

Kolinesteraze i oksimi kao pseudokatalitička čistila živčanih bojnih otrova

Maček Hrvat, Nikolina

Doctoral thesis / Disertacija

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:354902>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Nikolina Maček Hrvat

**KOLINESTERAZE I OKSIMI KAO
PSEUDOKATALITIČKA ČISTILA
ŽIVČANIH BOJNIH OTROVA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Nikolina Maček Hrvat

**CHOLINESTERASES AND OXIMES AS
PSEUDO-CATALYTIC BIOSCAVENGERS
OF NERVE WARFARE AGENTS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015.



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Nikolina Maček Hrvat

**KOLINESTERAZE I OKSIMI KAO
PSEUDOKATALITIČKA ČISTILA ŽIVČANIH
BOJNIH OTROVA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Dr. sc. Zrinka Kovarik, zn. savj.

Zagreb, 2015.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Nikolina Maček Hrvat

**CHOLINESTERASES AND OXIMES AS
PSEUDO-CATALYTIC BIOSCAVENGERS
OF NERVE WARFARE AGENTS**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Dr. Zrinka Kovarik, Research Advisor

Zagreb, 2015.

Veliko, najiskrenije Hvala mentorici dr. sc. Zrinki Kovarik na mnogobrojnim savjetima, vodstvu, pruženom znanju te podršci tijekom izrade i pisanja ovog rada.

Hvala prof. Palmeru Tayloru i dr. sc. Zoranu Radiću (Scaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of California, San Diego, SAD) za uzorke rekombinantne acetilkolinesteraze i njenih inačica.

Hvala dr. sc. Davidu Lenzu i dr. sc. Douglasu Cerasoliju (United States Army Medical Research Institute of Chemical Defense (USAMRICD), Edgewood, SAD) za uzorke butirilkolinesteraze izolirane iz ljudske plazme.

Hvala dr. sc. Jaroslavu Kalisiaku i prof. Barry-ju K. Sharplessu (The Scripps Research Institute, La Jolla, California, SAD) na JAR oksimima.

Hvala dr. sc. Goranu Šinku i dr. sc. Maji Katalinić na pruženom znanju i pomoći oko izrade ove disertacije te kritičkom čitanju iste.

Hvala dragim kolegicama dr. Maji Katalinić i Maji Meštrović na pomoći oko eksperimenata.

Hvala kolegama i kolegicama iz laboratorija i svim suradnicima Jedinice za biokemiju i organsku analitičku kemiju na svakodnevnom ugodnom druženju i spremnosti na pomoć u bilo kojem trenutku.

Nikolina Maček Hrvat

Sadržaj

| | |
|--|------|
| SAŽETAK..... | XI |
| ABSTRACT | XIII |
| § 1. UVOD..... | 1 |
| § 2. LITERATURNI PREGLED | 5 |
| 2.1. Kolinesteraze | 5 |
| 2.1.1. Acetilkinesteraza..... | 8 |
| 2.1.2. Butirilkolinesteraza..... | 12 |
| 2.2. Organofosforni spojevi | 14 |
| 2.2.1. Živčani bojni otrovi..... | 15 |
| 2.3. Reaktivatori fosfiliranih kolinesteraza..... | 19 |
| 2.4. Terapija u slučaju trovanja organofosfornim spojem | 21 |
| 2.4.1. Ligandi s kratkodjelujućim antiacetilkolinesteraznim učinkom..... | 23 |
| 2.4.2. Biološka čistila | 25 |
| § 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 31 |
| 3.1. Pufer, supstrat, reagens, otapalo | 31 |
| 3.2. Enzimski preparati | 31 |
| 3.3. Inhibitori kolinesteraza | 32 |
| 3.4. Oksimi | 32 |
| 3.5. Određivanje aktivnosti kolinesteraza metodom po Ellmanu | 36 |
| 3.6. Progresivna inhibicija kolinesteraza organofosfornim spojevima | 37 |
| 3.7. Starenje fosfiliranih kolinesteraza..... | 39 |
| 3.8. Reaktivacija fosfiliranih kolinesteraza oksimima | 40 |
| 3.9. <i>Ex vivo</i> oksim–enzim potpomognuta razgradnja organofosfornih spojeva..... | 42 |
| 3.10. Obrada rezultata | 43 |
| § 4. REZULTATI I RASPRAVA | 45 |
| 4.1. Reaktivacija tabunom inhibiranih kolinesteraza | 45 |
| 4.2. Reaktivacija VX-om inhibiranih kolinesteraza..... | 53 |
| 4.3. Starenje somanom inhibirane Y337A/F338A inačice acetilkolinesteraze..... | 59 |
| 4.4. Reaktivacija somanom inhibiranih kolinesteraza..... | 62 |
| 4.5. Inhibicija aktivnosti kolinesteraza tabunom, VX-om i somanom | 65 |
| 4.6. <i>Ex vivo</i> oksim–enzim potpomognuta razgradnja živčanih bojnih otrova | 68 |

| | |
|--|----|
| 4.6.1. <i>Tabun</i> | 68 |
| 4.6.2. <i>VX</i> | 70 |
| 4.6.3. <i>Soman</i> | 74 |
| 4.7. Smjernice za daljnja istraživanja pseudokatalitičkih čistila | 75 |
| § 5. ZAKLJUČCI | 77 |
| § 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ | 79 |
| § 7. LITERATURNI IZVORI | 81 |
| § 8. ŽIVOTOPIS | XV |



