol\ dm^{-3}$				$\frac{K_I(S)}{K_I(R)}$	
					R-etopropazin	S-etopropazin	racemat	racemat*	$K_I(R)$	Suma kvadrata odstupanja
12	321,1 ± 7,2	0,16 ± 0,01	9,21 ± 0,96	1,59 ± 0,03	32,2 ± 2,2	98,4 ± 6,7	50,9 ± 3,5	49,6	3,06	6,959 · 10 ³
20	541,1 ± 17,2	0,19 ± 0,02	8,49 ± 1,15	1,60 ± 0,05	47,1 ± 4,3	121,5 ± 11,0	56,0 ± 5,1	62,1	2,58	3,315 · 10 ⁴
25	632,1 ± 34,6	0,15 ± 0,03	8,55 ± 1,74	1,75 ± 0,09	38,6 ± 6,5	76,7 ± 12,8	54,5 ± 9,2	52,2	1,99	1,598 · 10 ⁵
30	739,6 ± 30,6	0,25 ± 0,03	10,0 ± 1,35	1,77 ± 0,07	51,4 ± 5,9	132,7 ± 14,8	76,8 ± 8,9	74,1	2,58	9,267 · 10 ⁴
37	871,4 ± 23,5	0,58 ± 0,04	18,5 ± 1,57	1,96 ± 0,04	158,5 ± 10,5	378,9 ± 25,0	207,7 ± 13,6	216,0	2,39	3,833 · 10 ⁴

* Vrijednost konstante K_I izračunana je za racemat iz vrijednosti konstanata K_I^A izračunanih za enantiomere.





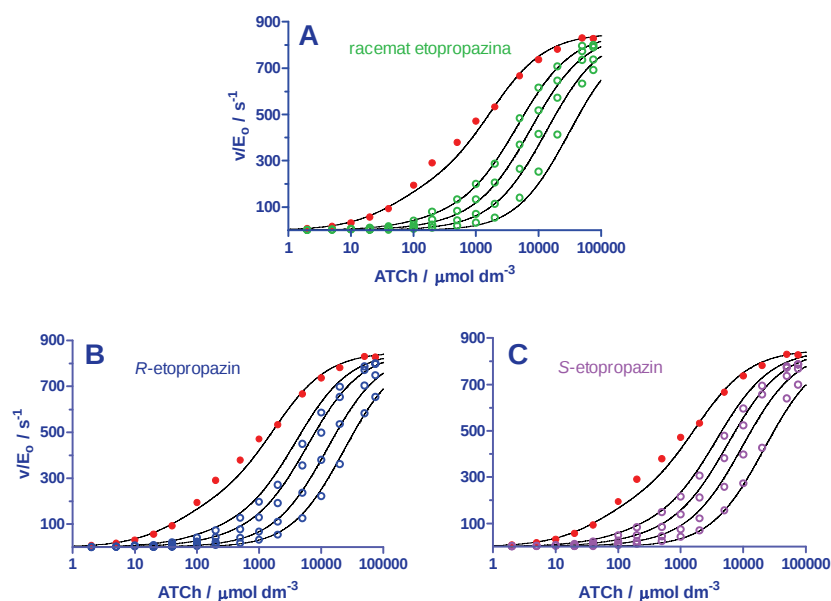
Slika 4.15 Ovisnost početnih aktivnosti BChE konjskog seruma o koncentraciji etopropazina (racemat i enantiomeri) pri 20 °C. Mjerenje aktivnosti je provedeno uz supstrat ATCh (2,0-75 000 $\mu mol\ dm^{-3}$), R-etopropazin (0,5, 1,0, 2,0 i 5,0 $\mu mol\ dm^{-3}$), S-etopropazin (1,0, 2,0, 5,0 i 10,0 $\mu mol\ dm^{-3}$) i racemat etopropazina (0,5, 1,0, 2,0 i 5,0 $\mu mol\ dm^{-3}$) i BChE konjskog seruma (160 $nmol\ dm^{-3}$). Aktivnost enzima u odsutnosti inhibitora (●) i u prisutnosti racemata (○), R- (○) i S-etopropazina (○). Podacima na grafovima A, B i C istovremeno je prilagođavana jed. 1.13 izvedena iz Webb-2 kinetičkog modela.

Tablica 4.10 Webb-ov model: Katalitičke konstante za enzimsku hidrolizu supstrata ATCh s BChE konjskog seruma, K_S , K_{SS} , k_{cat} i b , te konstante disocijacije enzim–inhibitor kompleksa K_i^A (sa standardnim odstupanjima). Stereoselektivnost BChE za enantiomere etopropazina izračunana je kao omjer disocijacijskih konstanata K_i S- i R-etopropazina. Mjerenja su provedena uz supstrat ATCh (0,002-75 mmol dm^{-3}), BChE (160 mmol dm^{-3}) te enantiomere i racemat etopropazina (0,5-20 $\mu mol\ dm^{-3}$) na raznim temperaturama. Konstante su računane prema kinetičkom modelu (Webb-3), odnosno jed. 1.14, te su navedene vrijednosti sume kvadrata odstupanja.

t / °C	k_{cat} / s^{-1}	$K_S / \mu mol\ dm^{-3}$	$K_{SS} / mmol\ dm^{-3}$	b	$K_i^A = K_i^P / nmol\ dm^{-3}$				$K_i(S)$	
					R-etopropazin	S-etopropazin	racemat	racemat*	$K_i(R)$	Suma kvadrata odstupanja
12	152,3 ± 4,4	68,5 ± 8,3	1,74 ± 0,11	3,17 ± 0,09	272,8 ± 16,2	796,2 ± 48,2	405,8 ± 24,6	388	2,92	2,287 · 10 ⁴
20	280,4 ± 7,8	88,8 ± 10,1	2,00 ± 0,12	3,04 ± 0,08	381,8 ± 22,9	967,1 ± 58,4	448,2 ± 26,9	453	2,53	6,380 · 10 ⁴
25	222,4 ± 66,5	37,5 ± 25,7	1,64 ± 0,28	4,85 ± 1,52	314,8 ± 57,0	611,8 ± 11,0	424,8 ± 78,3	413	1,94	2,817 · 10 ⁵
30	315,6 ± 47,6	85,9 ± 29,2	2,69 ± 0,27	4,06 ± 0,64	426,1 ± 44,6	953,6 ± 100,8	662,5 ± 69,2	589	2,24	1,680 · 10 ⁵
37	308,1 ± 56,2	198,0 ± 70,5	5,69 ± 0,50	5,33 ± 1,01	1204,6 ± 116,3	2843 ± 274	1541 ± 149	1634	2,36	1,822 · 10 ⁵

* Vrijednost konstante K_i izračunana je za racemat iz vrijednosti konstanata K_i izračunanih za enantiomere.





Slika 4.16 Ovisnost početnih aktivnosti BChE konjskog seruma o koncentraciji etopropazina (racemat i enantiomeri) pri 20 °C. Mjerenje aktivnosti je provedeno uz supstrat ATCh (2,0-75 000 $\mu mol dm^{-3}$), R-etopropazin (0,5, 1,0, 2,0 i 5,0 $\mu mol dm^{-3}$), S-etopropazin (1,0, 2,0, 5,0 i 10,0 $\mu mol dm^{-3}$) i racemat etopropazina (0,5, 1,0, 2,0 i 5,0 $\mu mol dm^{-3}$) i BChE konjskog seruma (160 $nmol dm^{-3}$). Aktivnost enzima u odsutnosti inhibitora (●) i u prisutnosti racemata (○), R- (○) i S-etopropazina (○). Podacima na grafovima A, B i C istovremeno je prilagođavana jed. 1.14 izvedena iz Webb-3 kinetičkog modela.

Stojan-Fournier-ovi kinetički modeli

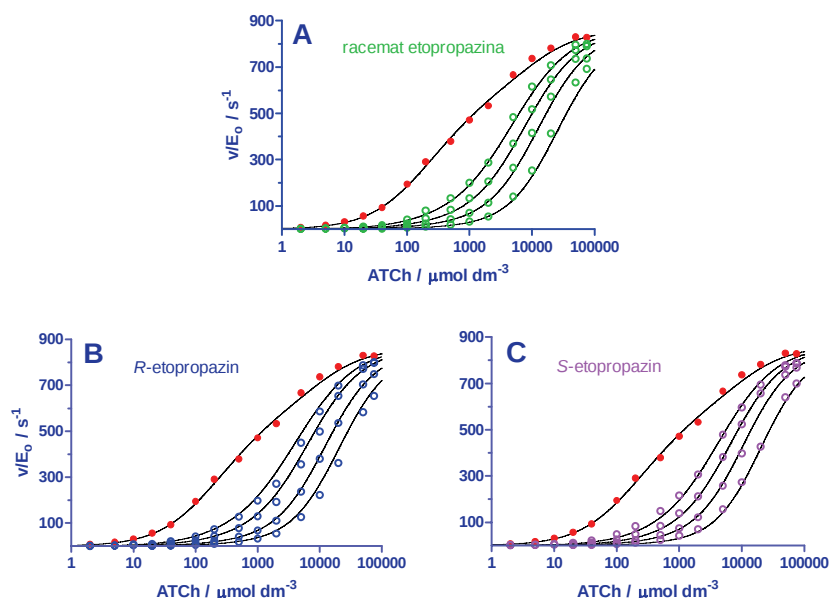
J. Stojan i D. Fournier razvili su kinetičke modele s ciljem boljeg opisivanja mehanizma enzimske hidrolize supstrata i mehanizma interakcije s inhibitorima.⁴⁰⁻⁴² U analizi podataka koristio sam njihova dva modela, i to šest- i sedam-parametarski (Shema 1.12 i 1.14), te inačicu 6 parametarskog modela koji sam označio kao pet parametarski model (Shema 1.12). Glavne razlike među ovim modelima su osim broja parametara, reverzibilnih konstanta i konstanta brzina, i početne pretpostavke mehanizma na kojima se modeli temelje. Detaljne pretpostavke za pojedine modele opisane su u poglavlju 1.4.1.5.

Rezultati dobiveni primjenom 5-parametarskog modela u analizi enzimskih aktivnosti potvrđuju bolje slaganje ovog modela s eksperimentalnim podacima od Michaelis-Menten-ina ili Webb-ovog modela. To potvrđuju niže vrijednosti dobivene za sumu kvadrata odstupanja na odgovarajućim temperaturama. Vrijednosti izračunane za k_{cat} kreću se u rasponu onih dobivenih za Webb-1, odnosno Webb-2 model, od 400,2 do 677,7 s⁻¹. Konstanta brzine k_2 predstavlja brzinu acetiliranja serina katalitičke trijade u reakciji sa supstratom ATCh, a njena vrijednost kreće se u rasponu (1,62 - 4,53)·10⁶ mol⁻¹ dm³ s⁻¹, te opada s porastom temperature. Ovaj rezultat je u skladu s ranije objavljenim rezultatima.⁵⁰ Parametri a i b opetovano ne pokazuju sustavnost promjene s temperaturom, tu se prvenstveno misli na parametar b koji je prisutan i u prijašnjim modelima, te njihove prosječne vrijednosti iznose a = 0,13 i b = 1,75. Konstante inhibicije za enantiomere i racemat etopropazina K_I^A i K_I^P pokazuju inverziju pa su K_I^P općenito konstante većeg afiniteta od K_I^A konstanta. Vrijednost konstante K_I^P za racemat 64,5 nmol dm⁻³ na 25 °C poklopila se je s onom izmjerenom gašenjem fluorescencije K_D = 66,7 nmol dm⁻³ na 23 °C (Tablica 4.15). Vrijednosti dobivene za stereoselektivnost bitno se ne mijenjaju od onih iz prijašnjih modela uz prosječno 2,3 puta veći afinitet BChE za R-etopropazin. Usporedbom vrijednosti K_I^A i K_I^P konstanta enantiomera vidi se veći afinitet BChE za R-etopropazin kako u aktivnome tako i u perifernome mjestu vezanja.

Tablica 4.11 Stojan-Fournier model (5 parametara): Katalitičke konstante K_1 , a , b , konstante brzine hidrolize supstrata k_2 i k_3 , konstante disocijacije enzim-inhibitor kompleksa K_I^A i K_I^P sa standardnim odstupanjima za hidrolizu supstrata ATCh sa BChE iz konjskog seruma (160 nmol dm^{-3}) i inhibiciju sa enantiomerima i racematom etopropazina. Stereoselektivnost BChE za enantiomere etopropazina izračunana je kao omjer disocijacijskih konstanta K_I^A S- i R-etopropazina. Mjerenja su provedena uz supstrat ATCh ($0,002\text{--}75 \text{ mmol dm}^{-3}$), enantiomere i racemat etopropazina ($0,5\text{--}20 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) na raznim temperaturama. Konstante su računane prema jed. 1.16, te su navedene vrijednosti sume kvadrata odstupanja.

t / °C	12	20	25	30	37
k_3 / s^{-1}	$435,2 \pm 18,2$	$422,8 \pm 29,9$	$567,9 \pm 56,8$	$563,0 \pm 26,3$	$677,7 \pm 26,5$
$k_2 / 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$	$1,98 \pm 0,10$	$3,71 \pm 0,33$	$4,54 \pm 0,64$	$3,92 \pm 0,30$	$1,77 \pm 0,57$
$K_1 = K_2 / \text{mmol dm}^{-3}$	$0,42 \pm 0,03$	$2,41 \pm 0,59$	$2,29 \pm 0,92$	$3,06 \pm 0,45$	$1,65 \pm 0,17$
b	$1,16 \pm 0,05$	$2,01 \pm 0,14$	$1,87 \pm 0,20$	$2,26 \pm 0,11$	$2,48 \pm 0,10$
a	$0,079 \pm 0,005$	$0,190 \pm 0,091$	$0,146 \pm 0,073$	$0,212 \pm 0,071$	$0,111 \pm 0,008$
R-etopropazin					
$K_I^A / \text{nmol dm}^{-3}$	$87,8 \pm 6,7$	$704,1 \pm 15,6$	1116 ± 536	$996,9 \pm 148,2$	$540,4 \pm 75,7$
$K_I^P / \text{nmol dm}^{-3}$	$49,7 \pm 3,9$	$58,7 \pm 5,9$	$42,5 \pm 7,9$	$48,1 \pm 4,6$	$210,5 \pm 11,8$
S-etopropazin					
$K_I^A / \text{nmol dm}^{-3}$	$230,8 \pm 17,3$	1831 ± 405	2740 ± 1424	1628 ± 245	1228 ± 169
$K_I^P / \text{nmol dm}^{-3}$	$233,3 \pm 25,3$	$146,9 \pm 14,4$	$75,7 \pm 13,1$	$182,7 \pm 19,7$	$546,6 \pm 32,3$
racemat					
$K_I^A / \text{nmol dm}^{-3}$	$139,0 \pm 10,9$	$980,1 \pm 212,4$	1415 ± 679	1368 ± 193	$741,8 \pm 108,3$
$K_I^P / \text{nmol dm}^{-3}$	$78,4 \pm 5,9$	$58,1 \pm 5,5$	$64,5 \pm 12,9$	$76,7 \pm 7,5$	$259,0 \pm 14,2$
racemat*					
$K_I^A / \text{nmol dm}^{-3}$	127,2	1017	1586	1237	750,5
$K_I^A (S) / K_I^A (R)$	2,63	2,60	2,46	1,63	2,27
Suma kvadrata odstupanja	$4,15 \cdot 10^3$	$2,10 \cdot 10^4$	$1,38 \cdot 10^5$	$4,66 \cdot 10^4$	$2,24 \cdot 10^4$

* Vrijednost konstante K_I^A za racemat, izračunana je iz vrijednosti konstanta K_I^A za enantiomere.



Slika 4.17 Ovisnost početnih aktivnosti BChE konjskog seruma o koncentraciji etopropazina (racemat i enantiomeri) pri 20 °C. Mjerenje aktivnosti je provedeno uz supstrat ATCh (2,0-75 000 $\mu mol\ dm^{-3}$), R-etopropazin (0,5, 1,0, 2,0 i 5,0 $\mu mol\ dm^{-3}$), S-etopropazin (1,0, 2,0, 5,0 i 10,0 $\mu mol\ dm^{-3}$) i racemat etopropazina (0,5, 1,0, 2,0 i 5,0 $\mu mol\ dm^{-3}$) i BChE konjskog seruma (160 $nmol\ dm^{-3}$). Aktivnost enzima u odsutnosti inhibitora (●) i u prisutnosti racemata (○), R- (○) i S-etopropazina (○). Podacima na grafovima A, B i C istovremeno je prilagođavana jed. 1.15 izvedena iz Stojan-Fournier-ovog modela (5 parametara).

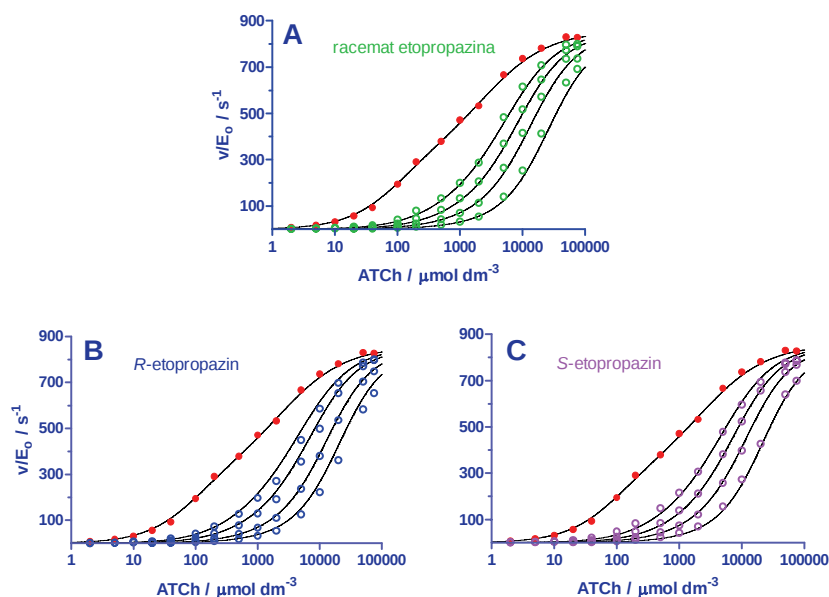
Rezultati dobiveni primjenom 6-parametarskog modela (Tablica 4.12) slični su onima dobivenima iz 5-parametarskog modela (Tablica 4.11), a to je u prvome redu radi sličnih vrijednosti disocijacijskih konstanta za enzim-supstrat komplekse K_1 i K_2 na određenoj temperaturi. Primjerice na 30 °C K_1 iznosi 2,86, a K_2 3,17 $mmol\ dm^{-3}$ što je razlika od 11%, a u tome rasponu se kreću i standardna odstupanja tih konstanta. Općenito K_2 konstante u 6-parametarskom modelu niže su po vrijednosti od K_1 konstanta u 5-parametarskom modelu. Ostale konstante 6-parametarskog modela ne razlikuju se značajno od onih u 5-parametarskom modelu. Prosječna stereoselektivnost također iznosi 2,3 te BChE ima veći afinitet za R-etopropazin kako u aktivnome tako i u perifernome mjestu vezanja nego za S-etopropazin. Usporedba suma kvadrata odstupanja 5- i 6-parametarskog modela pokazuje da 6-parametarski model ima manju sumu kvadrata na 25, 30 i 37 °C. Temeljem toga može se zaključiti da 6-parametarski model bolje opisuje eksperimentalne podatke od 5-parametarskog modela. Kako su

razlike u sumama odstupanja minimalne bilo je opravdano reducirati 6-parametarski model na 5 parametara izjednačavanjem konstanata K_1 i K_2 . Na Slici 4.18 prikazana je dobrota prilagodbe jed. 1.16 na eksperimentalne podatke.