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

KOLINESTERAZE I OKSIMI KAO PSEUDOKATALITIČKA ČISTILA ŽIVČANIH BOJNIH OTROVA

Nikolina Maček Hrvat

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

Organofosforni spojevi (OP), kao što su živčani bojni otrovi (tabun, soman, VX), ireverzibilno inhibiraju acetilkolinesterazu (AChE) i butirilkolinesterazu (BChE). Terapija u slučaju izloženosti OP spoju je nužna i uključuje primjenu antikolinergika atropina i oksima, reaktivatora AChE. Ta terapija je nedostatna pa se danas, između ostalog, istražuju pseudokatalitička čistila – enzimi dizajnirani s ciljem da se njihovom cikličkom inhibicijom i reaktivacijom razgradi OP spoj prije nego što on inhibira esencijalnu sinaptičku AChE. Ispitana je učinkovitost 17 oksima u reaktivaciji ljudske AChE, BChE, Y337A i Y337A/F338A inačica AChE, inhibiranih tabunom, VX-om i somanom. Prema određenim kinetičkim parametrima izdvojeni su najučinkovitiji oksim-enzim parovi za razgradnju spomenutih OP spojeva u *ex vivo* uvjetima. Pokazano je da neki od ispitanih oksimima u kombinaciji s navedenim enzimima čine učinkovit sustav pseudokatalitičkog čistila za razgradnju tabuna (1-heksil-2-(hidroksiiminometil)piridinijev klorid (JAR288C) i Y337A), VX-a (HI-6 i Y337A/F338A) te somana (HI-6 i Y337A/F338A). Značajne odlike ovih parova oksima i inačica AChE su maksimalna konstanta brzine reaktivacije viša od $0,2 \text{ min}^{-1}$, disocijacijska konstanta oksim-enzim kompleksa oko $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$, visoki postotak reaktivacije te konstanta brzine inhibicije barem reda veličine one za nativnu AChE. Ovi kinetički parametri predstavljaju nužne kriterije za razgradnju OP spojeva potpomognutu oksimom i enzimom, odnosno za učinkovita pseudokatalitička čistila živčanih bojnih otrova.

(XIX + 92 stranice, 32 slike, 9 tablica, 2 sheme, 166 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102A, Zagreb, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb i u knjižnici Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Ksaverska cesta 2, Zagreb.

Ključne riječi: acetilkolinesteraza / butirilkolinesteraza / inačice acetilkolinesteraze / organofosforni spojevi / reaktivatori

Mentor: Dr. sc. Zrinka Kovarik, zn. savj.

Ocjenitelji: Dr. sc. Ines Primožič, izv. prof.
Dr. sc. Zrinka Kovarik, zn. savj.
Dr. sc. Jasna Vorkapić-Furač, prof.

Zamjena: Dr. sc. Ita Gruić Sovulj, izv. prof.

Rad prihvaćen: 1. travnja 2015.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

CHOLINESTERASES AND OXIMES AS PSEUDO-CATALYTIC BIOSCAVENGERS OF NERVE WARFARE AGENTS

Nikolina Maček Hrvat

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

Organophosphates (OP) such as nerve agents (tabun, soman, VX) irreversibly inhibit acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). The treatment in case of exposure to OP compounds includes the administration of the anticholinergic drug atropine and an oxime reactivator. Since this therapy has proven insufficient, today, among other solutions, pseudo-catalytic bioscavengers, enzymes designed with the aim to degrade OPs with turnover before it interacts with synaptic AChE, are investigated as prophylactics. We tested 17 oximes as reactivators of human AChE, BChE, Y337A and the Y337A/F338A mutant of AChE inhibited by tabun, VX and soman. The most effective oxime-enzyme couples identified were further tested *ex vivo* for degradation of tabun, VX or soman by oxime-enzyme assisted hydrolysis. It was shown that among the studied oximes there were those that in combination with the investigated enzymes could serve as pseudo-catalytic bioscavengers of tabun (oxime 1-hexyl-2-(hydroxyimino)methylpyridinium chloride (JAR288C) and Y337A mutant), VX (oxime HI-6 and Y337A/F338A mutant) and soman (oxime HI-6 and Y337A/F338A mutant). The tested oximes and AChE mutant pairs reactivated a high percentage of enzyme activity, achieving reactivation rate constants above 0.2 min^{-1} , oxime-mutant dissociation constants about $0.1 \text{ mol min}^{-1} \text{ dm}^{-3}$ and a rate of enzyme inhibition within the range of native AChE inhibition. These catalytic parameters represent the necessary criteria for oxime-enzyme induced OP degradation, i.e. for effective nerve agent pseudo-catalytic bioscavengers.

(XIX + 92 pages, 32 figures, 9 tables, 2 schemes, 166 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia and Institute for Medical Research and Occupational Health Library, Ksaverska cesta 2, Zagreb, Croatia.

Keywords: Acetylcholinesterase / Acetylcholinesterase mutants / Butyrylcholinesterase / Organophosphates / Reactivators /

Supervisor: Dr. Zrinka Kovarik, Research Advisor

Reviewers: Dr. Ines Primožič, Associate Professor
Dr. Zrinka Kovarik, Research Advisor
Dr. Jasna Vorkapić-Furač, Professor

Substitute: Dr. Ita Gruić Sovulj, Associate Professor

Thesis accepted: April 1st, 2015.

A blue arrow-shaped banner pointing to the right, containing the text § 1. UVOD.