Tablica 4.12 Stojan-Fournier model (6 parametara): Katalitičke konstante K_1 , K_2 , a , b , konstanta brzine hidrolize supstrata k_2 i k_3 konstante disocijacije enzim-inhibitor kompleksa K_I^A i K_I^P sa standardnim odstupanjima za hidrolizu supstrata ATCh sa BChE iz konjskog seruma (160 nmol dm^{-3}) i inhibiciju sa enantiomerima i racematom etopropazina. Stereoselektivnost BChE za enantiomere etopropazina izračunana je kao omjer disocijacijskih konstanata K_I^A S- i R-etopropazina, također su navedene vrijednosti sume kvadrata odstupanja. Mjerenja su provedena uz supstrat ATCh ($0,002\text{--}75 \text{ mmol dm}^{-3}$), enantiomere i racemat etopropazina ($0,5\text{--}20 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) na raznim temperaturama. Konstante su računane prema jed. 1.16, te su navedene vrijednosti sume kvadrata odstupanja.

t / °C	12	20	25	30	37
k_3 / s^{-1}	$479,7 \pm 19,5$	$428,0 \pm 23,6$	$610,0 \pm 64,9$	$672,2 \pm 14,4$	1080 ± 45
$k_2 / 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$	$1,98 \pm 0,10$	$3,70 \pm 0,25$	$4,53 \pm 0,65$	$3,17 \pm 0,18$	$1,62 \pm 0,07$
$K_1 / \text{mmol dm}^{-3}$	$0,42 \pm 0,02$	$2,07 \pm 1,19$	$1,20 \pm 0,84$	$2,86 \pm 0,62$	$1,23 \pm 0,11$
$K_2 / \text{mmol dm}^{-3}$	$0,76 \pm 0,16$	$2,37 \pm 0,61$	$1,91 \pm 1,21$	$3,17 \pm 0,40$	$1,04 \pm 0,14$
b	$1,16 \pm 0,05$	$2,00 \pm 0,11$	$1,76 \pm 0,19$	$1,90 \pm 0,04$	$1,56 \pm 0,07$
a	$0,081 \pm 0,004$	$0,147 \pm 0,074$	$0,092 \pm 0,049$	$0,207 \pm 0,043$	$0,121 \pm 0,007$
R-etopropazin					
$K_I^A / \text{nmol dm}^{-3}$	$162,0 \pm 33,9$	$689,9 \pm 200,4$	$820,8 \pm 647,0$	1035 ± 164	$308,2 \pm 40,8$
$K_I^P / \text{nmol dm}^{-3}$	$43,5 \pm 3,1$	$60,3 \pm 4,7$	$43,7 \pm 7,8$	$57,1 \pm 5,2$	$223,0 \pm 19,4$
S-etopropazin					
$K_I^A / \text{nmol dm}^{-3}$	$424,5 \pm 88,6$	2021 ± 604	1838 ± 1495	1543 ± 220	$708,7 \pm 95,0$
$K_I^P / \text{nmol dm}^{-3}$	$189,7 \pm 18,0$	$138,1 \pm 10,1$	$81,5 \pm 14,1$	$221,3 \pm 23,9$	$582,3 \pm 53,5$
racemat					
$K_I^A / \text{nmol dm}^{-3}$	$258,3 \pm 54,1$	$967,7 \pm 292,4$	$1043 \pm 809,6$	1664 ± 255	$418,8 \pm 56,3$
$K_I^P / \text{nmol dm}^{-3}$	$68,6 \pm 4,6$	$59,5 \pm 4,2$	$67,7 \pm 12,8$	$83,4 \pm 7,5$	$276,6 \pm 23,0$
racemat*					
$K_I^A / \text{nmol dm}^{-3}$	234,5	1029	1135	1239	429,6
$K_I^A (S) / K_I^A (R)$	2,62	2,93	2,24	1,49	2,30
Suma kvadrata odstupanja	$3,70 \cdot 10^3$	$1,13 \cdot 10^4$	$1,36 \cdot 10^5$	$5,84 \cdot 10^4$	$2,37 \cdot 10^4$

* Vrijednost konstante K_I^A za racemat, izračunana je iz vrijednosti konstanata K_I^A za enantiomere.



Slika 4.18 Ovisnost početnih aktivnosti BChE konjskog seruma o koncentraciji etopropazina (racemat i enantiomeri) pri 20 °C. Mjerenje aktivnosti je provedeno uz supstrat ATCh (2,0-75 000 $\mu mol dm^{-3}$), R-etopropazin (0,5, 1,0, 2,0 i 5,0 $\mu mol dm^{-3}$), S-etopropazin (1,0, 2,0, 5,0 i 10,0 $\mu mol dm^{-3}$) i racemat etopropazina (0,5, 1,0, 2,0 i 5,0 $\mu mol dm^{-3}$) i BChE konjskog seruma (160 nmol dm^{-3}). Aktivnost enzima u odsutnosti inhibitora (●) i u prisutnosti racemata (○), R- (○) i S-etopropazina (○). Podacima na grafovima A, B i C istovremeno je prilagođavana jed. 1.16 izvedena iz Stojan-Fournier-ovog kinetičkog modela (6 parametara).

Proširenje 6-parametarskog modela (Slika 1.14) uvođenjem dodatnih konstanata disocijacije (7-parametarski model) za moguće enzim-supstrat komplekse temelji se na opravdanoj pretpostavci ulaska supstrata u aktivno mjesto enzima. Prema njoj supstrat biva privučen od strane enzima i prvi kontakt između supstrata i enzima nastaje na ulazu u aktivno mjesto enzima. Potom supstrat putuje duž aktivnoga mjesta kako bi dospio do katalitičke trijade gdje se odvija reakcija između supstrata i serina. Za razliku od 6-parametarskog modela 7-parametarski model sadrži tri konstante disocijacije za enzim-supstrat komplekse i to K_p za kompleks sa supstratom vezanim na perifernom mjestu enzima, K_L za kompleks sa supstratom vezanim u aktivnome mjestu enzima i K_{LL} za premještaj supstrata sa perifernog na aktivno mjesto aciliranog enzima. Da bi se odredila konstanta disocijacije enzim-supstrat kompleksa K_s , analogna onoj u Webb-ovom modelu, potrebno je pomnožiti K_p i K_L konstantu.

Prema analogiji sa supstratom u model su uvedene konstante disocijacije enzim-inhibitor kompleksa, $K_{I,P}$ za kompleks sa inhibitorom vezanim na perifernome mjestu enzima i $K_{I,L}$ za kompleks sa inhibitorom vezanim u aktivnome mjestu enzima. Kod inhibitora nije pretpostavljeno istovremeno vezanje više molekula inhibitora na enzim, budući da preliminarni rezultati prilagodbe jednadžbe koja to pretpostavlja nisu bili u skladu s kriterijima za dobrotu prilagodbe teoretske krivulje na eksperimentalne podatke.

Primjena 7-parametarskog modela, odnosno jed. 1.17, u analizi eksperimentalnih podataka rezultirala je s drugačijim vrijednostima konstanta k_3 , k_2 , a i b u odnosu na one izračunane primjenom jed. 1.16 (Tablica 4.13). Konstante k_3 , a i b te konstanta K_P , koja odgovara konstantama K_1 i K_2 u 6-parametarskom modelu, prosječno su viših vrijednosti. Velika razlika između ova dva modela uočava se kada se usporede odgovarajuće konstante k_2 . U 7-parametarskom modelu vrijednosti k_2 konstante niže su tri reda veličine u odnosu na 6-parametarski model. Usporedbom K_S konstanta s onima iz Webb-ovog modela (Tablica 4.8) uočavamo dobro slaganje, tj. vrijednosti ovih konstanta istog je reda veličine ($0,52 - 1,34 \text{ mmol dm}^{-3}$). Također konstanta K_P , koja odgovara konstanti K_{SS} u Webb-ovom modelu, viša je po vrijednosti od odgovarajuće K_{SS} konstante također i od K_1 odnosno K_2 konstante u 6-parametarskom modelu. Primjerice na 20°C K_P iznosi $39,1 \text{ mmol dm}^{-3}$, $K_{SS} = 8,0$, a $K_1 = 2,4 \text{ mmol dm}^{-3}$. Ovo je očiti primjer kako modeli mogu pretpostaviti isto vezanje supstrata na periferno mjesto na enzimu, a dati bitno drugačiji rezultat.

Usporedba konstanta K_I s odgovarajućim K_I^P konstantama (Tablica 4.12) pokazuje uzajamno slaganje što se prenosi i na podudaranje stereoselektivnosti. Primjenom ovog modela u izračunu konstanta inhibicije K_I potvrdilo se kao i u prijašnjim modelima da je moguće konstantu inhibicije racemata izračunati iz konstanta inhibicije za enantiomere koristeći jed. 3.12 uz dobro slaganje eksperimentalno određenih i izračunanih vrijednosti. Prosječno odstupanje eksperimentalnih i izračunanih konstanta za inhibiciju racematom iznosi 8%.

Kada se usporede sume kvadrata odstupanja iskušanih kinetičkih modela, 7-parametarski model rezultira s najnižom sumom kvadrata na 12°C , dok 6-parametarski model ima najniže sume na 20 i 25°C , a 5-parametarski model na 30 i 37°C . Budući da vrijednosti eksperimentalnih točaka utječu na sumu kvadrata odstupanja pristupio sam njihovoj normalizaciji. Normalizacija je provedena tako da su sume kvadrata odstupanja 5-, 6- i 7-parametarskog modela podijeljene s najnižom sumom kvadrata za određenu temperaturu. Sume tih normaliziranih suma odstupanja iznose za 5-parametarski model 6,06, za 6-parametarski model 5,37 i za 7-parametarski model 5,99. Temeljem ove

usporedbe, model sa šest parametara za hidrolizu supstrata i dva za inhibiciju enzima najbolje opisuje eksperimentalne podatke u odnosu na druge testirane modele.

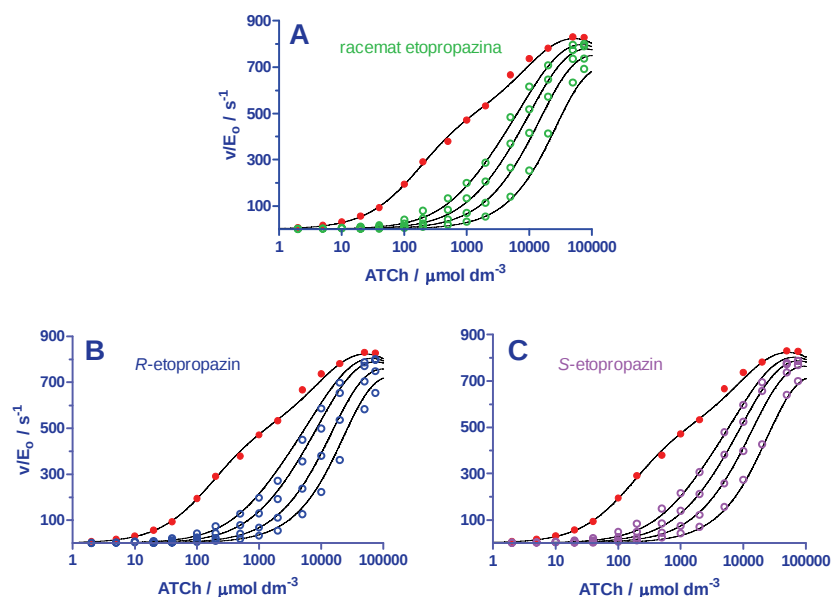
Tablica 4.13 Stojan-Fournier model (7 parametara): Katalitičke konstante K_P , K_L , K_{LL} , a , b , konstante brzine hidrolize supstrata k_2 i k_3 , konstante disocijacije enzim-inhibitor kompleksa $K_{I,P}$ i $K_{I,L}$ sa standardnim odstupanjima za hidrolizu supstrata ATCh sa BChE iz konjskog seruma (160 nmol dm^{-3}) i inhibiciju sa enantiomerima i racematom etopropazina. Stereo-selektivnost BChE za enantiomere etopropazina izračunana je kao omjer disocijacijskih konstanta K_I^* S- i R-etopropazina,. Mjerenja su provedena uz supstrat ATCh ($0,002\text{--}75 \text{ mmol dm}^{-3}$), enantiomere i racemat etopropazina ($0,5\text{--}20 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) na raznim temperaturama. Konstante su računane prema jed. 1.18, te su navedene vrijednosti sume kvadrata odstupanja.

t / °C	12	20	25	30	37
k_3 / s^{-1}	$445,6 \pm 8,6$	$823,1 \pm 23,0$	1205 ± 105	$915,1 \pm 31,2$	1433 ± 46
$k_2 / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$	1065 ± 23	1480 ± 39	1509 ± 90	2639 ± 96	2090 ± 49
$K_P / \text{mmol dm}^{-3}$	$32,1 \pm 1,2$	$39,1 \pm 1,8$	$29,4 \pm 3,3$	$31,2 \pm 0,72$	$46,8 \pm 1,7$
$K_L / \text{mmol dm}^{-3}$	$16,2 \pm 0,7$	$12,6 \pm 0,7$	$13,1 \pm 1,7$	$25,3 \pm 1,7$	$28,6 \pm 1,2$
$K_{LL} / \text{mol dm}^{-3}$	$38,1 \pm 15,2$	$4,77 \pm 0,80$	$8,94 \pm 4,42$	$5,64 \pm 0,72$	$2,75 \pm 0,27$
$K_S^{\#} / \text{mmol dm}^{-3}$	0,52	0,49	0,39	0,79	1,34
b	$4,21 \pm 0,14$	$5,47 \pm 0,26$	$5,17 \pm 0,75$	$5,78 \pm 0,30$	$6,26 \pm 0,29$
a	$0,56 \pm 0,02$	$0,79 \pm 0,03$	$0,91 \pm 0,08$	$0,73 \pm 0,04$	$1,33 \pm 0,05$
<i>R</i> -etopropazin					
$K_{I,P} / \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$	$13,17 \pm 1,08$	$9,84 \pm 0,88$	$17,03 \pm 4,41$	$12,79 \pm 1,75$	$11,43 \pm 0,76$
$K_{I,L} / \text{mmol dm}^{-3}$	$2,52 \pm 0,22$	$5,23 \pm 0,53$	$2,53 \pm 0,71$	$3,78 \pm 0,56$	$14,99 \pm 1,23$
$K_I^* / \text{nmol dm}^{-3}$	33,19	51,47	43,05	48,36	171,2
<i>S</i> -etopropazin					
$K_{I,P} / \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$	$18,84 \pm 1,32$	$36,59 \pm 3,91$	$44,51 \pm 11,8$	$63,29 \pm 7,10$	$24,97 \pm 1,63$
$K_{I,L} / \text{mmol dm}^{-3}$	$5,90 \pm 0,47$	$3,53 \pm 0,41$	$1,90 \pm 0,53$	$2,46 \pm 0,34$	$16,85 \pm 1,38$
$K_I^* / \text{nmol dm}^{-3}$	112,2	129,4	84,55	155,4	420,9
racemat					
$K_{I,P} / \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$	$42,24 \pm 3,93$	$16,99 \pm 1,75$	$19,10 \pm 4,88$	$25,30 \pm 3,31$	$16,55 \pm 1,20$
$K_{I,L} / \text{mmol dm}^{-3}$	$1,21 \pm 0,11$	$3,43 \pm 0,38$	$3,30 \pm 0,92$	$2,83 \pm 0,72$	$13,23 \pm 1,16$
$K_I^* / \text{nmol dm}^{-3}$	50,96	58,29	63,11	71,63	219,0
racemat [†]					
$K_I^* / \text{nmol dm}^{-3}$	51,12	73,64	57,05	73,77	243,4
$K_I^* (S) / K_I^* (R)$	3,35	2,51	1,96	3,21	2,46
Suma kvadrata odstupanja	$3,50 \cdot 10^3$	$1,59 \cdot 10^4$	$1,41 \cdot 10^5$	$5,47 \cdot 10^4$	$3,07 \cdot 10^4$

[#] Konstanta disocijacije supstrata K_S izračunana je kao produkt konstanta $K_P \cdot K_L$.

^{*} Konstanta inhibicije K_I^* izračunana je kao produkt konstanta $K_{I,P} \cdot K_{I,L}$.

[†] Vrijednost konstante K_I^* za racemat, izračunana je iz vrijednosti konstanta K_I^* za enantiomere.



Slika 4. 19 Ovisnost početnih aktivnosti BChE konjskog seruma o koncentraciji etopropazina (racemat i enantiomeri) pri 12 °C. Mjerenje aktivnosti je provedeno uz supstrat ATCh ($2,0\text{--}75\,000\,\mu\text{mol dm}^{-3}$), *R*-etopropazin ($0,5$, $1,0$, $2,0$ i $5,0\,\mu\text{mol dm}^{-3}$), *S*-etopropazin ($1,0$, $2,0$, $5,0$ i $10,0\,\mu\text{mol dm}^{-3}$) i racemat etopropazina ($0,5$, $1,0$, $2,0$ i $5,0\,\mu\text{mol dm}^{-3}$) i BChE konjskog seruma ($160\,\text{nmol dm}^{-3}$). Aktivnost enzima u odsutnosti inhibitora (●) i u prisutnosti racemata (○), *R*- (○) i *S*-etopropazina (○). Podacima na grafovima A, B i C istovremeno je prilagođavana jed. 1.18 izvedena iz Stojan-Fournier-ovog kinetičkog modela (7 parametara).

Slika 4.19 pokazuje prilagodbu teoretske krivulje koja proizlazi iz 7-parametarskog modela (Slika 1.15) na eksperimentalne podatke. Može se uočiti da krivulja koja se odnosi na aktivnost enzima u odsustvu inhibitora dobro opisuje eksperimentalne aktivnosti uz manja odstupanja kod aktivnosti izmjerenih sa $5,0$ i $10,0\,\text{mmol dm}^{-3}$ supstratom ATCh. Krivulja postiže maksimum kod aktivnosti izmjerene sa $50,0\,\text{mmol dm}^{-3}$ supstratom te pokazuje pad vrijednosti daljnjim povećanjem koncentracije supstrata. Supstrat ATCh je takve prirode da ne pokazuje jasnu inhibiciju BChE konjskog seruma, nasuprot njemu supstrati sa većim acilnim skupinama od acetatne skupine na pr. butiriltiokolin ili propioniltiokolin inhibiraju BChE.⁵⁰ U tom slučaju pretpostavke mehanizma hidrolize supstrata enzimom uključene u 7-parametarski model bolje bi došle do izražaja.

Proširenje modela sa 7 parametra sa parametrom temperature

Budući da su Stojan-Fournier kinetički modeli dobro opisivali hidrolizu supstrata i inhibiciju BChE konjskog seruma etopropazinom na pojedinoj temperaturi želio sam dodatno iskušati model sa 7 parametara. Ukoliko model dobro pretpostavlja korake u mehanizmu hidrolize supstrata, te disocijacijske komplekse između enzima i supstrata te enzima i inhibitora morao bi biti primjenjiv na raznim temperaturama. Promjenom temperature mogu se povećati konstante brzine reakcija, ali se mogu mijenjati i afiniteti enzima prema supstratu odnosno inhibitoru. Ove promjene u vrijednostima konstanta uočene su kod svih iskušanih modela kada se usporede njihove vrijednosti na raznim temperaturama.