§ 1. UVOD

§ 1. UVOD

Prijetnja koju predstavlja upotreba živčanih bojnih otrova u terorističke svrhe više je nego dovoljan razlog da se kontinuirano istražuju načini i sredstva za učinkovito suzbijanje toksičnih učinaka tih spojeva na ljudski organizam. Organofosforni (OP) spojevi kao što su živčani bojni otrovi (tabun, soman, VX) i pesticidi fosfiliraju kolinesteraze te djeluju kao progresivni ireverzibilni inhibitori.^{1,2} Ireverzibilna inhibicija acetilkolinesteraze (AChE), enzima čija je fiziološka funkcija hidroliza prijenosnika živčanih impulsa acetilkolina, uzrok je toksičnog efekta na organizam te u konačnici može dovesti do smrti. Nakon fosfilacije serina katalitičke trijade AChE (glutaminska kiselina-serin-histidin) moguće su tri daljnje reakcije: spontana reaktivacija vodom kao nukleofilom koja je toliko spora da se ne smatra relevantnom, dealkilacija koja se naziva starenje enzima i nakon koje enzim ostaje ireverzibilno inhibiran te reaktivacija aktivnosti fosfilirane AChE pomoću oksima.^{3,4} Oksimi su spojevi s oksimskom (NOH) skupinom i puno su jači nukleofili od vode.⁵ Djeluju tako da nukleofilnim napadom oksimske hidroksilne skupine na elektrofilni fosforov atom kidaju vezu između fosforovog atoma i katalitičkog serina enzima pri čemu nastaje slobodan enzim i fosfilirani oksim.^{6,7} Većina oksima su hidrofilni kvaterni amonijevi spojevi te zbog permanentnog pozitivnog naboja ne prelaze krvno-moždanu barijeru i time je učinkovitost njihove primjene ograničena uglavnom na periferni živčani sustav.⁸ Danas se kao terapija pri trovanju OP spojevima primjenjuje kombinacija antikolinergika (atropin), oksima i antikonvulziva (diazepam).^{1,2} Da bi bila djelotvorna, terapija se mora primijeniti u što kraćem vremenu nakon inhibicije, odnosno prije nego se OP spoj distribuira krvotokom do mozga i inhibira sinaptičku AChE. Za medicinsku upotrebu su odobreni tzv. klasični oksimi: pralidoksim (2-PAM), HI-6, obidoksim i trimedoksim (TMB-4).^{9,10} Međutim, reaktivacijski učinak tih oksima nije dostatan kada se radi o tabunom inhibiranoj AChE, između ostalog zbog tzv. steričkog štita¹¹ te u slučaju inhibicije AChE somanom gdje je problem brzo starenje nastalog konjugata (oko 2 min)¹² što onemogućava reaktivaciju. Osim toga, niti jedan od spomenutih oksima nema učinak univerzalnog reaktivatora koji je jednako učinkovit pri izloženosti različitim OP spojevima. U slučajevima kada se može očekivati izloženost živčanim bojnim otrovima, kao npr. na ratištu, predložena je primjena profilaktika. Uloga profilaktika je da štiti AChE od fosfilacije, bilo nekovalentnim interakcijama (oksimi¹³, biljni

alkaloidi^{14,15}) ili kratkotrajnim kovalentnim vezanjem (karbamati)¹⁵⁻¹⁷. U profilaksi se primjenjuje i ljudska butirilkolinesteraza (BChE) kao egzogeno biološko čistilo koje djeluje tako da ireverzibilno veže OP spoj te snizi njegovu koncentraciju prije nego on inhibira sinaptičku AChE.¹⁸ BChE je enzim srodan AChE koji ima slično aktivno mjesto, analogan mehanizam hidrolize supstrata te je isto tako podložna inhibiciji OP spojevima, ali bez posljedica opasnih po život jer nema esencijalnu fiziološku funkciju.^{4,19-21} Kao endogeni enzim distribuirana je u gotovo svakom tkivu, uključujući plazmu pa se može reći da djeluje i kao prirodno čistilo organizma od OP spojeva.^{4,19-21} Izvor egzogene BChE za profilaksu je ili ljudska plazma ili rekombinantna ljudska BChE.²²⁻²⁴ Međutim, BChE je stehiometrijsko čistilo, jedna molekula enzima veže jednu molekulu OP spoja. Osim toga, učinkovitost BChE ograničena je slabom reaktivacijom fosfiliranog enzima do sada poznatim oksimima te brzim starenjem konjugata OP spoja i BChE. Uz to je i proces proizvodnje rekombinantne BChE ili izolacije BChE iz ljudske plazme skup, a da bi enzim imao učinak stehiometrijskog čistila mora se primijeniti u visokim koncentracijama.²⁵ Stoga se danas proučavaju katalitička čistila poput enzima kojima su OP spojevi supstrati, kao što su paraoksonaza, kisela anhidrolaza, prolidaza, fungalna lakaza, hem-kloroperoksidaza, bakterijska fosfotriesteraza, itd.^{18,21,26} Također, u zadnje vrijeme se proučavaju i pseudokatalitička čistila koja podrazumjevaju primjenu egzogenog enzima u kombinaciji s oksimom koji će reaktivirati fosfilirani enzim. Primjenom takvog sustava enzima i oksima omogućila bi se ciklička reaktivacija inhibiranog enzima oksimom čime reaktivirana i slobodna molekula enzima može opetovano reagirati s OP spojem i tako razgraditi OP spoj prije nego fosfilira esencijalnu sinaptičku AChE. U svrhu pronalazanja učinkovitog pseudokatalitičkog čistila od iznimne je važnosti istraživanje inačica AChE nastalih uvođenjem mutacija koje bi omogućile ubrzanje defosfilacije te u slučaju inhibicije somanom i usporavanje starenja konjugata.^{27,28} Uz to je potrebno sintetizirati i nove oksime kao potencijalne reaktivatore, kako bi se pronašao oksim–enzim par koji bi djelovao kao uspješno pseudokatalitičko čistilo.²⁹⁻³¹