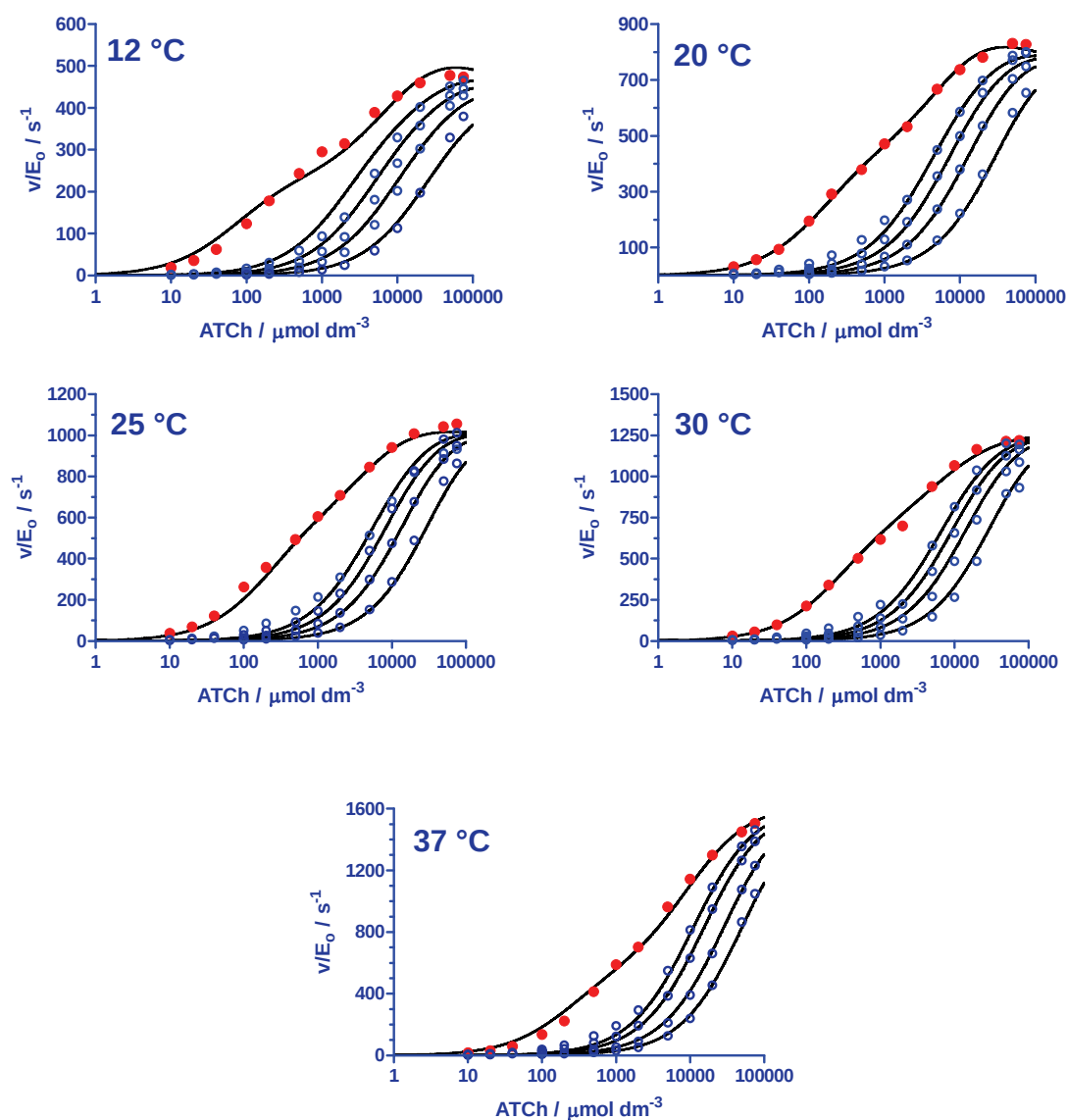
Konstante brzine k_{cat} i reverzibilne konstante K_S , K_{SS} i K_I (Tablica 4.4 i 4.5) poslužile su za određivanje entalpije ($\Delta^\ddagger H$) i entropije ($\Delta^\ddagger S$) aktivacije hidrolize supstrata, odnosno entalpije (ΔH°) i entropije (ΔS°) stvaranja kompleksa između enzima i supstrata i enzima i inhibitora (Tablica 4.6). Na analogan način bilo je moguće odrediti odgovarajuće entalpije i entropije iz ravnotežnih konstanta i konstanta brzine izračunanih pomoću Stojan-Fournier kinetičkog modela (7 parametara). U modelu konstante brzine reakcije k_3 , $b \cdot k_3$, k_2 i $a \cdot k_2$ supstituirane su s jed. 3.15, a ravnotežne konstante K_P , K_L , K_{LL} , $K_{I,P}$ i $K_{I,L}$ s jed. 3.16 (Prilog, jed. 7.48–7.56). Obje jednadžbe primijenjene su u eksponencijalnom obliku. Izračunane entalpije i entropije navedene su u Tablici 4.14. Suma kvadrata odstupanja teoretske krivulje od eksperimentalnih točaka iznosi $5,98 \cdot 10^5$ i viša je od suma navedenih u Tablici 4.13. To ne znači da je prilagodba teoretske krivulje lošija nego je broj točaka povećan sa 177 na jednoj temperaturi na 885 (5×177) točaka izmjerenih na svih pet temperatura (12, 20, 25, 30 i 37 °C) što doprinosi ukupnom povećanju sume kvadrata odstupanja. Kada se vrijednost sume kvadrata odstupanja podijeli sa pet, dobiva se vrijednost bliska onoj dobivenoj za sumu kvadrata odstupanja na 25 °C (Tablica 4.13). Valja napomenuti da vrijednosti izračunane za entalpiju i entropiju pojedinih konstanta ne moraju biti konačne, jer je moguće više realnih rješenja.⁴¹ Bilo je potrebno tijekom prilagodbe teoretske krivulje na eksperimentalne podatke vrijednosti za entalpiju i entropiju konstante K_{LL} držati nepromjenjivima. Budući da enzim ne pokazuje inhibiciju pri visokim koncentracijama supstrata koja bi rezultirala pouzdanom vrijednošću za K_{LL} , moguće su razne vrijednosti entalpije i entropije te sustav postaje nestabilan.

Kako bi se utvrdilo koje rješenje je prihvatljivo potrebno je izračunati vrijednost određene konstante na nekoj temperaturi, te dobivenu vrijednost usporediti sa ranije izračunanom konstantom. Na pr. konstanta k_3 na 37°C izračunana pomoću entalpije i entropije aktivacije iznosi 2214 s^{-1} , dok je vrijednost te konstante u Tablici 4.13

$k_3 = 1433 \text{ s}^{-1}$. Istom usporedbom konstanta K_L na 37°C izračunana iz odgovarajućih vrijednosti za entalpiju i entropiju iznosi $30,5 \text{ mmol dm}^{-3}$, a u Tablici 4.13 $K_L = 28,6 \text{ mmol dm}^{-3}$. Lošije slaganje između konstanata uočava se kod konstanata inhibicije pa tako za S-etopropazin $K_{i,P}$ iznosi $4,67 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$ na 37°C dok je vrijednost u Tablici 4.13 $K_{i,P} = 24,97 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$. Ovo odstupanje ukazuje da je moguće neko drugo rješenje sa boljim slaganjem između odgovarajućih konstanata ili je potrebno intervenirati u modelu kako bi se bolje opisao mehanizam enzimske hidrolize supstrata i inhibicije.

Tablica 4.14 Entalpije ΔH i entropije ΔS sa standardnim odstupanjima za hidrolizu supstrata ATCh i inhibiciju BChE konjskog seruma enantiomerima i racematom etopropazina. Mjerjenja su provedena uz supstrat ATCh ($0,002\text{--}75 \text{ mmol dm}^{-3}$), enantiomere i racemat etopropazina ($0,5\text{--}20 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$) na $12, 20, 25, 30$ i 37°C . Entalpije i entropije izračunane su prema jed. 1.19 uz supstituciju s jed. 7.48–7.56.

	Supstrat (ATCh)	R-etopropazin	S-etopropazin	racemat
$k_3, \Delta^\ddagger H / \text{kJ/mol}$	$61,38 \pm 0,64$	—	—	—
$k_3, \Delta^\ddagger S / \text{J/Kmol}$	$16,72 \pm 2,19$	—	—	—
$b \cdot k_3, \Delta^\ddagger H / \text{kJ/mol}$	$60,2 \pm 0,2$	—	—	—
$b \cdot k_3, \Delta^\ddagger S / \text{J/Kmol}$	$19,9 \pm 0,9$	—	—	—
$k_2, \Delta^\ddagger H / \text{kJ/mol}$	$-112,4 \pm 0,4$	—	—	—
$k_2, \Delta^\ddagger S / \text{J/Kmol}$	$-552,3 \pm 1,4$	—	—	—
$a \cdot k_2, \Delta^\ddagger H / \text{kJ/mol}$	$3,67 \pm 0,26$	—	—	—
$a \cdot k_2, \Delta^\ddagger S / \text{J/Kmol}$	$-168,5 \pm 0,8$	—	—	—
$K_P, K_{i,P}, \Delta H^\circ / \text{kJ/mol}$	$6,84 \pm 0,31$	$54,22 \pm 0,78$	$52,36 \pm 0,84$	$55,29 \pm 0,75$
$K_P, K_{i,P}, \Delta S^\circ / \text{J/Kmol}$	$-16,4 \pm 1,0$	$63,69 \pm 2,56$	$66,77 \pm 2,78$	$68,37 \pm 2,51$
$K_L, K_{i,L}, \Delta H^\circ / \text{kJ/mol}$	$-109,2 \pm 0,2$	$-105,9 \pm 0,4$	$-36,8 \pm 0,5$	$-41,1 \pm 0,5$
$K_L, K_{i,L}, \Delta S^\circ / \text{J/Kmol}$	$-381,1 \pm 0,8$	$-388,0 \pm 1,3$	$-152,6 \pm 1,8$	$-165,5 \pm 1,7$
$K_{LL}, \Delta H^\circ / \text{kJ/mol}$	$4,81 \pm 0,0$	—	—	—
$K_{LL}, \Delta S^\circ / \text{J/Kmol}$	$69,1 \pm 0,0$	—	—	—



Slika 4. 20 Hidroliza supstrata ATCh i inhibicija BChE konjskog seruma enantiomerima i racematom etopropazina pri različitim temperaturama. Analiza početnih aktivnosti izmjerenih pri 12, 20, 25, 30 i 37 °C provedena je sa Stojan-Fournier modelom sa 7 parametara za hidrolizu supstrata i dva parametra za inhibiciju enzima. U jed. 1. 19 konstante brzine reakcije k_3 , $b \cdot k_3$, k_2 i $a \cdot k_2$, te ravnotežne konstante K_P , K_L , K_{LL} , $K_{I,P}$ i $K_{I,L}$ supstituirane s jed. 7.48–7.56. Teoretska krivulja istovremeno je prilagođavana svim eksperimentalnim podacima.

Dobrota istovremene prilagodbe Stojan-Fournier kinetičkog modela (7 parametara) na eksperimentalne podatke prikazana je na Slici 4.20. Može se uočiti lošije slaganje teoretskih krivulja sa eksperimentalnim podacima na 12 °C, dok je to slaganje bolje na višim temperaturama. Također se može uočiti neslaganje teoretskih krivulja sa eksperimentalnim podacima u odsutnosti etopropazina za aktivnost enzima izmjerene kod koncentracija supstrata ATCh manjih od 1,0 mmol dm⁻³. Eksperimentalne aktivnosti pokazuju maksimum aktivnosti na 25 °C, dok teoretske krivulje imaju maksimum na 12 °C te sustavan pad prema 37 °C. Ova činjenica zahtijeva dodatna poboljšanja u modelu. Radi jednostavnosti prikaza na Slici 4.20 dane su samo eksperimentalne točke koje odgovaraju enzimskoj aktivnosti izmjerenoj u odsutnosti i prisutnosti *R*-etopropazina na raznim temperaturama.

4.3.2. Inhibicija rekombinantnih kolinesterazâ miša

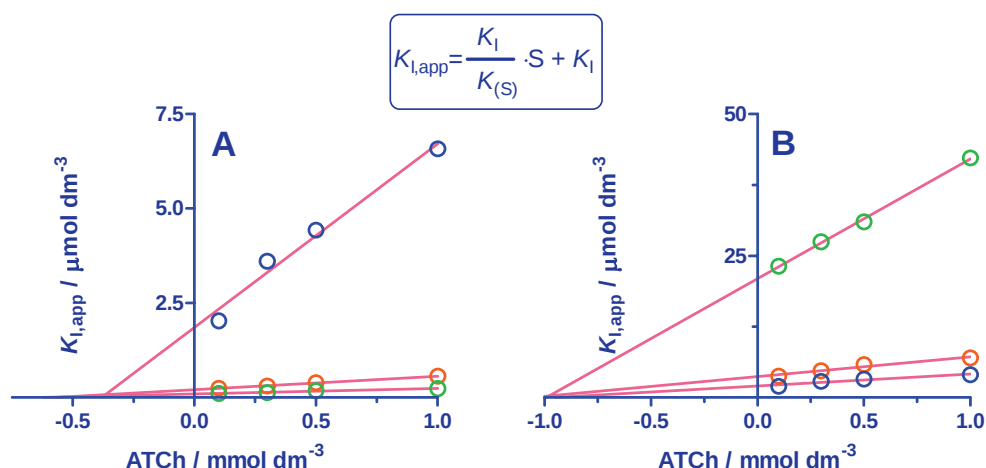
Rekombinatne kolinesteraze miša poslužile su da se detaljnije prouči mehanizam inhibicije kolinesteraza enantiomerima etopropazina. U ovim eksperimentima korištene su navedene ChE miša: AChE divljeg tipa, BChE divljeg tipa te jednostruki mutanti AChE i to tirozin 124 glutamin (Y124Q), tirozin 337 alanin (Y337A) i triptofan 286 alanin (W286A). Navedene mutacije nalaze se unutar aktivnog mjesta enzima a priređene su sa svrhom proširenja aktivnog mjesta AChE zamjenom navedenih aminokiselina s analognim aminokiselinama koje nalazimo u aktivnom mjestu BChE. Kako se očekivalo sve ChE miša bile su inhibirane racematom etopropazina ili njegovim pojedinim enantiomerima. Najslabija inhibicija je uočena kod AChE divljeg tipa sa prosječnom konstantom disocijacije enzim-inhibitor kompleksa ($K_i = 132,1 \pm 1,7 \mu\text{mol dm}^{-3}$) te nije uočena stereoselektivnost prema enantiomerima etopropazina (Tablica 4.15). Za razliku od AChE, BChE divljeg tipa pokazuje za tri reda veličine veći afinitet za racemat (preko 1600 puta), odnosno za enantiomere etopropazina. BChE miša također pokazuje stereoselektivnost prema enantiomerima etopropazina i to preko tri puta veći afinitet prema *R*- u odnosu na *S*-etopropazin. Istu stereoselektivnost pokazuje i Y337A mutant AChE s tom razlikom da je dvadeset puta veći afinitet prema *R*- u odnosu na *S*-etopropazin (Slika 4.21A). Upečatljivo je kako jednostruka mutacija, odnosno promjena aromatske aminokiseline, tirozina u alanin povećava afinitet enzima prema racematu etopropazina preko 600 puta. Preostala dva mutanta mišje AChE Y124Q i W286A pokazuju obrnutu stereoselektivnost odnosno ovi enzimi imaju veći afinitet prema *S*-etopropazinu nego *R*-etopropazinu (Slika 4.21B). Mutant Y124Q pokazuje deset puta veći afinitet prema *S*-etopropazinu u odnosu na *R*-enantiomer, a isto tako je zanimljivo da se vrijednosti konstanta disocijacije za *S*-etopropazin podudaraju za Y124Q i Y337A. Najmanje povećanje afiniteta za etopropazin u odnosu na AChE divljeg tipa pokazuje mutant W286A od oko 2,6 puta za racemat. Ovaj mutant također preferira *S*-etopropazin uz 2,75 puta veći afinitet u odnosu na *R*-enantiomer.

Tablica 4.15 Konstante inhibicije (K_i) rekombinantnih kolinesterazâ miša BChE, AChE i AChE mutanata (Y337A, Y12Q i W286A) enantiomerima i racemičnim etopropazinom. $K_{(S)}$ je konstanta disocijacije za enzim-supstrat kompleks izračunana kao srednja vrijednost konstanta $K_{(S)}$ dobivenih iz pokusa inhibicije enantiomerima i racematom. Inhibicija je provedena kod četiri koncentracije supstrata ATCh (0,1, 0,3, 0,5 i 1,0 mmol dm⁻³) s enantiomerima i racematom etopropazina (0,05 - 200 µmol dm⁻³) pri 25 °C. Konstante K_i i K_s izračunane su prema jed. 3.7 (Hounter-Dawns prikaz).

Enzim	K_i / nmol dm ⁻³			$\frac{K_i(S)}{K_i(R)}$	$K_{(S)}$ / mmol dm ⁻³
	R-etopropazin	S-etopropazin	racemat		
BChE	36 ± 1	177 ± 35	82 ± 2	3,28	0,52 ± 0,11
Y337A	92 ± 8	1 856 ± 292	208 ± 8	20,2	0,53 ± 0,13
Y124Q	20 900 ± 400	2 020 ± 220	3 670 ± 310	0,10 (10,3)*	1,00 ± 0,05
W286A	87 000 ± 26 100	31 600 ± 5 900	51 400 ± 5 900	0,36 (2,75)*	0,47 ± 0,08
AChE	133 700 ± 13 300	130 400 ± 9 800	132 200 ± 15 600	0,98	0,78 ± 0,28

* Vrijednosti u zagradi predstavljaju recipročni omjer konstanta inhibicije $K_i(R)$ / $K_i(S)$.

U Tablici 4.15 navedene su i prosječne vrijednosti disocijacijskih konstanta kompleksa enzim-supstrat (K_s) sa standardnim odstupanjima. Prosječne vrijednosti predstavljaju aritmetičku sredinu konstanta koje su izračunate za pojedine enantiomere i racemat. Vrijednosti konstanta kreću se u rasponu od 0,47 za W286A mutant do 1,00 mmol dm⁻³ za Y124Q mutant s time da su slične vrijednosti za BChE i Y337A mutant. Vrijednost konstante za AChE divljeg tipa nalazi se u sredini navedenog raspona.



Slika 4.21 Inhibicija mutanata miške AChE enantiomerima i racematom etopropazina pri 25 °C (Hunter-Downs prikaz). Inhibicija tirozin 337 alanin mutanta AChE (A) i tirozin 124 glutamat mutanta AChE (B) *R*-etopropazinom (○), *S*-etopropazinom (○) i racematom (○). Svaka pojedina prividna konstanta inhibicije izračunata je iz inhibicije s minimalno tri koncentracija etopropazina ($0,050$ – $200 \mu\text{mol dm}^{-3}$) kod pripadajućih koncentracija supstrata ATCh ($0,10$, $0,30$, $0,50$, i $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$). Konstante su izračunane prema jed. 3.5 i 3.7.

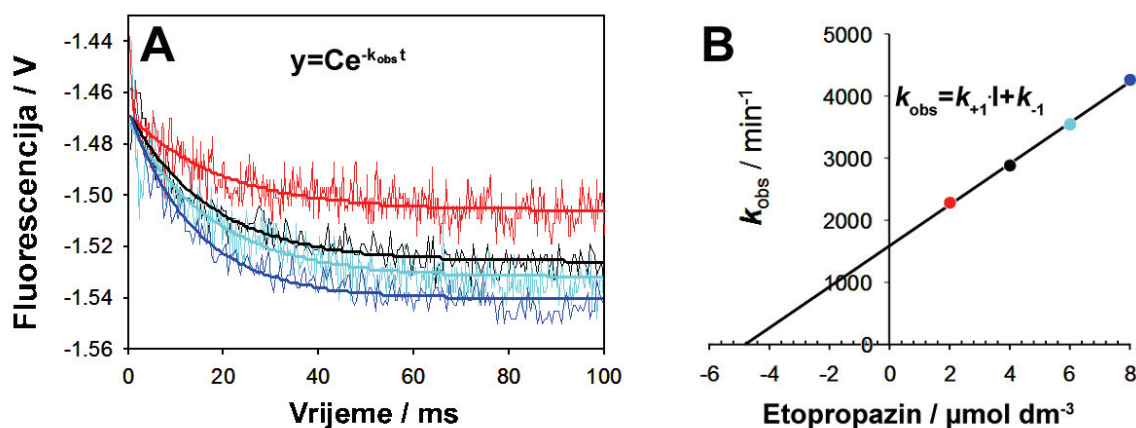
4.3.3. Određivanje afiniteta kolinesterazâ za etopropazin metodom gašenja fluorescencije**

Metoda gašenja fluorescencije omogućuje neposredno mjerenje afiniteta nekog proteina za određeni ligand uz uvjet da aminokiselina uključena u vezanje liganda fluorescira. Ova metoda omogućuje mjerenje brzine stvaranja i disocijacije kompleksa enzim-ligand. Također se ovom metodom izbjegava upotreba supstrata i njegov mogući utjecaj na afinitet enzima za ligand. U našem slučaju mjerili smo vezanje etopropazina na BChE konja (Slika 4.22) i miša te na mutante AChE miša tirozin 337 alanin (Y337A) i tirozin 124 glutamat (Y124Q) pomoću fluorimetra sa zaustavljenim protokom. Metodom se mjeri brzina opadanja intenziteta intrinzične fluorescencije triptofana u aktivnom mjestu kolinesteraze zbog stvaranja kompleksa između enzima i etopropazina (Tablica 4.16).

** Glavninu pokusa načinio je dr. Zoran Radić u laboratoriju prof. Palmera Taylora.

Tablica 4.16 Konstante brzine vezanja (k_{+1}) i brzine disocijacije (k_{-1}) etopropazina te konstanta disocijacije kompleksa (K_D) za reakciju BChE konja s racematom etopropazina pri 23 °C. Konstante su izračunane iz pokusa gašenja fluorescencije pomoću jed. 3.9–3.11. Mjerenje je provedeno u fosfatnom puferu ($0,10 \text{ mol dm}^{-3}$) uz BChE (20 nmol dm^{-3}) i minimalno četiri koncentracije racemata etopropazina ($0,20\text{--}1,0 \text{ } \mu\text{mol dm}^{-3}$).

Enzim	$k_{+1} / 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$	k_{-1} / min^{-1}
BChE konja	1,2	105
	1,3	79
	<u>1,0</u>	<u>91</u>
Srednja vrijednost	$1,2 \pm 0,1$	92 ± 11
$K_D = k_{-1}/k_{+1}$	$76,7 \text{ nmol dm}^{-3}$	



Slika 4.22 Određivanje afiniteta enzima za racemični etopropazin metodom gašenja fluorescencije pri 23 °C. Promjena intrinzične fluorescencije enzima dodatkom etopropazina (A). Konstanta brzine vezanja (k_{+1}) i brzine disocijacije (k_{-1}) etopropazina sa kolinesteraze (Y33A), te konstanta disocijacije (K_D) izračunate su pomoću jed. 3.9–3.11 (B). Mjerenje je provedeno u fosfatnom puferu (0.1 mol dm^{-3}) uz BChE (20 nmol dm^{-3}) i racemat etopropazina ovih koncentracija: 2,0, 4,0, 6,0 i 8,0 $\mu\text{mol dm}^{-3}$.

Mjerenje gašenja fluorescencije provedeno je s enantiomerima i racematom etopropazina te su dobivene konstante disocijacije K_D za BChE konja, miša i mutante mišje AChE Y337A i Y124Q (Tablica 4.17).⁵⁹ Obje BChE pokazuju veći afinitet za *R*- nego za *S*-etopropazin, a također i AChE mutant Y337A. Mutant Y124Q ima veći afinitet za *S*-enantiomer odnosno pokazuje obrnutu stereoselektivnost nego ostali enzimi. Najveću stereoselektivnost pokazuje mutant Y337A sa 47 puta većim afinitetom za *R*-etopropazin

nego S-etopropazin. Drugi testirani enzimi također pokazuju stereoselektivnost prema enantiomerima etopropazina no ona nije toliko izražena. Mutanti Y337A i Y124Q međusobno se razlikuju u stereoselektivnosti, ali pokazuju sličan afinitet za S-etopropazin.

Tablica 4.17 Konstante disocijacije (K_D) enzim-etopropazin kompleksa određene za kolinesteraze pri 23 °C. Kao enzimski preparati korišteni su BChE konja i miša, te mutanti AChE miša Y337A i Y124Q (7-200 nmol dm⁻³), a kao ligand enantiomeri ili racemat etopropazina (0,2-8,0 μmol dm⁻³). Konstante su izračunane iz pokusa gašenja fluorescencije pomoću jed. 3.9–3.11.⁵⁹ Vrijednosti su izračunane iz najmanje 3 pokusa.

Enzim	K_D / nmol dm ⁻³			Stereoselektivnost K_D (S) / K_D (R)
	R-etopropazin	S-etopropazin	racemat	
BChE konja	71	149	77	2,1
BChE miša	21	60	—	2,9
AChE miša				
Y337A mutant	44	2081	—	47,3
Y124Q mutant	3022	1922	—	0,6 (1,6)*

* Vrijednost u zagradi predstavlja omjer K_D (R) / K_D (S), odnosno obrnutu stereoselektivnost.

5. RASPRAVA

Enzimi su građeni od kiralnih amino kiselina pa stoga u reakcijama enzima s kiralnim supstratima i inhibitorima dolazi do kiralnog prepoznavanja, što se očituje u razlici afiniteta enzima za enatiomere tih spojeva. Acetilkolinesteraza i butirilkolinesteraza pokazuje stereoselektivnost u reakciji s kiralnim organofosfornim spojevima i kinuklidinskim esterima, koji se kovalentno vežu u katalitičko mjesto enzima. Razlika u brzini reakcije između enantiomera ovih spojeva i enzima posljedica je prostornog rasporeda radikala na kiralnom atomu fosfora odnosno ugljika i mogućnosti njihovog smještanja u aktivnom centru enzima. Enantiomer koji bolje pristaje u aktivni centar enzima brže reagira s enzimom nego enantiomer koji ne pristaje.^{23,30-32}

Ovom disertacijom željelo se utvrditi da li butirilkolinesteraze ljudi, miša i konja pokazuju stereoselektivnost prema enantiomerima etopropazina. Etopropazin je selektivni reverzibilni inhibitor BChE, koji stvara samo adicijske veze u aktivnom mjestu enzima. Dobiveni rezultati iskušani su različitim kinetičkim modelima enzimske hidrolize supstrata u prisutnosti etopropazina, te su izračunane katalitičke konstante hidrolize supstrata i konstante inhibicije. Modeli su iskušani i na rezultatima mjerenja pri raznim temperaturama kako bi se vidjelo da li pojedini model pristaje na svim mjerenim temperaturama. Kako bi se pojasnio mehanizam stereoselektivnosti inhibicije BChE enantiomerima etopropazina, eksperimentalno su korišteni mutanti mišje AChE kojima su promijenjene aminokiseline u aktivnome mjestu.

Da bi utvrdio stereoselektivnost kolinesteraza prema enantiomerima etopropazina, bilo je potrebno prethodno prirediti enatiomere etopropazina iz komercijalno dostupnog racemata, primjenom kiralne HPLC metode ili frakcijske kristalizacije. Enantiomerima je određena konfiguracija kiralnog centra odnosno apsolutna struktura primjenom metode cirkularnog dikroizma i NMR spektroskopije.

5.1 Etopropazin kao selektivni inhibitor BChE

U literaturi je opisano da je etopropazin selektivni inhibitor BChE, i da je AChE vrlo malo inhibirana s $20 \mu\text{mol dm}^{-3}$ etopropazinom. To je potvrđeno i u ovoj disertaciji. Ova selektivnost inhibicije posljedica je međusobnih razlika u građi aktivnog mjesta AChE i BChE odnosno razlika u aminokiselinama koje tvore aktivna mjesta ova dva enzima. AChE ima za $200 \text{ \AA}^3$ manje aktivno mjesto od BChE⁶⁰ budući da se kod BChE umjesto aromatskih aminokiselina AChE nalaze alifatske aminokiseline. Aromatske

aminokiseline AChE, tirozin 72, tirozin 124, triptofan 286, fenilalanin 295, fenilalanin 297 i tirozin 337, zamijenjuju odgovarajuće alifatske aminokiseline u strukturi ljudske BChE: asparagin 68, glutamin 119, alanin 277, leucin 286, valin 288 i alanin 328. Stoga proizlazi da je selektivnost inhibicije BChE etopropazinom isključivo posljedica steričkih razlika u veličini aktivnih mjesta ovih enzima odnosno etopropazin je prevelik da bi inhibirao AChE u aktivnom mjestu.

5.1.1 Inhibicija fenotipova ljudske BChE etopropazinom

Inhibicijom ljudske BChE u serumima različitih fenotipova utvrdili smo, da je uobičajeni fenotip BChE (UU-fenotip) t.j. koji sadrži samo uobičajenu BChE (U) gotovo potpuno inhibiran sa $20 \mu\text{mol dm}^{-3}$ etopropazinom dok su ostali fenotipovi bili manje inhibirani. Tako je atipična BChE (AA-fenotip) s mutacijom aspartata 70 u glicin kod koje je negativno nabijeni bočni lanac aspartata zamijenjen vodikom glicina, inhibirana svega 74%.²⁰ Glavna je uloga aspartata 70, smještenog na rubu aktivnog mjesta enzima, da sa svojim negativnim nabojem usmjerava pozitivno nabijenu molekulu supstrata u aktivno mjesto.^{11,12} Budući da kod AA-fenotipa nema na tom položaju negativno nabijenog bočnog lanca, afinitet enzima za pozitivno nabijen supstrat bitno je smanjen, što se očituje u smanjenoj aktivnosti. Također je afinitet za pozitivno nabijeni inhibitor smanjen u odnosu na afinitet UU-fenotipa BChE. Mutacija aspartat 70 glicin, osim što je smanjila afinitet AA-fenotipa za etopropazin, također je uzrokovala i nekompetitivni karakter inhibicije etopropazinom do $10,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ koncentracije supstrata ATCh (Slika 4.1).

5.2 Stereoselektivna inhibicija kolinesteraza enantiomerima etopropazina

5.2.1 Inhibicija mišje AChE, mutanata AChE i BChE etopropazinom

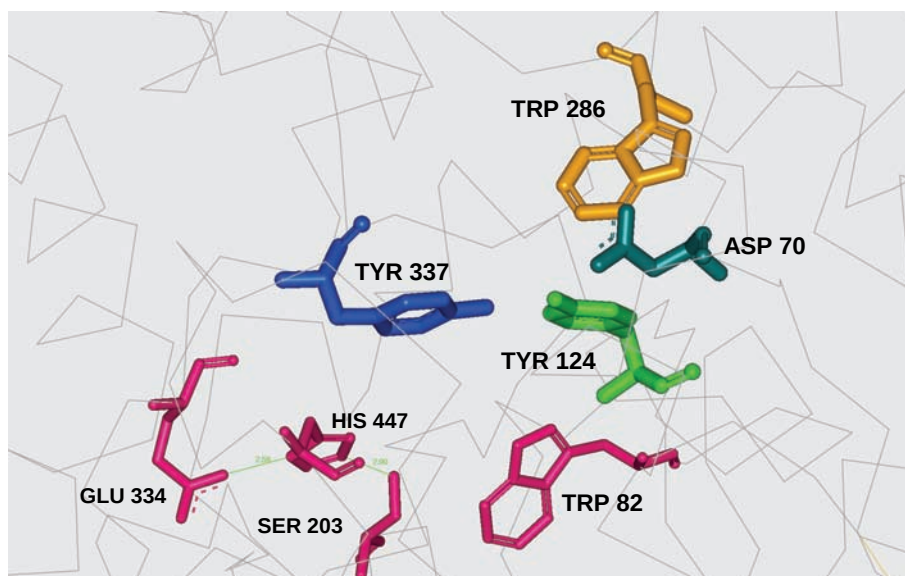
Kod mišje AChE afinitet za enantiomere i racemat etopropazina je puno manji nego afinitet mišje BChE (preko 1600 puta za racemat etopropazina). Sličnost u strukturi AChE čovjeka i miša očekuje se, budući da je AChE vitalan enzim u procesu prijenosa signala između neurona, te ima sačuvanu primarnu strukturu uz minimalne promjene u sastavu aminokiselina između vrsta. Ranije je spomenuto da etopropazin zbog veličine ne može ući u aktivno mjesto AChE pa možemo pretpostaviti da je glavna interakcija između etopropazina i AChE elektrostatsko privlačenje između negativno nabijenog asparagina 70 i kvatarnog dušika etopropazina (Slika 1.2). Ne začuđuje da

AChE ne pokazuje stereoselektivnost prema enantiomerima etopropazina, jer elektrostatske interakcije ne zahtijevaju strogo definirano prostorno uređenje već prostornu blizinu. Prema Ogstonovu načelu²³ do kiralnog prepoznavanja doći će onda kada jedan enantiomer ostvari tri komplementarne interakcije s drugom kiralnom molekulom, a drugi enantiomer zbog svojstva kiralnosti samo dvije. Uvođenje mutacija u aktivno mjesto AChE povećava veličinu samog aktivnog mjesta što vidimo kao porast afiniteta za etopropazin (enantiomere i racemat), te se pojavljuje i stereoselektivnost za etopropazin.

Mutacijom tirozina 337 u alanin povećan je afinitet za racemat etopropazina preko šesto puta, a afinitet za *R*-etopropazin bio je dvadeset puta veći nego za *S*-etopropazin. Ovom mutacijom postignut je najveći porast afiniteta u usporedbi na mutaciju tirozina 124 u glutamat ili triptofana 286 u alanin. Očito je da tirozin 337 sprečava ulazak etopropazina u aktivno mjesto AChE, a zamjenom fenolne skupine tirozina za manju metilnu skupinu alanina uklanja se sterička prepreka. Tako vezani etopropazin stvara izrazito stereoselektivne interakcije s enzimom, što rezultira najvećom razlikom afiniteta toga mutanta za enantiomere. I druge dvije mutacije povećavaju aktivno mjesto AChE zbog čega raste afinitet enzima za etopropazin, no bitna razlika koja se javlja s tim mutacijama je obrnuta stereoselektivnost.

Kada promatramo međusobni prostorni raspored tirozina 124, triptofana 286 i tirozina 337 u aktivnom mjestu AChE, vidljivo je da se triptofan 286 nalazi iznad tirozina 124, a tirozin 124 i 337 nalaze se u ravnini koja horizontalno dijeli aktivno mjesto enzima na približno dva jednaka dijela. Porast afiniteta AChE za *R*- i *S*-etopropazin prati položaj mutirane aminokiseline u aktivnome mjestu. Mutacija triptofana 286 u alanin, na rubu aktivnog mjesta, omogućuje etopropazinu dublji ulazak u aktivno mjesto do tirozina 124 i 337. Mutacija tirozina 337 u alanin uklanja steričku prepreku i etopropazin se može spustiti do triptofana 86. Triptofan 86 je bitan za stabilizaciju pozitivno nabijenih supstrata tijekom hidrolize, a u ovom slučaju stabilizira tročlani prsten etopropazina. Ovu činjenicu potkrepljuje molekulsko pristajanje (eng. *molecular docking*) *R*-etopropazina u aktivno mjesto ljudske BChE koji je načinio J. Stojan.⁵⁰ Rezultati pokazuju da mutacija tirozina 124 i 337 ima sličan učinak na porast afiniteta AChE divljeg tipa za *S*-etopropazin uz minimalnu razliku; K_i (Y337A)=1,9 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ i K_i (Y124Q)=2,0 $\mu\text{mol dm}^{-3}$.

Najveći afinitet za etopropazin (enantiomere i racemat) ipak pokazuje BChE uz smanjenu stereoselektivnost, što vodi na zaključak da povećanjem aktivnog mjesta etopropazin ostvaruje jače interakcije sa aminokiselinama u aktivnome mjestu, ali se gube kiralno specifične interakcije važne za kiralno prepoznavanje.



Slika 5.1 Kristalna struktura AChE miša (PDB 1MAH). Aminokiseline koje su promjenjene s ciljem povećanja aktivnog mjesta AChE su triptofan (TRP) 286, tirozin (TYR) 124 i 337. Triptofan 82 je moguće mjesto vezanja etopropazina na enzimu nakon supstituiranja tirozina 124 glutaminom ili 337. Katalitičku trijadu enzima čine serin 203, glutamat 334 i histidin 447.⁶¹

Iz pokusa inhibicije AChE, njenih mutanata i BChE enantiomerima etopropazina izmjerene su konstante disocijacije enzim-supstrat kompleksa (Tablica 4.4 i 4.14). Ove konstante prilično se dobro slažu kada promatramo njihove vrijednosti za određenu formu enzima. Značenje K_s konstante je to da ona predstavlja koncentraciju supstrata kod koje kompetiraju supstrat i inhibitor. Ukoliko se dva enantiomera, bilo svaki zasebno ili u racematu, vežu na isto mjesto unutar aktivnog mjesta enzima za očekivati je da će kompetirati sa supstratom na isti način. Kao rezultat takve inhibicije trebali bi izmjeriti u inhibiciji istu K_s bez obzira koju formu inhibitora primijenili, što je ovdje slučaj (Tablica 4.4). Ovaj rezultat potvrđuje da jednadžba 3.12 vrijedi i da se može primijeniti u opisu mehanizma reverzibilne inhibicije enzima enantiomerima.

5.2.2 Usporedba konstanata disocijacije K_D i K_I

Metoda gašenja triptofanske fluorescencije omogućila je neposredno mjerenje konstante disocijacije u reakciji etopropazina (enantiomeri i racemat) i AChE, njenih mutanata i BChE miša, te BChE konja. Konstante K_D izmjerene gašenjem fluorescencije (Tablica 4.16) na 23 °C prosječno su 2,3 puta niže vrijednosti od konstanti inhibicije K_I određene iz Hunter-Downs prikaza (Tablica 4.4, Slika 4.8) na 25 °C. Razlike u

konstantama K_I i K_D najvjerojatnije su posljedica primijenjenih metoda određivanja konstanti. Kada se uspoređi stereoselektivnost BChE miša i konja prema enantiomerima etopropazina smjer stereoselektivnosti ostao je nepromijenjen neovisno o metodi određivanja konstanti. Konstante K_D i K_I podudaraju su se u potpunosti (oko 2000 nmol dm⁻³) za tirozin 124 glutamin i tirozin 337 alanin mutante inhibirane S-etopropazinom. Najveća odstupanje u vrijednostima konstanta K_D i K_I dobivena je za tirozin 124 glutamin mutant za inhibiciju R-enantiomerom. No nju nije lako objasniti budući da se konstante disocijacije izmjerene za S-etopropazin za ovaj mutant jako dobro slažu. Razlika u stereoselektivnosti mutanata AChE prema enantiomerima etopropazina postoji kada usporedimo rezultate dobivene za tirozin 124 glutamin i tirozin 337 alanin mutant. Kako je spomenuto, ova dva mutanta pokazuju sličan afinitet za S-etopropazina stoga razlika u stereoselektivnosti potječe isključivo od razlike u afinitetima za R-etopropazin tj. različitih vrijednosti za konstantu disocijacije K_D ili K_I . Nemam objašnjenje za neslaganje konstanta K_D i K_I za R-etopropazin, određenih iz mjerenja na mutantu AChE tirozin 124 glutamin.

5.3 Kinetički modeli hidrolize supstrata i inhibicije

Da bi se dobilo što više informacija o mehanizmu enzimске hidrolize supstrata potrebno je primijeniti široki raspon koncentracija supstrata u kojem se mjeri enzimska aktivnost. Stoga sam primijenio metodu zaustavljenog protoka kojom se mogu takva mjerenja obavljati. Osim izmjerene enzimске aktivnosti dodatne informacije pruža nam i inhibitor koji također utječe na enzimsku aktivnost kompetirajući sa supstratom. Promjena temperature kod koje se mjeri aktivnost enzima može također dati dodatne informacije o kinetici hidrolize supstrata i inhibiciji.

Ovako izmjerene aktivnosti poslužile su u evaluaciji kinetičkih modela s ciljem pronalaženja onog koji će najprikladnije opisati mehanizam enzimске hidrolize supstrata i inhibicije BChE. Pomoću konstanta inhibicije enzima izračunanih za enantiomere izračunao sam konstantu za inhibiciju enzima racematom i na taj način dodatno provjerio valjanost modela.

5.3.1 Michaelis-Menten-in model

Mnogi su autori pokazali da ovaj model ne opisuje dobro mehanizam hidrolize supstrata, ako se aktivnost kolinesteraza prati u širem području koncentracije

supstrata.^{15-17,29,37,38,60-64} Ono što se prvo vidi nakon prilagodbe teoretskih krivulje na eksperimentalno izmjerene aktivnosti enzima, bez i uz prisutnost enantiomera ili racemata etopropazina, je to da točke koje predstavljaju aktivnost enzima u odsutnosti etopropazina više odstupaju od teoretske krivulje nego izmjerene aktivnosti u prisutnosti inhibitora (Slika 4.13). Odstupanje je takvo da se teoretska krivulja nalazi ispod eksperimentalno izmjerenih aktivnosti za koncentracije supstrata manje od $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$, a za više koncentracije supstrata krivulja je iznad točaka, ali postiže svoj maksimum kod maksimalno izmjerene aktivnosti. Kada se promatraju aktivnosti izmjerene u prisutnosti etopropazina uočava se bolje slaganje teoretskih krivulja sa ovim točkama.

Objašnjenje za ovakvo djelomično slaganje teoretskih krivulja i eksperimentalnih podataka je u tome što Michaelis-Menten-ina jednadžba je jednadžba hiperbole. Hiperbola je definirana sa žarištem i dvije međusobno okomite asimptote. Jedna od asimptota Michaelis-Menten hiperbole je maksimalna aktivnost enzima V_m izmjerena sa najvišom koncentracijom supstrata, a druga asimptota odgovara vrijednosti $-K_m$. Ovo je važno, jer se kod nižih koncentracija supstrata u računu dobiva i niža vrijednost za V_m odnosno asimptotu. Prilikom postupka prilagodbe teoretske krivulje na eksperimentalne točke računalni program traži najbolji par K_m i V_m , tako da V_m ne bude manji od maksimalno izmjerene aktivnosti i da krivulja počinje u ishodištu. Najbolja krivulja koja rezultira sa V_m , koji odgovara maksimalno izmjerenoj aktivnosti, je ona koja prolazi ispod i iznad eksperimentalnih točaka. Takvo rješenje ne znači da je enzim aktivniji kod koncentracija supstrata koje su po vrijednosti manje od K_m ili manje aktivan kod koncentracija supstrata većih od K_m . Radi se o tome da Michaelis-Menten-in model ne opisuje dovoljno dobro mehanizam enzimske hidrolize supstrata. Teoretska krivulja bolje opisuje eksperimentalne točke koje se odnose na hidrolizu supstrata u prisutnosti etopropazina, jer etopropazin tako djeluje na hidrolizu supstrata da nju možemo opisati hiperbolom. Porast koncentracije etopropazina prividno povećava K_m i snižava V_m . Usporedbom tako izračunanih K'_m konstanta i koncentracija etopropazina, I , dobiva se linearna ovisnost K'_m o I .