Cilj ove disertacije bio je odrediti djelotvoran sustav pseudokatalitičkog čistila za tabun, VX i soman. U tu svrhu odredio se reaktivacijski učinak 17 oksima, od kojih je 15 novih JAR oksima te dva klasična oksima, 2-PAM i HI-6. JAR oksimi dizajnirani su i sintetizirani u laboratoriju Barry K. Sharplessa, dobitnika Nobelove nagrade za kemiju 2001. godine. Detaljnom analizom reaktivacije tabunom, VX-om i somanom inhibiranih ljudskih AChE, dvije inačice AChE i BChE, izdvojeni su prema kinetičkim parametrima parovi oksima i

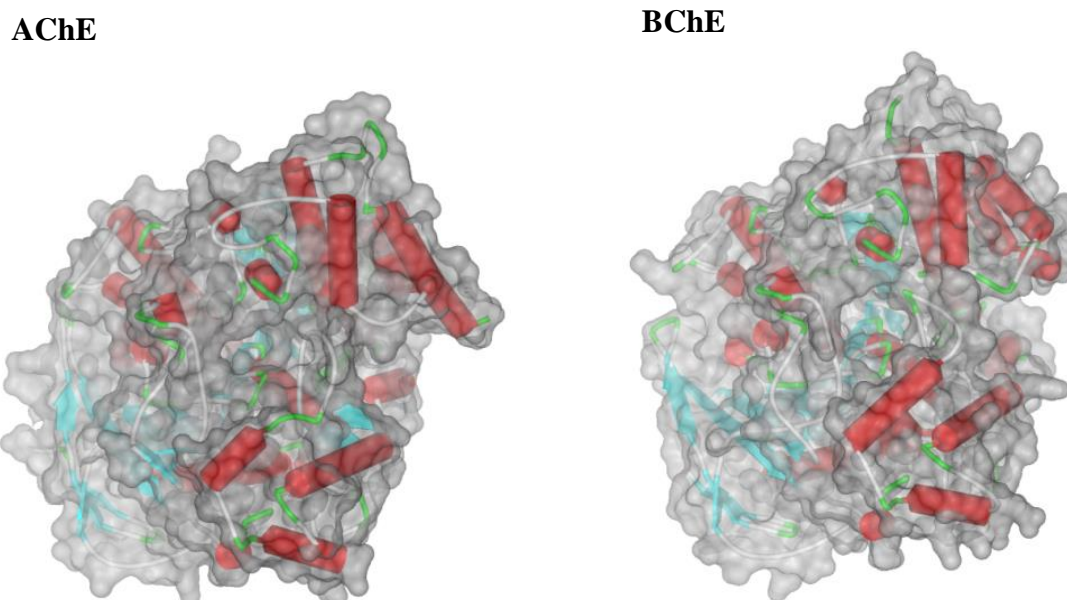
enzima za *ex vivo* ispitivanje oksim-enzim potpomognute razgradnje ovih živčanih bojnih otrova. Cilj je bio odrediti kriterije koji definiraju potencijal i učinkovitost oksim-enzim para kao pseudokatalitičkog čistila. Kako za ove toksične OP spojeve do sada nije pronađena odgovarajuća terapija, rezultati ove disertacije predstavljaju značajan doprinos u razvoju pseudokatalitičkih čistila kao profilaktika i/ili terapije.

§ 2. *LITERATURNI PREGLED*

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Kolinesteraze

Enzimi iz skupine kolinesteraza rasprostranjeni su u životinjskom i biljnom svijetu te se intenzivno istražuju zbog svojih važnih bioloških uloga. Još je početkom tridesetih godina prošlog stoljeća prepoznata uloga, tada se smatralo jednog enzima, u hidrolizi acetilkolina u uzorcima krvi kralježnjaka, prema čemu je taj enzim i nazvan kolinesteraza.^{32,33} Međutim, ubrzo je postalo jasno da se radi o dvije različite kolinesteraze, od kojih je jedna prisutna na eritrocitima, a druga u serumu te svaka pokazuje specifičnost prema određenim supstratima.^{33,34} Prema tome su i nazvane eritrocitna ili prava kolinesteraza i nespecifična ili pseudokolinesteraza.^{33,34} Temeljem daljnjih istraživanja kolinesteraza, 1948. godine predloženo je da se nazovu aceto- i butiro- kolinesteraza, odnosno acetilkolinesteraza (AChE) i butirilkolinesteraza (BChE) što je zadržano i do danas (**slika 2.1**).^{33,35}

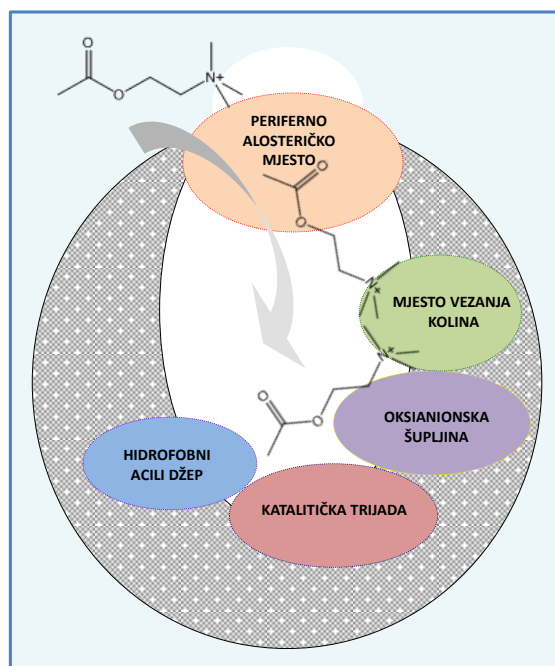


Slika 2.1. Kristalna struktura ljudske acetilkolinesteraze³⁶ i ljudske butirilkolinesteraze³⁷. Crvenom bojom označene su α -uzvojnice, plavom β -nabrane ploče, zelenom bojom petlje, a sivom površina enzima.