Konstante inhibicije za enantiomere i racemat K_i izračunane primjenom Michaelis-Menten-ina modela (Tablica 4.7) i one izračunane iz pokusa primjenom klasične spektrofotometrijske metode (jed 3.7, Tablica 4.4) dobro se slažu kao i vrijednosti dobivene za stereoselektivnost, iako su dobiveni iz različitih setova podataka. Važno je istaknuti, da iako ovaj kinetički model nije prikladan za opis enzimske aktivnosti, može se primijeniti za opis inhibicije. Također se u model može uključiti jed. 3.12, kojom inhibiciju enzima racematom možemo opisati pomoću

inhibicije enantiomerima, tako da konstantu K_i za racemat izrazimo pomoću konstanta K_i eksperimentalno određenih za enantiomere. Slaganje rezultata iz Tablica 4.4 i 4.7 bilo je očekivano jer su oni iz Tablice 4.4 izračunani pomoću jed. 3.7, što se vidi iz slijedećeg izvoda.

U jed. 3.4, koja definira prividnu konstantu inhibicije $K_{i,app}$, v_o je supstituirano sa Michaelis-Menten-inom jed. 1.3, a v_i sa jed. za kompetitivnu inhibiciju enzima 1.5, te se dolazi do izraza za jed. 3.7 (izvod u Prilogu).

$$\frac{K_i}{K_m} \cdot S + K_i = K_{i,app} \quad (3.7)$$

U jednadžbi 3.7 u poglavlju 3 ove disertacije umjesto K_m napisano je $K_{(S)}$ budući da se često K_m izračunan iz enzimске hidrolize supstrata ne podudara s onim izračunanim iz inhibicije.

5.3.2 Webb-ov model

Webb-ov model za razliku od Michaelis-Menten-ina modela predviđa vezanje dvije molekula supstrata na molekulu enzima i to u aktivno i periferno mjesto. Ovim modelom moguće je opisati inhibiciju enzima supstratom pri višim koncentracijama supstrata, što je slučaj kod AChE, ili „aktivaciju” enzimске hidrolize supstrata kod BChE također pri višim koncentracijama supstrata. Vrijednost parametra b u jednadžbi aktivnosti izvedenoj iz Webb-ova modela ukazuje na aktivaciju ili inhibiciju. Kada je b manji od jedan supstrat inhibira enzimsku aktivnost, a kada je b veći od jedan supstrat aktivira enzimsku aktivnost. Već je spomenuto u uvodu disertacije da ako je b jednak jedinici Webb-ova jednadžba prelazi u Michaelis-Menten-inu jednadžbu.

Prilagodba Webb-ove jed. na eksperimentalne točke vidljivo je bolja nego Michaelis-Menten-ine jednadžbe uz manju vrijednost sume kvadrata odstupanja za danu temperaturu (Tablica 4.8; Slika 4.14). Također ovaj model omogućuje izmjeriti konstante disocijacije enzim-supstrat kompleksa u aktivnome mjestu enzima K_S i u perifernome mjestu enzima K_{SS} . Vrijednosti ovih konstanta razlikuju se od K_m budući da ne predstavljaju isti korak u mehanizmu hidrolize supstrata, a vrijednost konstante K_m nalazi se između vrijednosti konstanta K_S i K_{SS} . Istu pojavu moguće je zamijetiti prilikom usporedbe K_S konstanta, iz pokusa inhibicije BChE konjskog seruma enantiomerima etopropazina (Tablica 4.4), sa vrijednostima K_S i K_{SS} konstanta izračunanim iz pokusa mjerenja pS-krivulja.

Analogno veznim mjestima enzima za supstrat predvidio sam u Webb-ovom modelu također dva mjesta vezanja na enzimu za inhibitor, etopropazin. Konstante

inhibicije K_i^A i K_i^P , izračunane ovim modelom, slično konstantama za supstrat K_S i K_{SS} , niže su, odnosno više su po vrijednostima od konstanta K_i izračunanih primjenom Michaelis-Menten-ina modela. Ova rješenja su prihvatljiva jer se slične vrijednosti konstanta dobivaju u pokusima inhibicije mutanata AChE etopropazinom (Tablica 4.14) i gašenja triptofanske fluorescencije (Tablica 4.16). Pa je tako za AChE mutant triptofan 286 alanin dobivena konstanta inhibicije u mikromolarnom iznosu koja predstavlja afinitet enzima na perifernom mjestu vezanja inhibitora. Disocijacijske konstante K_D iz pokusa gašenja triptofanske fluorescencije niže su po vrijednosti od onih izračunanih iz pokusa inhibicije hidrolize supstrata primjenom Hunter-Downs jednadžbe (jed. 3.7) ili Michaelis-Menten-ina modela. Konstante $K_D = 71 \text{ nmol dm}^{-3}$ za R- i $K_D = 149 \text{ nmol dm}^{-3}$ za S-etopropazin slažu se sa odgovarajućim vrijednostima konstanta izračunanih Webb-ovim modelom na 20°C $K_i^A = 52$ i 118 nmol dm^{-3} (Tablica 4.8), uz praktički istu stereoselektivnost odnosno dva puta veći afinitet enzima za R-etopropazin.

Kako ovim modelom nije bilo moguće odrediti periferni afinitet enzima za etopropazin K_i^P na svim temperaturama izmijenio sam model na takav način da sam uklonio reakciju vezanja etopropazina na periferno mjesto na enzimu (Webb-2). Druga izmjena modela bila je izjednačavanje afiniteta enzima za vezanje etopropazina na aktivno i periferno mjesto na enzimu, $K_i^A = K_i^P$ (Webb-3).

Ukidanje K_i^P konstante u Webb-ovom modelu imalo je minimalni učinak na vrijednosti ostalih kinetičkih konstanta (Tablica 4.9) te oba modela (Webb-1 i Webb-2) rezultiraju sa gotovo istim sumama kvadrata odstupanja. Usporedbom slika 4.14 i 4.15 također vidimo da su teoretske krivulje ova dva modela gotovo jednako prilagođene eksperimentalnim podacima. Za oba modela krivulja koja opisuje aktivnost enzima u odsutnosti etopropazina prolazi ispod točaka za koncentracije supstrata ATCh veće od 2 mmol dm^{-3} te završava u točki koja odgovara aktivnosti izmjerenoj pri 75 mmol dm^{-3} ATCh.

Uvrštavanjem jednadžbe aktivnosti koja proizlazi iz Webb-1 modela u jed. 3.7 dobiva se isti rezultat kao i kod uvrštavanja Michaelis-Menten-ine jednadžbe u jed. 3.7. To je stoga što se sume koje u sebi sadrže K_{SS} konstantu međusobno pokrate u dvojnim razlomcima.

$$\frac{v_o}{v_i} = \frac{V_m / (1 + K_S / S)}{V_m / (1 + K_S (1 + I/K_i) / S)} \cdot \frac{(1 + b \cdot S/K_{SS}) / (1 + S/K_{SS})}{(1 + b \cdot S/K_{SS}) / (1 + S/K_{SS})} \quad (5.1)$$

Uređivanjem razlomaka te kraćenjem V_m i brojnika i nazivnika u drugom razlomku dobiva se izraz

$$\frac{v_o}{v_i} = \frac{1/(1 + K_s / S)}{1/(1 + K_s(1 + I/K_i) / S)} = \frac{1 + K_s(1 + I/K_i) / S}{1 + K_s / S} \quad (5.2)$$

Uvrštavanjem razlomka v_o/v_i u jed. 3.5 dobiva se izraz jednak jed. 7.58 (Prilog) s tom razlikom da sada umjesto konstante K_m stoji konstanta K_s

$$\frac{1 + K_s \cdot (1 + I / K_i) / S}{1 + K_s / S} = \frac{I}{K_{i,app}} + 1 \quad (5.3)$$

te je konačna jednadžba istovjetna jed. 3.7. Ovaj rezultat potvrđuje pretpostavku u modelu da za određivanje konstante inhibicije enzima u aktivnome mjestu nije važno periferno mjesto vezanja supstrata. To je logično budući da konstantu inhibicije K_i određujemo klasičnom spektrofotometrijskom metodom ekstrapolacijom prividne konstante inhibicije $K_{i,app}$ na nultu koncentraciju supstrata (odsječak na ordinati u Hunter-Downs prikazu). K_i se eksperimentalno određuje mjerenjem enzimске aktivnosti u odsutnosti i prisutnosti inhibitora kod koncentracija supstrata u području vrijednosti K_m odnosno K_s konstante, evaluirane iz Hunter-Downs prikaza (jed. 3.7). Jedan od nedostataka primjene Hunter-Downs prikaza je taj što vrijednosti $K_{i,app}$ kod viših koncentracija supstrata, iznad K_s , odstupaju od linearnosti stvarajući krivulju koja raste s porastom koncentracije supstrata, te je onemogućena ekstrapolaciju na nultu koncentraciju supstrata. Razlika u intervalu primijenjenih koncentracija supstrata rezultira razlikom u vrijednosti $K_{(s)}$ konstanta dobivenih iz Hunter-Downs prikaza (Tablica 4.4) i iz prilagodbe jednadžbe aktivnosti jed. 1.12 (Tablica 4.9; Webb-2 model) za BChE konjskog seruma.

Izjednačavanje konstanta K_I^A i K_I^P u Webb-3 modelu rezultiralo je povećanjem vrijednosti K_I^A konstante kako za racemat tako i za enantiomere. Ako te vrijednosti usporedimo s onima izračunanim iz Michaelis-Menten-ina modela onda je to povećanje više nego dvostruko. Iako su se pojedinačne vrijednosti K_I^A konstanta veće to praktički nije imalo nikakvog utjecaja na stereoselektivnost (Tablica 4.9 i 4.10). Izjednačavanje konstanta K_I^A i K_I^P bitno je promijenilo konstante koje se odnose na enzimsku hidrolizu supstrata pa je vrijednost parametra b više nego dvostruko veća na 25 i 37 °C. Vrijednosti parametara b također su utjecale na pad vrijednosti konstanta k_{cat} budući da maksimalnu aktivnost enzima predstavlja produkt $b \cdot k_{cat}$. Vrijednosti konstanta K_s i K_{ss} niže su od onih izračunanih modelima Webb-1 i Webb-2. Prilagodba teoretske krivulje eksperimentalnim podacima najviše se razlikuje za aktivnost enzima u odsutnosti etopropazina od odgovarajućih krivulja Webb-1 i Webb-2 modela. Po svojem obliku sličnija je hiperboli s time da prolazi ispod točaka koje odgovaraju aktivnostima

izmjerjenima u rasponu koncentracije supstrata ATCh od 0,1 do 1,0 mmol dm⁻³. Ovo odstupanje utječe na povećanje sume kvadrata odstupanja.

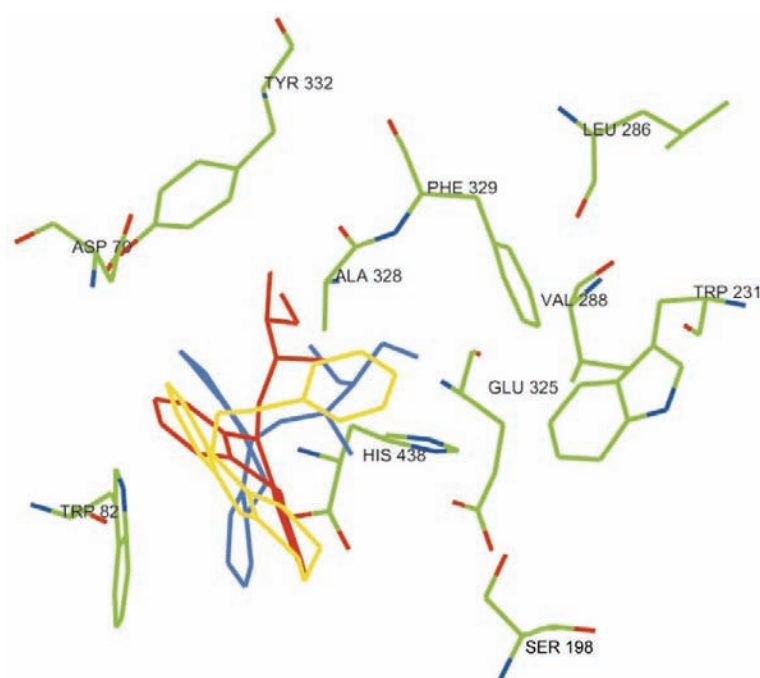
5.3.3 Stojan-Fournier-ovi kinetički modeli

6-parametarski model

J. Stojan i D. Fournier predložili su nekoliko kinetičkih modela koji opisuju enzimsku hidrolizu supstrata ATCh.³²⁻³⁴ Model koji sam koristio u ovoj disertaciji karakterizira šest kinetičkih parametara koji na složeniji, ali i bolji način opisuje mehanizam hidrolize supstrata i inhibicije nego što to čine Webbov ili Michaelis-Mentenin model. To potvrđuje suma kvadrata odstupanja te slika 4.18. Na slici se vidi da teoretska krivulja bolje opisuje eksperimentalne točke, a najveće poboljšanje je kod točaka koje se odnose na enzimsku aktivnost u odsustvu inhibitora, etopropazina. Rezultati dobiveni primjenom ovog modela nisu u potpunosti usporedivi s rezultatima prije opisanih modela. Konstante koje možemo uspoređivati s Webb-ovim modelom su k_{cat} i parametar b te konstante koje se odnose na inhibiciju etopropazinom, jer opisuju disocijaciju istovrsnih enzim-inhibitor kompleksa K_1^A i K_1^P . Vrijednosti parametra b dobro se slažu između Webb-ova (1,65 – 1,97) i šest parametarskog modela (1,16 – 2,25) uz prosječno odstupanje od 2%. Vrijednosti konstanta k_{cat} , ova dva modela, također se podudaraju na istoj temperaturi uz jednoliki porast s porastom temperature. Razlika između dva modela uočava se usporedbom disocijacijskih konstanta za periferno vezanu molekulu supstrata K_1 , odnosno K_2 s K_{ss} . Konstante K_1 i K_2 nižih su vrijednosti od konstante K_{ss} na istoj temperaturi sugerirajući tako da veći periferni afinitet enzima za supstrat prema Stojan-Fournier modelu. Stojan i Fournier tumače kinetička svojstva AChE kao posljedicu vezanja molekule supstrata na visokoafinitetno periferno mjesto na enzimu. Periferno vezani supstrat mijenja brzinu aciliranja i deaciliranja serina katalitičke trijade enzima putem konformacijskih promjena u aktivnome mjestu enzima i steričkom blokadom aktivnoga mjesta.^{39,50,58} Parametri a i b opisuju utjecaj periferno vezanog supstrata na aktivnost. Tako $a < 1$ znači da supstrat usporava aciliranje serina, tj. smanjuje ukupnu aktivnost. Suprotno tome ako je parametar b veći od 1, znači da enzim brže stvara finalni produkt enzimske reakcije, octenu kiselinu. Ovisno o ravnoteži između pojedinih kompleksa enzima i supstrata, koju kontrolira supstrat u suvišku prema enzimu, ovisi ukupna enzimska aktivnost kao posljedica usporenja aciliranja serina i ubrzanja sinteze finalnog produkta.

5-parametarski model

Budući da je mala razlika u vrijednostima konstanta K_1 i K_2 na danim temperaturama, može se smatrati da je utjecaj acetiliranog serina na afinitet enzima za periferno vezanje supstrata minimalan. Vođen ovom činjenicom primijenio sam inačicu šest parametarskog modela u kojem sam izjednačio afinitete za periferno vezanje supstrata na enzim $K_1 = K_2$. U Webb-ovom modelu proveo sam slično izjednačenje s tom razlikom da se tada radi o perifernom vezanju supstrata na slobodni enzim ili enzim-supstrat kompleks sa supstratom u aktivnome mjestu enzima. Supstitucijom jednog parametra u modelu drugim dobiva se pet parametarski model. Već je spomenuto da su razlike između konstanta K_1 i K_2 bile male pa supstitucija nije bitno utjecala na vrijednost ostalih konstanta u modelu. Općenito gledajući pet parametarski model rezultira najboljom prilagodbom teoretske krivulje na eksperimentalne podatke uz najmanje sume kvadrata odstupanja. Rezultati koji se odnose na inhibiciju enzima etopropazinom (enantiomeri i racemat) pokazuju da je veći periferni afinitet enzima za etopropazin nego onaj u aktivnome mjestu, kada usporedimo vrijednosti za konstante inhibicije s onima izračunanim iz Webb-ovog modela. Ovaj rezultat može se usporediti s rezultatom prema kojem je periferni afinitet enzima za supstrat veći prema Stojan-Fournier modelu nego prema Webb-ovom modelu. Općenito modeli mogu producirati različita rješenja jer se temelje na različitim pretpostavkama vezanima uz reakciju enzima sa supstratom. Ovdje valja napomenuti da se stvarno mjesto perifernog vezanja supstrata na enzimu i mjesto perifernog vezanja inhibitora mogu razlikovati s obzirom na aminokiseline aktivnoga mjesta koje stvaraju interakcije sa supstratom odnosno inhibitorom. Kristalna struktura takvog tercijarnog kompleksa enzim-supstrat-inhibitor dala bi stvarni uvid u mjesto kompeticije supstrata i inhibitora. Pa tako razlika u afinitetima enzima za inhibitor u aktivnome i perifernome mjestu koja proizlazi primjenom ovog modela nije u suprotnosti s rezultatima dobivenima gašenjem fluorescencije, jer ta metoda ne može razlikovati vezanje u aktivno ili periferno mjesto na enzimu. Rezultat gašenja fluorescencije daje afinitet nekog spoja za enzim, ali nije moguće znati točno mjesto vezanja. Pokazalo se da stereoselektivnost kolinesteraza prema enantiomerima etopropazina ne ovisi o primijenjenom modelu ili metodi mjerenja afiniteta.

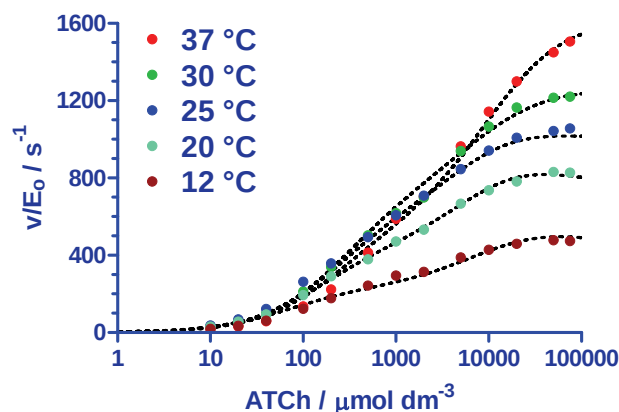


Slika 5.2 Molekulsko pristajanje enantiomera etopropazina u aktivno mjesto ljudske BChE. *R*-etopropazin (plav) superponiran na takrin (žut) te je provedena minimizacija strukture etopropazina (crven). Model ljudske BChE načinio je J. Stojan po homologiji prema *DmAChE*. Slika preuzeta iz *Ref. 50*.

5.4 Proširenje modela sa 7 parametra sa parametrom temperature

Temperatura može znatno utjecati na pojedine konstante brzine i ravnotežne konstante u složenom mehanizmu interakcije enzima, supstrata i inhibitora.^{15,65} Da bi se dodatno provjerio kinetički model izveo sam pokuse inhibicije reakcije kolinesteraze sa supstratom pri raznim temperaturama. To mi je omogućilo da uvedem temperaturu kao dodatni parametar u model, supstitucijom konstanti brzina reakcije sa Arrhenius-ovom jednačbom odnosno Gibbs-ovom jed. za entalpiju i entropiju aktivacije i supstitucijom konstanti ravnoteže sa Gibbs-ovom jednačbom. Ovaj pristup omogućuje primjenu modela na veći set eksperimentalnih podataka što čini račun kinetičkih konstanti pouzdanijim. Proširenjem Stojan-Fournier modela sa 7 parametara za hidrolizu supstrata i dva parametra za inhibiciju supstitucijom odgovarajućih konstanti sa Gibbs-ovim jednačbama ukupan broj parametara u modelu se udvostručio ali se također model može tako primijeniti na peterostruko više eksperimentalnih podataka (pet temperatura). Ovo je važno budući da se tako kvaliteta prilagodbe teoretske krivulje na eksperimentalne podatke ne smanjuje. Suma kvadrata odstupanja je veća nego na pojedinoj temperaturi primjenom istog modela u analizi početnih aktivnosti. To je s toga što se sada suma kvadrata odstupanja računa umjesto iz 177 eksperimentalnih točaka iz 855 (5×177) točaka. Rezultat koji se dobije primjenom ovako izmijenjenog 7-parametarskog modela je niz entalpija i entropija za odgovarajuće konstante. Moguće je dobiti više realnih rješenja koje valja provjeriti uspoređujući konstante brzine i reverzibilne konstante izračunane iz odgovarajućih entalpija i entropija s onima izračunanim pomoću 7-parametarskog modela na danoj temperaturi. Uočeno je slaganje među konstantama za supstrat tako da se dobiveno rješenje može prihvatiti, te treba napomenuti da je slabije podudaranje među konstantama koje se odnose na inhibiciju. Kada se uspoređuju eksperimentalno izmjerene aktivnosti enzima s koncentracijama supstrata ATCh manjima od $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ na različitim temperaturama vidljivo je da su aktivnosti izmjerene na $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ više od aktivnosti izmjerenih na ostalim temperaturama (Slika 5.3). Najmanje izmjerene aktivnosti su one na 12 i $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ do $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ koncentracije supstrata. Teoretske krivulje odstupaju od eksperimentalnih točaka za koncentracije supstrata niže od $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Odstupanja teoretske krivulje od eksperimentalnih točaka ukazuju da Stojan-Fournier kinetički model sa 7 parametara za hidrolizu supstrata i dva parametra za inhibiciju treba unaprijediti kako bi se i ovakve promjene u aktivnosti enzima mogle opisati modelom.



Slika 5.3 Hidroliza supstrata ATCh s BChE konjskog seruma pri različitim temperaturama. Na slici su izdvojene aktivnosti izmjerene bez prisutnog inhibitora etopropazina. Analiza početnih aktivnosti izmjerenih pri 12, 20, 25, 30 i 37 °C provedena je sa Stojan-Fournier modelom sa 7 parametara za hidrolizu supstrata i dva parametra za inhibiciju enzima. U jed. 1. 19 konstante brzine reakcije k_3 , $b \cdot k_3$, k_2 i $a \cdot k_2$, te ravnotežne konstante K_P , K_L , K_{LL} , $K_{I,P}$ i $K_{I,L}$ supstituirane s jed. 7.48–7.56. Teoretska krivulja istovremeno je prilagođavana enzimskim aktivnostima izmjerenima u prisutnosti i odsutnosti enantiomera i racemata etopropazina.

6. ZAKLJUČCI

1. Odijeljeni su enantiomeri etopropazina, visoke enantiomerne čistoće ($ev > 97\%$), iz racemata primjenom frakcijske kristalizacije i stereoselektivne tekućinske kromatografije. Enantiomerima je određena apsolutna konfiguracija kiralnog centra.
2. Sukladnost teoretskih jednadžbi, izvedenih iz sedam kinetičkih modela koji opisuju reakciju enzima sa supstratom i inhibitorom, iskušana je na aktivnostima butirilkolinesteraze konja prema acetiltiokolinu u odsutnosti i prisutnosti enantiomera i racemata etopropazina. Mjerenja spektrofotometrijskom metodom zaustavljenog protoka provedena su na temperaturama od 12 do 37 °C. Modeli su se razlikovali prema broju katalitičkih konstanti kojima opisuju reakciju enzima sa supstratom i inhibitorom. Konstante u modelu računane su objedinjenim postupkom pronalaženja najboljeg pristajanja teoretskih jednadžbi i eksperimentalnih točaka. Konstante za reakciju enzima sa supstratom i inhibitorom, praćenu klasičnom spektrometrijskom metodom, izračunane su i primjenom Hunter-Downs-ove i Cauet-ove jednadžbe.
3. Modeli Michaelis-Menten i Webb-3 rezultirali su sa najvećim sumama kvadrata odstupanja teoretske krivulje od eksperimentalnih točaka.
Modeli Webb-1 i Webb-2 rezultirali su sa nižim i međusobno sličnim sumama kvadrata odstupanja od eksperimentalnih točaka.
Stojan-Fournier-ovi modeli (5, 6 i 7 parametara) općenito su rezultirali sa najmanjim sumama, koje se međusobno malo razlikuju. Mehanizmi koji pretpostavljaju ova tri modela temelje se na kristalografskim strukturama kompleksa enzima i supstrata nedavno opisanim u literaturi.
4. Katalitičke konstante, k_{cat} , izračunane iz svih sedam modela dobro se slažu, pa na 25 °C srednja vrijednost konstante iznosi $1097 \pm 20 \text{ s}^{-1}$.

5. Iz svih modela i na svim temperaturama proizlazi da je konstanta disocijacije *S*-etopropazina za butirilkolinesterazu konja oko 2,5 puta veća nego konstanta za *R*-enantiomer. Konstante disocijacije kompleksa enzima i *S*-etopropazina, izračunane iz svih sedam modela na 25 °C, bez obzira na pretpostavljene vrste kompleksa kreću se od 73 do 612 nmol dm⁻³, a odgovarajuće konstante za *R*-enantiomer od 36 do 315 nmol dm⁻³. Pokazano je da se kinetičke konstante inhibiciju enzima racematom mogu s velikom točnošću izračunati pomoću konstanti određenih za inhibiciju enantiomerima.
6. Inhibicija mutanata rekombinantne acetilkolinesteraze miša pokazala je da se promjenom strukture aktivnog mjesta stereoselektivnost za etopropazin može povećati (Y337A) ili biti inverzna (Y124Q, W286A) u odnosu na stereoselektivnost utvrđenu za butirilkolinesterazu konja. Racemat etopropazina dobar je inhibitor butirilkolinesteraze čovjeka ($K_i = 0,160 \mu\text{mol dm}^{-3}$) i miša ($K_i = 0,082 \mu\text{mol dm}^{-3}$), a slabi inhibitor acetilkolinesteraze čovjeka ($K_i = 161 \mu\text{mol dm}^{-3}$) odnosno miša ($K_i = 132 \mu\text{mol dm}^{-3}$), koja ne pokazuje stereoselektivnost prema enantiomerima.
7. Konstante disocijacije za enzim-etopropazin kompleks (K_D), dobivene neposrednim mjerenjem vezanja *R*- i *S*-enantiomera etopropazina na butirilkolinesterazu konjskog seruma metodom gašenja fluorescencije iznose 79 odnosno 149 nmol dm⁻³. Konstante K_D niže su od onih dobivenih klasičnom spektrofotometrijskom metodom za *R*- ($K_i = 147 \text{ nmol dm}^{-3}$) i *S*-etopropazin ($K_i = 352 \text{ nmol dm}^{-3}$), ali ulaze u raspon vrijednosti konstanta dobivenih iz modela. Bez obzira na razlike u vrijednostima odgovarajućih konstanta, stereoselektivnost kolinesterazâ utvrđena metodom gašenja fluorescencije slaže se s onom određenom metodom mjerenja inhibicije u prisutnosti supstrata.

7. PRILOG

7.1. Izvod jednadžbe za enzimsku aktivnost po Webb-u

Iz Webb-ovog modela (Slika 1.9) izvodi se jednadžba za enzimsku aktivnost v kao sumu brzina nastajanja produkata P

$$v = k_3 \cdot ES + b \cdot k_3 \cdot SES \quad (7.1)$$

Model pretpostavlja ravnotežu između ES i SES kompleksa, te se koncentracija SES kompleksa može supstituirati sa konstantom ravnoteže između ova dva kompleksa

$$K_{ss} = \frac{S \cdot ES}{SES} \quad (7.2)$$

$$v = k_3 \cdot ES + b \cdot k_3 \cdot \frac{S \cdot ES}{K_{ss}} = k_3 \cdot ES \cdot \left(1 + b \cdot \frac{S}{K_{ss}}\right) \quad (7.3)$$

Diferencijalna jednadžbu promjene koncentracije ES kompleksa u vremenu t uzima u obzir brzine nastajanja i raspadanja ES kompleksa. Kompleks ES nastaje u reakciji slobodnog enzima sa supstratom te disocijacijom supstrata sa SES kompleksa, dok se ES kompleks može raspasti disocijacijom supstrata, enzimskom pretvorbom supstrata u produkt P ili sintezom SES kompleksa vezanjem druge molekule supstrata.

$$\frac{\partial ES}{\partial t} = k_{+1} \cdot E \cdot S - k_{-1} \cdot ES - k_3 \cdot ES - k_{+2} \cdot SE \cdot S + k_{-2} \cdot SES \quad (7.4)$$

Pretpostavljajući stacionarno stanje, odnosno tijekom reakcije enzima i supstrata koncentracija ES kompleksa je stalna, diferencijalnu jed. možemo izjednačiti s nulom

$$\frac{\partial ES}{\partial t} = 0 \quad (7.5)$$

te izraziti koncentraciju ES kompleksa

$$ES = \frac{k_{+1} E \cdot S}{k_{-1} + k_3} - k_{+2} SE \cdot S + k_{-2} \frac{SE \cdot S}{k_{-2} / k_{+2}} = \frac{k_{+1}}{k_{-1} + k_3} \cdot E \cdot S \quad (7.6)$$

Kompleks ES također može reagirati sa drugom molekulom supstrata uz nastajanje tercijarnog SES kompleksa. Prema modelu slobodni enzim može vezati supstrat osim u aktivno mjesto (ES kompleks) i na periferno mjesto stvarajući SE kompleks. Potrebno je izraziti ukupnu koncentraciju enzima kao sumu svih specija koje stvara enzim tijekom reakcije

$$E_0 = E + SE + ES + SES \quad (7.7)$$

Ako koncentracije kompleksa ES i SES supstituiramo sa izrazima za konstantu ravnoteže dobiva se slični izraz za ukupnu koncentraciju enzima

$$E_o = E \cdot \left(1 + \frac{S}{K_{ss}}\right) + ES \cdot \left(1 + \frac{S}{K_{ss}}\right) \quad (7.8)$$

Odnosno za koncentraciju slobodnog enzima

$$E = \frac{E_o}{\left(1 + S / K_{ss}\right)} - ES \quad (7.9)$$

Izraz za koncentraciju slobodnog enzima uvrštava se u izraz za koncentraciju ES kompleksa u ravnoteži sa slobodnim enzimom E

$$ES = \frac{E \cdot S}{K_s} \Rightarrow ES = \frac{S}{K_s} \cdot \left(\frac{E_o}{1 + S/K_{ss}} - ES \right) \quad (7.10)$$

Izlučivanjem koncentracije ES kompleksa na lijevoj strani izraza dobiva se

$$ES = \frac{1}{1 + K_s / S} \cdot \frac{E_o}{1 + S/K_{ss}} \quad (7.11)$$

Uvrštavanjem izraza za ES u jed. 7.3 i supstitucijom produkta $E_o \cdot k_3$ sa V_m dobivamo jednadžbu za enzimsku aktivnost prema Webb-ovom modelu

$$v = \frac{V_m}{(1 + K_s / S)} \cdot \frac{(1 + b \cdot S/K_{ss})}{(1 + S/K_{ss})} \quad (1.10)$$

Izvod jednadžbe za inhibiciju enzimске aktivnosti

Iz modela za kompetitivnu inhibiciju u aktivnome i perifernome mjestu vezanja supstrata na enzim (Webb-2 model, Slika 1.10) izvodi se slijedeća jed. za ukupnu koncentraciju enzima

$$E_o = E + EI + ES + SES + IES \quad (7.12)$$

Supstitucijom EI, SES i IES kompleksa sa odgovarajućim izrazima za ravnotežu sa slobodnim enzimom E i ES kompleksom dobiva se slijedeći izraz

$$E_o = E \cdot \left(1 + \frac{I}{K_I^A}\right) + ES \cdot \left(1 + \frac{S}{K_{ss}} + \frac{I}{K_I^P}\right) \quad (7.13)$$

Iz jed. 7.13 izlučimo koncentraciju slobodnog enzima E na lijevu stranu jednakosti

$$E = \left[E_o - ES \cdot \left(1 + \frac{S}{K_{ss}} + \frac{I}{K_I^P}\right) \right] / \left(1 + \frac{I}{K_I^A}\right) \quad (7.14)$$

Izraz 7.14 uvrstimo u jed. za ravnotežu između E i ES kompleksa, analogno jed. 7.10

$$ES = \frac{E_o}{K_s (1 + I/K_I^A) / S + (1 + S/K_{ss} + I/K_I^P)} \quad (7.15)$$

Supstitucijom koncentracije ES kompleksa u jed. 7.3 sa navedenim izrazom daje jednadžbu aktivnosti enzima u prisutnosti inhibitora

$$v = \frac{V_m \cdot (1 + b \cdot S/K_{ss})}{K_s(1 + I/K_i^A) / S + (1 + S/K_{ss} + I/K_i^P)} \quad (1.12)$$

7.2. Izvod jednadžbe za enzimsku aktivnost prema Stojan-Fournier modelu

7.2.1 Model sa 6 parametara

Iz modela sa 6 parametara (Slika 1.12) izvodi se slijedeća jed. za enzimsku aktivnost v

$$v = k_3 \cdot EA + b \cdot k_3 \cdot SEA \quad (7.16)$$

$$v = k_3 \cdot EA \cdot \left(1 + b \frac{S}{K_2}\right) \quad (7.17)$$

Ukupna koncentracija enzima jednaka je

$$E_0 = E + EA + SE + SEA \quad (7.18)$$

Koncentracije kompleksa SE i SEA mogu se supstituirati sa odgovarajućim izrazima za konstantu disocijacije

$$E_0 = E \cdot \left(1 + \frac{S}{K_1}\right) + EA \cdot \left(1 + \frac{S}{K_2}\right) \quad (7.19)$$

Koncentracija slobodnog enzima jednaka je

$$E = \left[E_0 - EA \cdot \left(1 + \frac{S}{K_2}\right) \right] / \left(1 + \frac{S}{K_1}\right) \quad (7.20)$$

Diferencijalna jed. promjene EA kompleksa i s njime ravnotežnog SEA kompleksa u vremenu t glasi

$$\frac{\partial EA}{\partial t} = k_2 E \cdot S + a k_2 S \cdot SE - k_3 EA - b k_3 SEA = 0 \quad (7.21)$$

Kada se koncentracija kompleksa SEA supstituira sa jednadžbom ravnoteže i izluči na lijevoj strani jednakosti EA dobiva se izraz

$$k_2 E \cdot S \cdot \left(1 + a \frac{S}{K_1}\right) - k_3 EA \left(1 + b \frac{S}{K_2}\right) = 0 \quad (7.22)$$

$$EA = E \cdot S \cdot k_2 \left(1 + a \frac{S}{K_1}\right) / k_3 \left(1 + b \frac{S}{K_2}\right) \quad (7.23)$$

U izraz 7.23 uvrsti se izraz 7.20 za koncentraciju slobodnog enzima E

$$EA = \left[S \cdot k_2 \left(1 + a \frac{S}{K_1} \right) / k_3 \left(1 + b \frac{S}{K_2} \right) \right] \cdot \left[E_0 - EA \cdot \left(1 + \frac{S}{K_2} \right) \right] / \left(1 + \frac{S}{K_1} \right) \quad (7.24)$$

$$EA = \frac{E_0}{\frac{k_3(1 + bS/K_2)}{S \cdot k_2(1 + aS/K_1)} \cdot \left(1 + \frac{S}{K_1} \right) + \left(1 + \frac{S}{K_2} \right)} \quad (7.25)$$

Uvrštavanjem izraza 7.25 u jed. aktivnosti 7.17 dobiva se izraz za aktivnost enzima

$$v = \frac{k_3 \cdot E_0 \cdot \left(1 + b \frac{S}{K_2} \right)}{\frac{k_3(1 + bS/K_2)}{Sk_2(1 + aS/K_1)} \left(1 + \frac{S}{K_1} \right) + \left(1 + \frac{S}{K_2} \right)} \quad (7.26)$$

Množenjem brojnika i nazivnika sa koncentracijom supstrata S, te dijeljenjem sa $(1 + bS/K_2)$ dobiva se jed. 1.15

$$v = \frac{E_0 k_3 S}{k_3(1 + S/K_1) / [k_2(1 + a \cdot S/K_1)] + S(1 + S/K_2) / (1 + b \cdot S/K_2)} \quad (1.15)$$

Izvod jednadžbe za inhibiciju enzimske aktivnosti

Da bi se dobila jed. za aktivnost enzima u prisutnosti inhibitora prema Slici 1.13 potrebno je napisati izraz za ukupnu koncentraciju enzima

$$E_0 = E + EI + EA + IEA + SE + SEA \quad (7.27)$$

Supstitucijom koncentracija kompleksa SE, EI, IEA, i SEA sa izrazima za ravnotežu sa slobodnim enzimom E odnosno EA kompleksom

$$E_0 = E \cdot \left(1 + \frac{S}{K_1} + \frac{I}{K_1^A} \right) + EA \cdot \left(1 + \frac{S}{K_2} + \frac{I}{K_1^P} \right) \quad (7.28)$$

Koncentracija slobodnog enzima iznosi

$$E = \left[E_0 - EA \cdot \left(1 + \frac{S}{K_2} + \frac{I}{K_1^P} \right) \right] / \left(1 + \frac{S}{K_1} + \frac{I}{K_1^A} \right) \quad (7.29)$$

Uvrštavanjem izraza 7.29 u jed. 7.23 dobiva se

$$EA = \left[Sk_2 \left(1 + a \frac{S}{K_1} \right) / k_3 \left(1 + b \frac{S}{K_2} \right) \right] \cdot \left[E_0 - EA \left(1 + \frac{S}{K_2} + \frac{I}{K_1^P} \right) \right] / \left(1 + \frac{S}{K_1} + \frac{I}{K_1^A} \right) \quad (7.30)$$

odnosno koncentracija EA kompleksa je

$$EA = \frac{E_0}{k_3 \left(1 + b \frac{S}{K_2} \right) \cdot \left(1 + \frac{S}{K_1} + \frac{I}{K_1^A} \right) / Sk_2 \left(1 + a \frac{S}{K_1} \right) + \left(1 + \frac{S}{K_2} + \frac{I}{K_1^P} \right)} \quad (7.31)$$

Uvrštavanjem izraza 7.31 u jed. aktivnosti 7.17 dobiva se izraz za aktivnost enzima u prisutnosti inhibitora (jed. 1.16)

$$v = \frac{E_0 k_3 S}{S(1 + \frac{S}{K_2} + \frac{I}{K_I^P}) / (1 + b \cdot S / K_2) + k_3(1 + \frac{S}{K_1} + \frac{I}{K_I^A}) / [k_2(1 + a \cdot S / K_1)]} \quad (1.16)$$

7.2.2 Model sa 7 parametara

Iz modela sa 7 parametara (Slika 1.14) izvodi se jed. za enzimsku aktivnost v koja je analogna jed. 7.17 s razlikom da je konstanta K_2 zamijenjena s konstantom K_p

$$v = k_3 \cdot EA \cdot \left(1 + b \frac{S}{K_p}\right) \quad (7.32)$$

Ukupna koncentracija enzima jednaka je

$$E_0 = E + S_p E + ES + S_p ES + EA + S_p EA + EAS + S_p ESA \quad (7.33)$$

odnosno

$$E_0 = E \cdot \left(1 + \frac{S}{K_p} + \frac{S}{K_p K_L} + \frac{S^2}{K_p^2 K_{LL}}\right) + EA \cdot \left(1 + \frac{S}{K_p} + \frac{S}{K_p K_{LL}} + \frac{S^2}{K_p^2 K_{LL}}\right) \quad (7.34)$$

Koncentracija slobodnog enzima jednaka je

$$E = \left[E_0 - EA \left(1 + \frac{S}{K_p} + \frac{S}{K_p K_{LL}} + \frac{S^2}{K_p^2 K_{LL}}\right) \right] / \left(1 + \frac{S}{K_p} + \frac{S}{K_p K_L} + \frac{S^2}{K_p^2 K_L}\right) \quad (7.35)$$

Diferencijalna jed. promjene EA kompleksa i s njime ravnotežnog $S_p EA$ kompleksa u vremenu t glasi

$$\frac{\partial EA}{\partial t} = k_2 ES + a k_2 S_p ES - k_3 EA - b k_3 S_p EA = 0 \quad (7.36)$$