Prema enzimskoj nomenklaturi iz 1992. godine, kolinesteraze se svrstavaju u skupinu hidrolaza, podskupinu esteraza i podpodskupinu hidrolaza estera karboksilnih kiselina (EC 3.1.1).³⁸ S obzirom da su kolinesteraze građene od β -nabranih ploča okruženih α -uzvojnica, mogu se klasificirati i kao hidrolaze α/β strukture.³⁹

AChE (EC 3.1.1.7) i BChE (EC 3.1.1.8) produkti su transkripcije različitih gena i dijele oko 54 % homologije u primarnoj sekvenci te čak do 90 % u terciarnoj strukturi (**slika 2.1**).^{4,38,40} Usprkos velikoj homologiji, fiziološke funkcije, brzina katalize hidrolize supstrata i supstratna specifičnost ova dva enzima se razlikuju. Isto tako, BChE nije podložna alosteričkoj inhibiciji pri višim koncentracijama supstrata koja je karakteristična za AChE.^{4,41,42} Kolinesteraze se razlikuju i po selektivnosti prema određenim inhibitorima pa je tako npr. AChE za razliku od BChE inhibirana s BW284C51.⁴³⁻⁴⁶

Aktivno mjesto kolinesteraza oblika je ždrijela dubokog 20 Å i širokog 5 Å (**slika 2.2**). Pomoću kristalografije, mutageneze i specifičnosti vezanja liganada identificirano je pet strukturnih domena aktivnog mjesta: estersko mjesto koje sadrži katalitičku trijadu, mjesto vezanja kolina, oksianionska šupljina i acilni džep, a na rubu aktivnog mjesta smješteno je tzv. periferno mjesto enzima (**slika 2.2, tablica 2.1**).



Slika 2.2. Shematski prikaz aktivnog mjesta kolinesteraza s naznačenim strukturnim domenama i supstratom acetilkolinom. Strela označava smjer ulaska i pozicioniranja acetilkolina u aktivnom mjestu kolinesteraza.

Supstratna specifičnost nativnih kolinesteraza potječe od razlike u aminokiselinskoj strukturi acilnog džepa AChE i BChE (**tablica 2.1**).^{4,37,46,47} Prisutnost alifatskih aminokiselinskih ostataka u acilnom džepu BChE osigurava veći volumen u aktivnom mjestu enzima pa BChE, za razliku od AChE, može hidrolizirati supstrate veće od propionilkolina, kao npr. butirilkolin.⁴

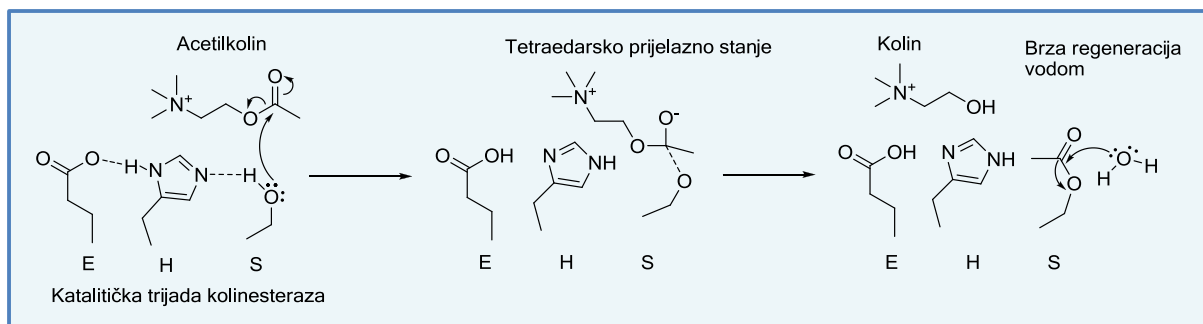
Tablica 2.1. Uloga strukturnih domena aktivnog mjesta ljudskih kolinesteraza i ključni aminokiselinski ostaci koji ostvaruju interakcije sa supstratom.^{4,37,46,47}

| Domene aktivnog mjesta kolinesteraza | Uloga domene | Ključni aminokiselinski ostaci* | |
|--------------------------------------|---|--|--|
| | | AChE | BChE |
| Katalitička trijada | Hidroliza supstrata | S ₂₀₃ H ₄₄₇ E ₃₃₃ | S ₁₉₈ H ₄₃₈ E ₃₂₅ |
| Oksianionska šupljina | Važna za stabilizaciju karbonilnog kisika supstrata stvaranjem vodikovih veza s prisutnim glicinima i alaninom pri formiranju tetraedarskog prijelaznog stanja za vrijeme hidrolize supstrata. | G ₁₈₈ G ₁₁₉ A ₂₀₂ | G ₁₁₆ G ₁₁₇ A ₁₉₉ |
| Acilni džep | Važan za smještanje acilnog dijela supstrata čime se određuje orijentacija supstrata prema katalitičkom serinu i ostatku enzima. Prisutni aminokiselinski ostaci određuju dimenzije acilnog džepa i time veličinu supstrata koji se mogu smjestiti u ždrijelo aktivnog mjesta kolinesteraza. | F ₂₉₅ F ₂₉₇ | L ₂₈₆ V ₂₈₈ |
| Mjesto vezanja kolina | Važno za stabilizaciju pozitivno nabijenog kvaternog dijela kolinskih supstrata. Zbog prisutnosti aromatskih aminokiselinskih ostataka, interakcije između veznog mjesta kolina i liganda su kation π -tipa. Triptofan ima ulogu u orijentaciji i smještanju nabijenog dijela supstrata što ubrzava hidrolizu kolinskih supstrata. | W ₈₆ Y ₃₃₇ F ₃₃₈ | W ₈₂ |
| Periferno mjesto | Uloga u selektivnoj inhibiciji kolinesteraza i inhibiciji AChE supstratom. U slučaju visoke koncentracije supstrata dolazi do njegovog vezanja na periferno mjesto AChE te do promjene konformacije enzima što onemogućava vezanje druge molekule supstrata u aktivno mjesto AChE. Time se alosteričkim mehanizmom inhibira katalitička aktivnost AChE. Aminokiselinski ostaci perifernog mjesta imaju ulogu i u selektivnoj inhibiciji AChE/BChE, tj. ostvaruju interakcije s inhibitorima specifičnim samo za jedan od enzima. Tako je npr. AChE selektivna prema BW284C51, a etopropazin je selektivni inhibitor BChE. ⁴⁴ | Y ₇₂ Y ₁₂₄ W ₂₈₆ | Y ₃₃₂ D ₇₀ |

*brojevi navedeni iza ključnih aminokiselinskih ostataka odnose se na njihov položaj u ljudskoj AChE, odnosno BChE.

Bez obzira na razlike u aminokiselinskoj građi nekih strukturnih domena aktivnog mjesta kolinesteraza mehanizam hidrolize supstrata je identičan i odvija se u tri koraka (**slika 2.3**). Nakon nastajanja reverzibilnog Michaelis-Menten-inog kompleksa između katalitičkog serina i acetilkolina te formiranja tetraedarskog prijelaznog stanja, dolazi do acilacije gdje se acilna skupina supstrata prenosi na enzim i nastaje acilirani enzim, a oslobađa se kolin.⁴ Acilirani enzim se zatim deacilira, tj. dolazi do regeneracije kolinesteraze vodom.⁴ Nukleofilnim

napadom molekule vode na acilirani enzim nastaje drugi produkt hidrolize acetilkolina, octena kiselina i slobodna kolinesteraza koja može katalizirati novi ciklus hidrolize supstrata.⁴



Slika 2.3. Mehanizam hidrolize supstrata kolinesteraza prikazan na primjeru hidrolize acetilkolina.

Enzimi iz skupine kolinesteraza, između ostalog, imaju važnu ulogu u liječenju neurodegenerativnih bolesti kao što su *Myastenia gravis*, Alzheimerova i Parkinsonova bolest.^{19,48,49} Međutim, nedavno su pronađeni i dokazi koji povezuju oba enzima s razvojem i napredovanjem Alzheimerove bolesti.^{46,50,51}

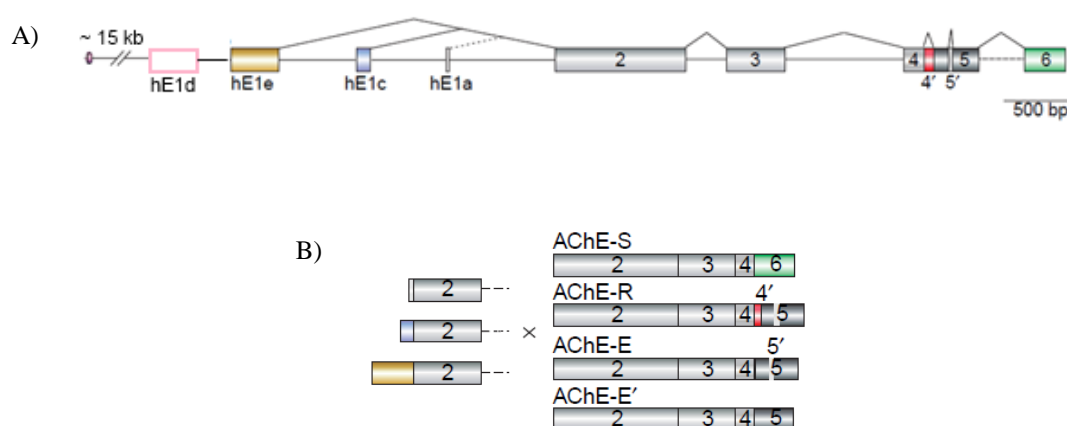
2.1.1. Acetilkinesteraza

AChE u visokim koncentracijama nalazimo u mozgu, mišićima i vezanu na membrane eritrocita.⁵² U kralježnjaka su AChE i BChE kodirane različitim genima koji se nalaze na različitim kromosomima. Gen za ljudsku AChE lokaliziran je na 7q22 kromosomu gdje zauzima 7 kb, a sam enzim kodiran je s 550 aminokiselina (69 kDa) (slika 2.4A).^{4,19}

AChE ima esencijalnu fiziološku ulogu u organizmu koja je ujedno i njena primarna funkcija. Naime hidrolizom živčanog prijenosnika acetilkolina (ACh) AChE kontrolira prijenos živčanih impulsa u kolinergičkim sinapsama centralnog i perifernog živčanog sustava. To je jedan od najučinkovitijih enzima u prirodi bez obzira što se aktivno mjesto AChE nalazi na dnu 20 Å dubokog ždrijela. Hidrolizira ACh brzinom od 400 000 min⁻¹ tako da je njegova hidroliza ograničena samo brzinom difuzije ACh u aktivno mjesto AChE.⁵³⁻⁵⁵ Hidrolizom ACh, AChE regulira njegovu koncentraciju u sinaptičkoj pukotini (slika 2.5). Za vrijeme živčanog podražaja nadolazeći živčani impuls pokreće ispuštanje ACh iz sinaptičkog mjehurića predsinaptičke membrane u sinaptičku pukotinu. ACh se veže na kolinergičke receptore, nikotinske koji se nalaze na postsinaptičkoj membrani kolinergičke sinapse ili

muskarinske, u autonomnim ganglijama, na stanicama glatkih mišićna, srčanim te endotelnim stanicama krvnih žila.⁵⁶ Vezanje ACh pokreće niz procesa koji rezultiraju depolarizacijom membrane i daljnjim prijenosom živčanog impulsa. Upravo brzom razgradnjom ACh u sinaptičkoj pukotini za koju je zadužena AChE prestaje prijenos impulsa i iznova se uspostavlja polarizacija postsinaptičke membrane.⁵⁶