Supstitucijom ES i $S_p ES$ s konstantama ravnoteža s koncentracijom slobodnog enzima E , te $S_p EA$ kompleksa sa ravnotežom s EA kompleksom

$$\frac{k_2 E \cdot S}{K_p K_L} \left(1 + a \frac{S}{K_p}\right) - k_3 EA \left(1 + b \frac{S}{K_p}\right) = 0 \quad (7.37)$$

Izlučivanjem koncentracije EA kompleksa dobiva se jed. 7.38

$$EA = \frac{k_2 E \cdot S}{K_p K_L} \left(1 + a \frac{S}{K_p}\right) / k_3 \left(1 + b \frac{S}{K_p}\right) \quad (7.38)$$

Uvrštavanjem izraza za koncentraciju slobodnog enzima 7.35 dobiva se

$$EA = \frac{k_2 S}{K_p K_L} \left(1 + a \frac{S}{K_p} \right) \left(E_0 - EA \left(1 + \frac{S}{K_p} + \frac{S}{K_p K_L} + \frac{S^2}{K_p^2 K_{LL}} \right) \right) / \left[k_3 \left(1 + b \frac{S}{K_p} \right) \left(1 + \frac{S}{K_p} + \frac{S}{K_p K_L} + \frac{S^2}{K_p^2 K_L} \right) \right] \quad (7.39)$$

odnosno

$$EA = \frac{E_0}{A + B}$$

$$A = k_3 \left(1 + b \frac{S}{K_p} \right) \left(1 + \frac{S}{K_p} + \frac{S}{K_p K_L} + \frac{S^2}{K_p^2 K_L} \right) / \frac{k_2 S}{K_p K_L} \left(1 + a \frac{S}{K_p} \right) \quad (7.40)$$

$$B = \left(1 + \frac{S}{K_p} + \frac{S}{K_p K_{LL}} + \frac{S^2}{K_p^2 K_{LL}} \right)$$

Uvrštavanjem jed. 7.40 u jed. 7.32 dolazi se do jednadžbe aktivnosti enzima

$$v = \frac{E_0 k_3 S}{S \left(1 + \frac{S}{K_p} + \frac{S}{K_p K_{LL}} + \frac{S^2}{K_p^2 K_{LL}} \right) / \left(1 + b \cdot \frac{S}{K_p} \right) + k_3 K_p K_L \left(1 + \frac{S}{K_p} + \frac{S}{K_p K_L} + \frac{S^2}{K_p^2 K_L} \right) / [k_2 \left(1 + a \cdot \frac{S}{K_p} \right)]} \quad (1.17)$$

Izvod jednadžbe za inhibiciju enzimske aktivnosti

Da bi se dobila jed. za aktivnost enzima u prisutnosti inhibitora prema Slici 1.13 potrebno je napisati izraz za ukupnu koncentraciju enzima

$$E_0 = E + S_p E + ES + S_p ES + IE + EI + IES + EA + S_p EA + EAS + S_p ESA + IEA \quad (7.41)$$

Supstitucijom koncentracija kompleksa $S_p E$, ES , $S_p ES$, IE , EI , IES , $S_p EA$, EAS , $S_p ESA$ i IEA sa izrazima za ravnotežu sa slobodnim enzimom E odnosno EA kompleksom

$$E_0 = E \cdot \left(1 + \frac{S}{K_p} + \frac{S}{K_p K_L} + \frac{S^2}{K_p^2 K_L} + \frac{I}{K_I^P} + \frac{I}{K_I^A K_I^P} \right) + EA \cdot \left(1 + \frac{S}{K_p} + \frac{S}{K_p K_{LL}} + \frac{S^2}{K_p^2 K_{LL}} + \frac{I}{K_I^P} \right) \quad (7.42)$$

Koncentracija slobodnog enzima E iznosi

$$E = \left[E_0 - EA \left(1 + \frac{S}{K_p} + \frac{S}{K_p K_{LL}} + \frac{S^2}{K_p^2 K_{LL}} + \frac{I}{K_I^P} \right) \right] / \left(1 + \frac{S}{K_p} + \frac{S}{K_p K_L} + \frac{S^2}{K_p^2 K_L} + \frac{I}{K_I^P} + \frac{I}{K_I^A K_I^P} \right) \quad (7.43)$$

Uvrštavanjem izraza za E u jed. 7.38

$$EA = \frac{k_2 S}{K_p K_L} \left(1 + a \frac{S}{K_p} \right) \left[E_0 - EA \left(1 + \frac{S}{K_p} + \frac{S}{K_p K_{LL}} + \frac{S^2}{K_p^2 K_{LL}} + \frac{I}{K_I^P} \right) \right] / \left[k_3 \left(1 + b \frac{S}{K_p} \right) \left(1 + \frac{S}{K_p} + \frac{S}{K_p K_L} + \frac{S^2}{K_p^2 K_L} + \frac{I}{K_I^P} + \frac{I}{K_I^A K_I^P} \right) \right] \quad (7.44)$$

Koncentracija EA kompleksa jednaka je

$$EA = \frac{E_0}{k_3 \left(1 + b \frac{S}{K_p} \right) \left(1 + \frac{S}{K_p} + \frac{S}{K_p K_L} + \frac{S^2}{K_p^2 K_L} + \frac{SI}{K_p K_L K_{I,p}} + \frac{I}{K_{I,p}} + \frac{I}{K_{I,L} K_{I,p}} \right) + \frac{k_2 S}{K_p K_L} \left(1 + a \frac{S}{K_p} \right) + \left(1 + \frac{S}{K_p} + \frac{S}{K_p K_{LL}} + \frac{S^2}{K_p^2 K_{LL}} + \frac{I}{K_{I,p}} \right)} \quad (7.45)$$

Uvrštavanjem ovog izraza u jed. 7.32 i uređenje dvostrukih razlomaka dobiva se jednadžba aktivnosti enzima u prisutnosti inhibitora

$$v = \frac{k_3 E_0 S}{A + B} \quad (1.19)$$

$$A = S \left(1 + \frac{S}{K_p} + \frac{S}{K_p K_{LL}} + \frac{S^2}{K_p^2 K_{LL}} + \frac{I}{K_{I,p}} \right) / \left(1 + b \cdot \frac{S}{K_p} \right)$$

$$B = k_3 K_p K_L \left(1 + \frac{S}{K_p} + \frac{S}{K_p K_L} + \frac{S^2}{K_p^2 K_L} + \frac{SI}{K_p K_L K_{I,p}} + \frac{I}{K_{I,p}} + \frac{I}{K_{I,L} K_{I,p}} \right) / [k_2 (1 + a \cdot \frac{S}{K_p})]$$

7.3. Proširenje modela sa 7 parametara sa parametrom za temperaturu

Da bi se model sa 7 parametara mogao primijeniti u analizi eksperimentalno izmjerenih enzimskih aktivnosti pri različitim temperaturama bilo je potrebno uvesti temperaturu kao dodatni parametar u model. Supstitucijom konstanta brzine k sa jednadžbom 7.46

$$\Delta^\ddagger G = RT \left(\ln \frac{k_B}{h} - \ln \frac{k}{T} \right) = \Delta^\ddagger H - T \Delta^\ddagger S \quad (3.15)$$

$$k = \frac{k_B}{h} \cdot T \cdot e^{-\Delta^\ddagger G/RT} = \frac{k_B}{h} \cdot T \cdot e^{-(\Delta^\ddagger H - T \Delta^\ddagger S)/RT} \quad (7.46)$$

i ravnotežnih konstanta K sa jednadžbom 7.47

$$\Delta G^\circ = -RT \cdot \ln K_a = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad (3.15)$$

$$K_a = \frac{1}{K_d} \Rightarrow K_d = e^{\Delta G^\circ/RT} = e^{(\Delta H^\circ - T \Delta S^\circ)/RT} \quad (7.47)$$

U jednadžbi 7.46, k_B je Boltzmann-ova konstanta ($1,38062 \cdot 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$), a h Planck-ova konstanta ($6,6262 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$).

Konstante u 7-parametarskom modelu supstituirane su sa slijedećim jednadžbama

$$k_3 = \frac{k_B}{h} \cdot T \cdot e^{-(\Delta^\ddagger H_{k_3} - T \Delta^\ddagger S_{k_3})/RT} \quad (7.48)$$

$$b k_3 = \frac{k_B}{h} \cdot T \cdot e^{-(\Delta^\ddagger H_{bk_3} - T \Delta^\ddagger S_{bk_3})/RT} \quad (7.49)$$

$$k_2 = \frac{k_B}{h} \cdot T \cdot e^{-(\Delta^\ddagger H_{k_2} - T \Delta^\ddagger S_{k_2})/RT} \quad (7.50)$$

$$ak_3 = \frac{k_B}{h} \cdot T \cdot e^{-(\Delta^\ddagger H_{ak3} - T\Delta^\ddagger S_{ak3})/RT} \quad (7.51)$$

$$K_p = e^{(\Delta H_{Kp}^\circ - T\Delta S_{Kp}^\circ)/RT} \quad (7.52)$$

$$K_L = e^{(\Delta H_{KL}^\circ - T\Delta S_{KL}^\circ)/RT} \quad (7.53)$$

$$K_{LL} = e^{(\Delta H_{KLL}^\circ - T\Delta S_{KLL}^\circ)/RT} \quad (7.54)$$

$$K_{I,L} = e^{(\Delta H_{KI,L}^\circ - T\Delta S_{KI,L}^\circ)/RT} \quad (7.55)$$

$$K_{I,P} = e^{(\Delta H_{KI,P}^\circ - T\Delta S_{KI,P}^\circ)/RT} \quad (7.56)$$

kako bi se dobila jednađžba analogna jed. 1.19.

7.4. Izvod jednađžbe za prividnu konstantu inhibicije $K_{i,app}$

U jed. 3.4, koja definira prividnu konstantu inhibicije $K_{i,app}$, v_o je supstituirano sa Michaelis-Menten-inom jed., a v_i sa jed. za kompetitivnu inhibiciju enzima, te se dolazi do izraza za jed. 3.7:

$$\frac{v_o}{v_i} = \frac{I}{K_{i,app}} + 1 \quad (3.5)$$

Slijedi izvod

$$\frac{V_m / (1 + K_m / S)}{V_m / (1 + K_m \cdot (1 + I / K_i) / S)} = \frac{I}{K_{i,app}} + 1 \quad (7.57)$$

Budući da su u brojniku i nazivniku V_m mogu se pokratiti uz množenje dvostrukih razlomaka, pa izraz nije funkcija maksimalne aktivnosti

$$\frac{1 + K_m \cdot (1 + I / K_i) / S}{1 + K_m / S} = \frac{I}{K_{i,app}} + 1 \quad (7.58)$$

Prebacivanjem jedinice na lijevu stranu i svođenjem razlomka na zajednički nazivnik

$$\begin{aligned} \frac{1 + K_m \cdot (1 + I / K_i) / S}{1 + K_m / S} - 1 &= \\ \frac{1 + K_m / S + (K_m / S) \cdot (I / K_i) - (1 + K_m / S)}{1 + K_m / S} &= \frac{I}{K_{i,app}} \end{aligned} \quad (7.59)$$

dobivamo oduzimanje istih suma $(1 + K_m / S)$, izlučivanjem S iz nazivnika nastaje izraz

$$\frac{(K_m / S) \cdot (I / K_i)}{(S + K_m) / S} = \frac{I}{K_{i,app}} \quad (7.60)$$

Sada se mogu pokratiti koncentracije supstrata S u brojniku i nazivniku s lijeve strane te koncentracije inhibitora I u brojniku s lijeve i desne strane

$$\frac{K_m / K_i}{S + K_m} = \frac{1}{K_{i,app}} \quad (7.61)$$

Sada izraz prestaje biti funkcija koncentracije inhibitora I i potrebno je načiniti reciprok lijeve i desne strane

$$\frac{S + K_m}{K_m / K_i} = \frac{S}{K_m / K_i} + \frac{K_m}{K_m / K_i} = K_{i,app} \quad (7.62)$$

Daljnijim uređivanjem sume razlomaka, uz kraćenje K_m dobiva se izraz za prividnu konstantu inhibicije, jed. 3.7.

$$\frac{K_i}{K_m} \cdot S + K_i = K_{i,app} \quad (3.7)$$

U jednadžbi 3.7 u poglavlju 3 ove disertacije umjesto K_m napisano je K_s budući da se ponekad K_m izračunan iz enzimске hidrolize supstrata ne podudara s onim izračunanim iz inhibicije.

8. LITERATURNNA VRELA

1. E. Giacobini (Ed.), Butyrylcholinesterase: Its function and inhibitors, Martin-Dunitz, London, 2003.
2. H. Soreq and S. Seidman, Acetylcholinesterase: new roles for an old actor, Nat Rev Neurosci, **2** (2001) 294-302.
3. L. V. Borovikova, S. Ivanova, M. Zhang, H. Yang, G. I. Botchkina, L. R. Watkins, H. Wang, N. Abumrad, J. W. Eaton and K. J. Tracey, Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin, Nature, **405** (2000) 458-62.
4. E. C. Webb (Ed.), Enzyme nomenclature. Recommendations (1992) of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NCIUBMB) on the Nomenclature and Classification of Enzymes, New York, Academic Press, 1992.
5. O. Lockridge, C. F. Bartels, T. A. Vaughan, C. K. Wong, S. E. Norton and L. L. Johnson. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. J Biol Chem, **262** (1987) 549-57.
6. J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolo, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker and I. Silman, Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine binding protein, Science, **253** (1991) 872-9.
7. A. Ordentlich, D. Barak, C. Kronman, Y. Flashner, M. Leitner, Y. Segall, N. Ariel, S. Cohen, B. Velan and A. Shafferman, Dissection of the human acetylcholinesterase active center determinants of substrate specificity - Identification of residues constituting the anionic site, the hydrophobic site, and the acyl pocket, J Biol Chem, **268** (1993) 17083-95.
8. Z. Radić, N. A. Pickering, D. C. Vellom, S. Camp and P. Taylor, Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors, Biochemistry, **32** (1993) 12074-84.
9. M. Whittaker, Cholinesterase u Monographs in human genetics, vol. 11, L. Beckman (Ed.), Karger, Basel, p 1-132.
10. S. L. Primo-Parmo, C. F. Bartels, B. Wiersema, A. F. van der Spek, J. W. Innis and B. N. La Du, Characterization of 12 silent alleles of the human butyrylcholinesterase (BCHE) gene, Am J Hum Genet, **58** (1996) 52-64.
11. O. Lockridge and P. Masson, Pesticides and susceptible populations: people with butyrylcholinesterase genetic variants may be at risk, Neurotoxicology, **21** (2000) 113-26.
12. W. Kalow and K. Genest, A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase; determination of dibucaine numbers, Can J Biochem Physiol, **35** (1957) 339-46.
13. V. Simeon-Rudolf and R. T. Evans, Interlaboratory study into the proficiency of attribution of human serum butyrylcholinesterase phenotypes: Reference values of activities and inhibitor numbers, Acta Pharmaceutica, **51** (2001) 289-96.

14. P. Taylor, Cholinergic Agonists u The Pharmacological Basis of Therapeutics 8th edn., A. G. Gilman, T. W. Rall, A. S. Nies and P. Taylor (Ed's.), New York, Pergamon, 1990, p 122-130.
15. N. W. Aldridge and E. Reiner, Enzyme Inhibitors as Substrates. Interaction of Esterases with Esters of Organophosphorus and Carbamic Acids, North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1972.
16. J. Stojan and M. Zorko, Kinetic characterization of all steps of the interaction between acetylcholinesterase and eserine, Biochim Biophys Acta, **1337** (1997) 75-84.
17. D. M. Quinn, Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states, Chem Rev, **87** (1987) 955-79.
18. F. Worek, U. Mast, D. Kiderlen, C. Diepold and P. Eyer, Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood, Clin Chim Acta, **288** (1999) 73-90.
19. E. Reiner, G. Šinko, M. Škrinjarčić-Špoljar and V. Simeon-Rudolf, Comparison of protocols for measuring activities of human blood cholinesterases by the Ellman method, Arh Hig Rada Toksikol, **51** (2000) 13-8.
20. V. Simeon-Rudolf, G. Šinko, A. Štuglin and E. Reiner, Inhibition of human blood acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by ethopropazine, Croat Chem Acta, **74** (2001) 173-82.
21. M. Simonyi (Ed.), Problems and Wonders of Chiral Molecules, Akademia: Kiado, Budapest, 1990.
22. H. Y. Aboul-Enein and I. W. Wainer (Ed's.), The Impact of Stereochemistry on Drug Development, J. Wiley & Sons, New York, 1997.
23. A. G. Ogston, Interpretation of experiments on metabolic processes, using isotopic tracer elements, Nature, **162** (1948) 963-4.
24. E. J. Ariens, Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology, Eur J Clin Pharmacol, **26** (1984) 663-8.
25. Faber K. Biotransformations in organic chemistry: a textbook. 5th edn., Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2004.
26. G. T. Tucker, Chiral switches, Lancet, **355** (2000) 1085-7.
27. K. M. Williams, R. O. Day, Clinical applications of enantiomeric drugs, Aust Prescr, **12** (1989) 22-5.
28. R. S. Cahn, C. K. Ingold and V. Prelog, Specification of molecular chirality, Angew Chem Int Ed Engl, **5** (1966) 385-415.

29. I. Primožič, T. Hrenar, S. Tomić, and Z. Meić, Interactions of chiral quinuclidin-3-yl benzoates with butyrylcholinesterase: kinetic study and docking simulations, *J Phys Org Chem*, **15** (2002) 608-14.
30. A. Bosak, I. Primožič, M. Oršulić, S. Tomić and V. Simeon-Rudolf, Enantiomers of quinuclidin-3-ol derivatives: resolution and interactions with human cholinesterases, *Croat Chem Acta*, **78** (2005) 121-8.
31. A. Gazić, A. Bosak, G. Šinko, V. Vinković and Z. Kovarik, Preparative HPLC separation of bambuterol enantiomers and stereoselective inhibition of human cholinesterases, *Anal Bioanal Chem*, **385** (2006) 1513-19.
32. Z. Kovarik, Z. Radić, H. A. Berman, V. Simeon-Rudolf, E. Reiner and P. Taylor, Mutant cholinesterases possessing enhanced capacity for reactivation of their phosphorylated conjugates, *Biochemistry*, **43** (2004) 3222-9.
33. A. Ordentlich, D. Barak, C. Kronman, H. P. Benschop, L. P. A. De Jong, N. Ariel, R. Barak, Y. Segall, B. Velan and A. Shafferman, Exploring the active center of human acetylcholinesterase with stereoisomers of an organophosphorus inhibitor with two chiral centers, *Biochemistry*, **38** (1999) 3055-66.
34. H. P. Benschop and L.P. A. DeJong, Toxicokinetics of nerve agents u Chemical warfare agents: Toxicity at low levels, S. M. Somani, J. A. Romano (Ed's.), Boca Raton (FL, SAD), CRC Press LLC, 2001, p 25-120.
35. H. P. Benschop and L.P. A. DeJong, Nerve agents stereoisomers: Analysis, isolation and toxicology, *Acc Chem Res*, **21** (1988) 368-74.
36. A. Cornish-Bowden, *Fundamentals of Enzyme Kinetitics* 3rd edn., Portland Press Ltd., London, 2004.
37. J. L. Webb, *Enzyme and Metabolic Inhibitors 1*, Academic Press, New York, 1963, p. 46-47.
38. G. Cauet, A. Friboulet and D. Thomas, Horse serum butyrylcholinesterase kinetics: a molecular mechanism based on inhibition studies with dansylaminoethyltrimethylammonium, *Biochem Cell Biol*, **65** (1987) 529-35.
39. T. L. Rosenberry, W. D. Mallender, P. J. Thomas and T. Szegletes, A steric blockade model for inhibition of acetylcholinesterase by peripheral site ligands and substrate, *Chem—Biol Interact*, **119-120** (1999) 85-97.
40. J. Stojan, V. Marcel, S. Estrada-Mondaca, A. Klæbe, P. Masson and D. Fournier, A putative kinetic model for substrate metabolism by *Drosophila* acetylcholinesterase, *FEBS Lett*, **440** (1998) 85-8.
41. J. Stojan, Rational polynomial equation helps to select among homeomorphic kinetic models for cholinesterase reaction mechanism, *Chem—Biol Interact*, **157-158** (2005) 173-9.