Za sada su otkrivene četiri izoforme AChE. Jezgra ljudske AChE koja je zajednička svim izoformama enzima sastoji se od egzona E2, E3 i E4 (slika 2.4A).^{4,52,53}



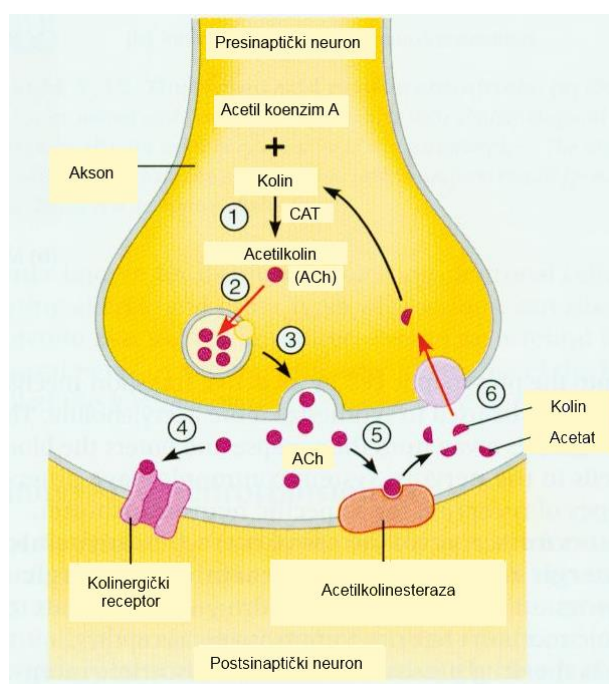
Slika 2.4. Struktura gena koji kodira ljudsku AChE.⁵³ A) Egzoni su označeni pravokutnicima i brojevima, a introni horizontalnim linijama. Linije koje povezuju egzone označavaju mogućnosti prekrajanja pre mRNA transkripta dobivenog ekspresijom s gena koji kodira ljudsku AChE. Alternativne verzije egzona E1 označene su s hE1a, hE1c, hE1e, hE1d. B) Brojevima 2, 3 i 4 su označeni egzoni E2, E3 i E4 koji čine jezgru AChE, 4' (pseudo-intron, I4') i 5' (kriptični intron, I5', izostavljen u tumorskim stanicama) te egzoni 5 i 6 (E5 i E6) označavaju alternativne mogućnosti, tj. njihovim alternativnim pridruživanjem egzonom koji čine jezgru AChE tijekom prekrajanja pred mRNA transkripta nastaju mRNA koje kodiraju različite izoforme AChE (AChE-S; AChE-R; AChE-E; AChE-E').⁵³

E1 je nekodirajući egzon i u ljudskoj AChE postoje njegove četiri alternativne verzije (hE1a, hE1c, hE1e i hE1d), što znači da postoje i četiri alternativna 5' promotora s kojih može započeti transkripcija.^{52,53,57,58} Svaki od četiri alternativna egzona E1 može se eksprimirati s četiri alternativna 3' transkripta pa u konačnici može nastati 16 alternativnih oblika izoformi ljudske AChE, odnosno svaka od četiri moguće izoforme AChE može započeti s jednim od četiri različita egzona E1.^{53,57} Što utječe na to s kojeg od alternativnih promotora će započeti transkripcija još nije razjašnjeno, ali smatra se da bi stres mogao biti jedan od čimbenika.⁵⁹ Na 3' kraju gena nalaze se pseudo-intron (I4') i kriptični intron (I5') te egzoni E5 i E6 čijim

alternativnim pridruživanjem egzonima koji čine jezgru AChE prekrajanjem (engl. *splicing*) pred mRNA transkripta tijekom post-transkripcijskih modifikacija nastaju četiri različite izoforme AChE (**slika 2.4B**).^{52,53,60} Ampifatska izoforma AChE-S (S kao sinaptička) još je poznata i kao T jer je vezana proteinskim repom (engl. *tail*) za membranu, a zastupljena je u mozgu i mišićnom tkivu.⁵² Na C (5') kraju nalazi se tzv. T peptid dug 40 aminokiselina koji u aminokiselinskom slijedu sadrži cistein što omogućuje oligomerizaciju globularnih formi AChE-S i povezivanje nastalih tetramera kako bi nastale asimetrične forme.^{4,52,53,61} Homomerne forme uključuju monomere, dimere i tetramere, a heteromerne su vezane za membranu neuromuskularnih veza pomoću kolagen Q (ColQ) proteinskog repa ili na sinapse u mozgu putem hidrofobnog proteina koji ima veliki broj prolina u svojoj sekvenci (PRiMA-*proline rich membrane anchor*).^{53,61} AChE-E (E – eritrocitna ili H – hidrofobna) je dimerna izoforma AChE. Na C kraju ima peptid dug 43 aminokiseline koji se naknadno cijepa nakon 14. aminokiselinskog ostatka egzona E5 i povezuje s glikofosfatidilinozitolom pa se AChE-E pomoću glikofosfatidilinozitolnog (GPI) sidra veže za membranu eritrocita.^{52,58,59} Treća izoforma AChE-R (R - *readthrough*) eksprimirana je u velikim količinama u slučaju neurodegenerativnih bolesti i poremećaja izazvanih stresom dok se tek u manjem postotku javlja u zdravom tkivu. Nastaje zadržavanjem pseudo-introna I4' (**slika 2.4B**). Translacijom takve mRNA nastaje proteinski produkt kraći na C kraju i bez cisteinskog ostatka koji bi mu omogućio oligomerizaciju pa je AChE-R izoforma isključivo monomerna i topljiva, a najzastupljenija je u sinaptičkoj pukotini.^{52,53,61} Smatra se da AChE-R ima ulogu u obrani organizma i ublažavanju neželjenih posljedica izloženosti stresu ili drugim štetnim faktorima.⁶² U tumorskim staničnim linijama ljudskog porijekla pronađena je još jedna izoforma nazvana AChE-E' iz čijeg je transkripta isključen kriptični intron I5' (inače sadržan unutar egzona E5 u drugim izoformama), što daje 36 baza kraći transkript od onog AChE-E (**slika 2.4B**).⁵³ Iako su E1 alternativnim egzonima uglavnom kodirane netranslatirjuće regije, translacijom ljudskih mRNA transkripata koji sadrže hE1d egzon nastaje AChE-S, -E ili -R s produženim N krajem (tzv. N-AChE) koji se može povezati s plazmatskom membranom ljudskih stanica što bi možda moglo omogućiti vezanje AChE-R za sinaptičku membranu bez pomoći ColQ ili PRiMA proteina.^{53,57,58}