42. J. P. Colletier, D. Fournier, H. M. Greenblatt, J. Stojan, J. L. Sussman, G. Zaccai, I. Silman and M. Weik, Structural insights into substrate traffic and inhibition in acetylcholinesterase. *EMBO J*, **25** (2006) 2746-56.
43. A. Fersht, Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding, W. H. Freeman and Company, New York, 1999.
44. C. Luo, A. Saxena, Y. Ashani, H. Leader, Z. Radic, P. Taylor and B. P. Doctor, Role of edrophonium in prevention of the re-inhibition of acetylcholinesterase by phosphorylated oxime, *Chem—Biol Interact*, **119-120** (1999) 129-35.
45. Z. Kovarik, T. Latas and V. Simeon-Rudolf, Quantification of butyrylcholinesterase active sites in purified preparations using organophosphorus compounds, *Periodicum biologorum*, **104** (2002) 481-5.
46. J. L. G. Nilsson, J. Hermansson, U. Hacksell and S. Sundell, Promethazine resolution, absolute configuration and direct chromatographic separation of the enantiomers, *Acta Pharm Suec*, **21** (1984) 309-16.
47. G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres and R. M. Featherstone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem Pharmacol*, **7** (1961) 88-95.
48. P. Eyer, F. Worek, D. Kiderlen, G. Šinko, A. Štuglin, V. Simeon-Rudolf and E. Reiner, Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment, *Anal Biochem*, **312** (2003) 224-7.
49. S. B. Hansen, Z. Radić, T. T. Talley, B. E. Moles, T. Deerinck, I. Tsigelny and P. Taylor, Tryptophan fluorescence reveals conformational changes in the acetylcholine binding protein, *J Biol Chem*, **277** (2002) 41299-302.
50. M. Goličnik, G. Šinko, V. Simeon-Rudolf, Z. Grubič and J. Stojan, Kinetic model of ethopropazine interaction with horse serum butyrylcholinesterase and its docking into the active site, *Arch Biochem Biophys*, **398** (2002) 23-31.
51. A. Hunter and C. E. Downs, The inhibition of araginase by amino acids, *J Biol Chem*, **157** (1945) 427-46.
52. K. B. Augustinsson, H. Eriksson, and Y. Faijersson, A new approach to determining cholinesterase activities in samples of whole blood, *Clin Chim Acta*, **89** (1978) 239-52.
53. W. J. A. Meuling, M. J. M. Jongen, and J. J. van Hemmen, An automated method for the determination of acetyl and pseudo cholinesterase in hemolyzed whole blood, *Am J Ind Med*, **22** (1992) 231-41.
54. G. W. Ponder, S. L. Butram, A. G. Adams, C. S. Ramanathan, and J. T. Stewart, Resolution of promethazine, ethopropazine, trimeprazine and trimipramine enantiomers on selected chiral stationary phases using high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr A*, **692** (1995) 173-82.

55. M. Maboudian-Esfahani and D. R. Brocks, High-performance liquid chromatographic assay of ($\pm$)-ethopropazine and its enantiomers in rat plasma, *J Chromatogr B*, **715** (1998) 417-25.
56. G. Šinko, P. Novak, D. Žiher, V. Vinković, V. Šunjić and V. Simeon-Rudolf, Separation, conformation in solution and absolute configuration of ethopropazine enantiomers, *Enantiomer*, **7** (2002) 149-56.
57. C. L. Klein, J. Lear, S. O'Rourke, S. Williams, and L. Lang, Crystal and molecular structures of tricyclic neuroleptics, *J Pharm Sci*, **83** (1994) 1253-60.
58. G. Šinko and V. Simeon, Horse butyrylcholinesterase inhibition with ethopropazine enantiomers : Temperature influence on stereoselectivity, *Mol Cell Proteomics*, **2** (2003) 773.
59. G. Šinko, Z. Radić, P. Taylor, V. Simeon-Rudolf and E. Reiner, Kinetics of interaction of ethopropazine enantiomers with butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase, u *Cholinergic mechanisms: Function and Dysfunction*, I. Silman, H. Soreq, L. Anglister, D. M. Michaelson and A. Fisher (Ed's.), Francis & Taylor, London, 2004, p. 705-6.
60. A. Saxena, A. M. Redman, X. Jiang, O. Lockridge and B. P. Doctor, Differences in active-site gorge dimensions of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase, *Chem—Biol Interact*, **119-120** (1999) 61-9.
61. Y. Bourne, P. Taylor and P. Marchot, Acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: crystal structure of the complex, *Cell*, **83** (1995) 503-9.
62. V. Simeon-Rudolf, E. Reiner, R. T. Evans, P. George and H. C. Potter, Catalytic parameters for the hydrolysis of butyrylthiocholine by human serum butyrylcholinesterase variants, *Chem-Biol Interact*, **119-120** (1999) 165-71.
63. V. Simeon-Rudolf, G. Šinko, A. Štuglin, J. Stojan, M. Goličnik and E. Reiner, Comparison of two reaction schemes for the hydrolysis of acetylthiocholine by butyrylcholinesterase. *Cholinergic mechanisms: Function and Dysfunction*. I. Silman, H. Soreq, L. Anglister, D. M. Michaelson, A. Fisher (Ed's.). Francis & Taylor, London, 2004, p. 701-3.
64. V. Simeon-Rudolf and B. Jurišić, Heterogeneity of human serum cholinesterase revealed by thiocholine substrates. *Periodicum biologorum*, **98** (1996) 331-5.
65. V. Simeon, E. Reiner and C.A. Vernon, Effect of temperature and pH on carbamoylation and phosphorylation of serum cholinesterases, *Biochem J*, **130** (1972) 515-24.

9. ŽIVOTOPIS

OSOBNİ PODACI

Ime i prezime	Goran Šinko
Datum rođenja	20. lipnja 1974.
Mjesto rođenja	Zagreb, Hrvatska

ŠKOLOVANJE

1993-1998	Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, diplomirao kemiju 18. studenog 1998. god. Tema diplomskog rada: <i>"Priprava izopropilnih estera racemičnih N-3,5-dinitrobenzoil α-aminokiselina i kiralnih stacionarnih faza temeljenih na celulozi"</i> (mentor: prof. Vitomir Šunjić)
-----------	--

1999-	Poslijediplomski studij prirodnih znanosti (kemija) na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Tema doktorske disertacije "Inhibicija kolinesteraza enantiomerima etopropazina" (mentor: dr. sc. Vera Simeon)
-------	---

Tečajevi

Rujan 2000	"7 th International Summer School on Biophysics", organizator: Institut "Ruđer Bošković" i UNESCO, Rovinj, Hrvatska
Prosinac 2000	"Molecular Modelling and Computer Assisted Combinatorial Chemistry", organizator: ICS-UNIDO, Trst, Italija
Rujan 2006	"9 th International Summer School on Biophysics", organizator: Institut "Ruđer Bošković" i UNESCO, Rovinj, Hrvatska

Zaposlenje

Od prosinca 1998	Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Jedinica za biokemiju i organsku analitičku kemiju, Zagreb, Hrvatska
------------------	---

Članstva

Hrvatsko kemijsko društvo

Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju

Organizacija kongresa

Član organizacijskog odbora Kongresa Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju 2006.

POPIS RADOVA

Radovi u časopisima referiranim u bazi podataka Current Contents (CC)

1. **Šinko, Goran**; Čalić, Maja; Kovarik, Zrinka. *para*- and *ortho*-Pyridinium aldoximes in reaction with acetylthiocholine. *FEBS Letters*. 580 (2006), 3167-3172. **1 citat**
2. Gazić, Ivana; Bosak, Anita; **Šinko, Goran**; Vinković, Vladimir; Kovarik, Zrinka. Preparative HPLC separation of bambuterol enantiomers and stereoselective inhibition of human cholinesterases. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 385 (2006), 1513-1519.
3. **Šinko, Goran**; Bosak, Anita; Kovarik, Zrinka; Simeon-Rudolf, Vera. Structure-inhibition relationships in the interaction of butyrylcholinesterase with bambuterol, haloxon and their leaving groups. *Chemico-Biological Interactions*. 157-158 (2005), 421-423. **1 citat**
4. Kovarik, Zrinka; Bosak, Anita; **Šinko, Goran**; Latas, Tatjana. Exploring active sites of cholinesterases by inhibition with bambuterol and haloxon. *Croatica Chemica Acta*. 76 (2003), 1, 63-67. **7 citata**
5. Eyer, Peter; Worek, Franz; Kiderlen, Daniela; **Šinko, Goran**; Štuglin, Anita; Simeon-Rudolf, Vera; Reiner, Elsa. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Analytical Biochemistry*. 312 (2003); 224-227. **20 citata**
6. **Šinko, Goran**; Novak, Predrag; Žiher, Dinko; Vinković, Vladimir; Šunjić, Vitomir; Simeon, Vera. Separation, Conformation in Solution and Absolute Configuration of Ethopropazine Enantiomers. *Enantiomer*. 7 (2002), 149-156. **1 citat**
7. Goličnik, Marko; **Šinko, Goran**; Simeon-Rudolf, Vera; Grubič, Zoran; Stojan, Jure. Kinetic model of ethopropazine interaction with horse serum butyrylcholinesterase and its docking into the active site. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 398 (2002), 1, 23-31. **7 citata**
8. Simeon-Rudolf, Vera; **Šinko, Goran**; Štuglin, Anita; Reiner Elsa. Inhibition of human blood acetyl-cholinesterase and butyrylcholinesterase by ethopropazine. *Croatica Chemica Acta*. 74 (2001), 1; 173-182. **4 citata**

Radovi u časopisima referiranim u bazi podataka Chemical Abstracts (CA)

1. Kovarik, Zrinka; Čalić, Maja; **Šinko, Goran** and Bosak, Anita, Structure-activity Approach in the Reactivation of Tabun-phosphorylated Human Acetylcholinesterase with Bispyridinium para-Aldoximes, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. (2007) u tisku
2. **Šinko, Goran**. Enzimske i proteinske metode u pripravi enantiomerno čistih kiralnih spojeva i svojstva nekih biološki aktivnih enantiomera. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 56 (2005), 4; 351-361.
3. Reiner, Elsa; **Šinko, Goran**; Škrinjarčić-Špoljar, Mira; Simeon-Rudolf, Vera. Comparison of protocols for measuring activities of human blood cholinesterases by the Ellman method. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*. 51 (2000), 1; 13-18. **3 citata**

Poglavlja u knjigama

1. Reiner, Elsa; **Šinko, Goran**; Bosak, Anita; Simeon-Rudolf, Vera; Radić, Zoran; Taylor, Palmer; Stojan, Jure; Goličnik, Marko. Kinetics of ethopropazine binding to butyrylcholinesterase in the absence and presence of acetylthiocholine. Cholinesterases in the Second Millennium: Biomolecular and Pathological Aspects. Inestrosa, Nibaldo C.; Campos, Eliseo O. (ur.). Santiago de Chile: Universidad Catolica de Chile, 2004, 187-9.
2. Reiner, Elsa; **Šinko, Goran**; Štuglin, Anita; Simeon-Rudolf, Vera. Peripheral binding of ethopropazine to horse serum butyrylcholinesterase. Cholinergic mechanisms: Function and Dysfunction. Silman, Israel; Soreq, Hermona; Anglister, Lili; Michaelson, Daniel M.; Fisher, Abraham (ur.). London : Francis & Taylor, 2004, 673-4.
3. Simeon-Rudolf, Vera; **Šinko, Goran**; Štuglin, Anita; Stojan, Jure; Goličnik, Marko; Reiner, Elsa. Comparison of two reaction schemes for the hydrolysis of acetylthiocholine by butyrylcholinesterase. Cholinergic mechanisms: Function and Dysfunction. Silman, Israel; Soreq, Hermona; Anglister, Lili; Michaelson, Daniel M.; Fisher, Abraham (ur.). London : Francis & Taylor, 2004, 701-3.
4. Šinko, Goran; Radić, Zoran; Taylor, Palmer; Simeon-Rudolf, Vera; Reiner, Elsa. Kinetics of interaction of ethopropazine enantiomers with butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. Cholinergic mechanisms: Function and Dysfunction. Silman, Israel; Soreq, Hermona; Anglister, Lili; Michaelson, Daniel M.; Fisher, Abraham (ur.). London : Francis & Taylor, 2004, 705-6.

Kongresna priopćenja

1. Simeon-Rudolf, Vera; **Šinko, Goran**; Reiner, Elsa. Inhibition of human serum butyrylcholinesterase phenotypes by ethopropazine. Life Sciences Conference 1999. Ljubljana, Slovenia: Slovenian Pharmacological Society, 1999, 87.
2. Škrinjarić-Špoljar, Mira; **Šinko, Goran**; Reiner, Elsa; Simeon-Rudolf, Vera. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity measurements in human blood by the Ellman method: I. Evaluation of experimental conditions. Technical Program, CB Medical Treatment Symposium: An Exploration of Present Capabilities and Future Requirements for Chemical and Biological Medical Treatment, Abstracts of Platform and Poster Presentations. Price, B. (Ed.). Spiez : AC-Laboratorium Spiez, Switzerland, 2000, 20.
3. Reiner, Elsa; Škrinjarić-Špoljar, Mira; **Šinko, Goran**; Simeon-Rudolf, Vera. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity measurements in human blood by the Ellman method: II. Procedure protocol and comparison with procedures suggested by other authors. Technical Program, CB Medical Treatment Symposium: An Exploration of Present Capabilities and Future Requirements for Chemical and Biological Medical Treatment, Abstracts of Platform and Poster Presentations. Price, B. (Ed.). Spiez: AC-Laboratorium Spiez, Switzerland, 2000, 19.
4. **Šinko, Goran**; Simeon-Rudolf, Vera. Inhibition of acetylcholinesterase mutants and butyrylcholinesterase with enantiomers of ethopropazine. Seventh International Summer School on Biophysics, Supramolecular Structure and Function, Book of Abstracts. Pifat-Mrzljak, G. (Ed.). Rovinj: The Croatian Biophysical Society, Ruđer Bošković Institute, Croatia, 2000, 133.
5. Stojan, Jure; **Šinko, Goran**; Goličnik, Marko; Simeon-Rudolf, Vera; Reiner, Elsa. Interaction of wild type horse serum butyrylcholinesterase with ethopropazine. Kongres hrvatskih biokemičara i molekularnih biologa uz međunarodno sudjelovanje HB2000. Knjiga sažetaka. Zagreb, Croatia, 2000, L6 34.
6. Simeon-Rudolf, Vera; Reiner, Elsa; **Šinko, Goran**; Štuglin, Anita; Goličnik, Marko; Stojan, Jure. Competitive and non-competitive inhibition of horse serum butyrylcholinesterase by ethopropazine. Kongres hrvatskih biokemičara i molekularnih biologa uz međunarodno sudjelovanje HB2000. Knjiga sažetaka. Zagreb, Croatia, 2000, L7 35.

Kongresna priopćenja (nastavak)

7. **Šinko, Goran**; Radić, Zoran; Simeon-Rudolf, Vera; Reiner, Elsa; Taylor, Palmer. Kinetics of interaction of ethopropazine enantiomers with butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. Eleventh international symposium on cholinergic mechanisms - function and dysfunction and second misrahi symposium on neurobiology. Program and Abstracts. St. Moritz, Switzerland, 2002, 33.
8. Reiner, Elsa; **Šinko, Goran**; Štuglin, Anita; Simeon-Rudolf, Vera. Peripheral binding of ethopropazine to horse serum butyrylcholinesterase. Eleventh international symposium on cholinergic mechanisms - function and dysfunction and second misrahi symposium on neurobiology. Program and Abstracts. St. Moritz, Switzerland, 2002, 32.
9. Reiner, Elsa; **Šinko, Goran**; Štuglin, Anita; Simeon-Rudolf, Vera; Radić, Zoran; Taylor, Palmer; Stojan, Jure; Goličnik, Marko. Kinetics of ethopropazine binding to butyrylcholinesterase in the absence and presence of acetylthiocholine. Seventh International Meeting on Cholinesterases, Pucon, Čile, Inestrosa, Nibaldo C. (ur.). Pucon, Čile: P. Universidad Catolica de Chile, 2002, 22.
10. **Šinko, Goran**; Simeon-Rudolf, Vera. Horse Butyrylcholinesterase Inhibition with Ethopropazine Enantiomers: Temperature Influence on Stereoselectivity. HUPO 2nd Annual & IUBMB XIX Joint World Congress, Montreal, Kanada, Program & Abstracts, 40.50, Bradshaw, Ralph A. (Ed.). Birmingham, AL, SAD: American Society of Biochemistry and Molecular Biology, 2003, 773.
11. Reiner, Elsa; **Šinko, Goran**; Štuglin, Anita; Simeon-Rudolf, Vera; Worek, Franz; Kiderlen, Daniela; Eyer, Peter. Cholinesterase activity assays: Molar absorption coefficient of the reduced Ellman reagent. The Proceedings of the Fourth Chemical and Biological Medical Treatment Symposium (CBMTS IV). Portmann, Rudolf (ur.). Aberdeen, Maryland, USA: Richard Price, Applied Science and Analysis, 2003, 267-270.
12. Škrinjarić-Špoljar, Mira; **Šinko, Goran**; Reiner, Elsa; Simeon-Rudolf, Vera. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity measurements by the Ellman method: I. Evaluation of procedure protocol. CBMTS III Proceedings, Third Chemical and Biological Medical Treatment Symposium 2000, Spiez, Švicarska. Price, B., Mack, K. (Ed.). Aberdeen, MD, SAD: R. Price, ASA, 2003, 1-2.
13. Reiner, E.; Škrinjarić-Špoljar, M.; **Šinko, G.**; Simeon-Rudolf, V. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity measurements by the Ellman method: II. Comparison of the procedure protocol with procedures suggested by other authors. CBMTS III Proceedings, Third Chemical and Biological Medical Treatment Symposium 2000, Spiez, Švicarska. Price, B. ; Mack, K. (Ed.). Aberdeen, MD, SAD: R. Price, ASA, 2003, 1-2.
14. **Šinko, Goran**; Bosak, Anita; Kovarik, Zrinka; Simeon-Rudolf, Vera. Structure-inhibition relationship in the interaction of cholinesterases from mammalian species with bambuterol, haloxon and their leaving groups. VIIIth International Meeting on Cholinesterases: Program and Abstracts. Talesa, Vincenzo; Antognelli, Cinzia (Ed.). Perugia, Italija: Universita degli Studi di Perugia, 2004, 31.
15. Kovarik, Zrinka; Čalić, Maja; Bosak, Anita; **Šinko, Goran**. Evaluation of bisquaternary oximes potency in reactivation of tabun-phosphorylated acetylcholinesterase. Bioscience 2006 Medical Defense Review, Abstract Program Book. Hunt Valley, Maryland, SAD: US Army Medical Research Institute of Chemical Defense, 2006, 119.
16. **Šinko, Goran**; Stojan, Jure; Goličnik, Marko; Grubič, Zoran; Kovarik, Zrinka; Simeon-Rudolf, Vera. Butyrylcholinesterase inhibition by ethopropazine enantiomers: evaluation of kinetic models. Congress of the Croatian Society of the Biochemistry and Molecular Biology on the occasion of the 30th Anniversary with international participation, Book of Abstracts, Kovarik, Z. (Ed.). Zagreb: Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju, 2006, 138.

Kongresna priopćenja (nastavak)

17. Kovarik, Zrinka; Čalić, Maja; Bosak, Anita; **Šinko, Goran**. Oxime-assisted reactivation of tabun-phosphorylated acetylcholinesterase. Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology on the occasion of the 30th Anniversary with international participation, Book of Abstracts. Zagreb: Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju, 2006, 109.
18. **Šinko, Goran**; Čalić, Maja; Kovarik, Zrinka. Comparison of pyridinium aldoximes in their reaction with the cholinesterase substrate acetylthiocholine. The Sixth International Chemical and Biological Medical Treatment Symposium, CBMTS VI, Spiez, Technical Program, Cardish, M., Price, R., Price, B., Davey, B. (Ed.). Spiez, Švicarska: Applied Science and Analysis, Inc. (ASA), Aberdeen, Maryland, SAD, 2006, 65.
19. **Šinko, Goran**; Čalić, Maja; Bosak, Anita; Kovarik, Zrinka. Limitations of the Ellman method in the cholinesterase reactivation assay. Ninth International Summer School on Biophysics, Supramolecular Structure and Function, Book of Abstracts, Pifat-Mrzljak, G., Ilakovac Kvedar, M. (Ed.). Zagreb: Ruđer Bošković Institute, 2006, 163.