Najčešća postranslacijska modifikacija proteina je glikozilacija. Ljudska AChE sadrži tri konzervirana asparaginska mjesta vezanja kompleksnih ugljikohidratnih ostataka: N₂₆₅, N₃₅₀ i N₄₆₄.^{63,64} Uloga glikozilacije na funkciju AChE još nije u potpunosti razjašnjena. Za sada se

zna da je glikozilacija važna za učinkovitu biosintezu i izlučivanje AChE iz stanice, temperaturnu i cirkulacijsku stabilnost enzima te osjetljivost na pojedine inhibitore.^{63,64} Smatra se i da bi glikozilacija mogla utjecati na funkcije koje AChE ima u razvoju i diferencijaciji stanica.^{53,64} Međutim, prema sadašnjim spoznajama, izostanak glikozilacije na jednom ili više asparagina nema utjecaja na katalitičku aktivnost enzima.



Slika 2.5. Sinteza i hidroliza neurotransmitera acetilkolina (ACh).⁵⁶ U predsinaptičkom neuronu acetil-transferaza (ACT) katalizira sintezu ACh iz acetilkoenzima A i kolina uz oslobađanje koenzima A (1). ACh se pakira u transportne vezikule (2) i izlučuje egzocitozom u sinaptičku pukotinu (3) gdje se veže na kolinergičke receptore smještene na postsinaptičkom neuronu (4). ACh se u sinaptičkoj pukotini hidrolizira pomoću AChE (5) te se nastali kolin prenosi prijenosom visokog afiniteta natrag u predsinaptički neuron (6) gdje se koristi u sintezi ACh.

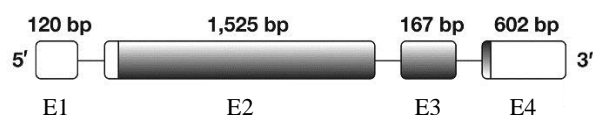
Uloga AChE u organizmu nije ograničena isključivo na njenu hidrolitičku funkciju tijekom neurotransmisije (**slika 2.5**). Naime, AChE je eksprimirana još za vrijeme embriogeneze, odnosno za vrijeme razvoja embrionalnih neurita i mišića, a pronađena je i u nekolinergičkim neuronima odraslih osoba, u hematopoetskim, osteogenim i raznim neoplastičnim stanicama.⁶² Dakle, potvrđena je njena uloga u neuritogenezi, adheziji, odnosno interakciji među stanicama, proliferaciji i apoptozi, sinaptogenezi, aktivaciji dopaminskih neurona, stvaranju amiloidnih vlakana karakterističnih za Alzheimerovu bolest, hematopoezi i

trombopoezi. Povezuje se i s bolestima mrežnice, tj. smatra se da ima ulogu u razvoju fotoreceptora.^{52,62,65}

2.1.2. Butirilkolinesteraza

BChE se nalazi u centralnom i perifernom živčanom sustavu, gušterači, jetri, crijevima, srcu, bubrezima, plućima i plazmi, odnosno serumu.^{4,19,20,66} U odnosu na AChE, ljudsko tijelo sadrži 10 puta više BChE.⁶⁶ Ljudsku BChE čine 574 aminokiseline (85 kDa), a gen kojim je kodirana lokaliziran je na 3q26 kromosomu gdje zauzima 70 kb (slika 2.6).^{4,19}

Bez obzira što fiziološka uloga BChE nije esencijalna poput uloge AChE, svejedno je od iznimne biološke važnosti za organizam. Uloga BChE nije bitno izražena u neurotransmisiji, ali u određenim slučajevima može zamijeniti AChE u hidrolizi ACh, naravno manje učinkovito. Naime, AChE "knock-out" miševi, iako su pokazivali poteškoće u fizičkom razvoju, preživjeli su 21 dan što pokazuje da u odsutnosti AChE kontrolu razine ACh može kratkoročno preuzeti BChE.⁶⁷ Osim spomenute esterazne funkcije BChE ima i aril acilamidaznu aktivnost čija funkcija još nije poznata te peptidaznu aktivnost koja se očituje u sintezi β -amiloidnih proteina i formiranju β -amiloidnih plakova karakterističnih za Alzheimerovu bolest.^{19,46,66} Poznato je da ima ulogu i u metabolizmu lipida i lipoproteina te diferencijaciji živčanog tkiva i regulaciji razine ACh u glatkim mišićima.^{19,46}



Slika 2.6. Struktura gena kojim je kodirana ljudska BChE. Gen zauzima 70 kb na kromosomu 3 i sastoji se od četiri egzona (E1-E4) te od tri introna.^{4,19} Sivo su označene protein kodirajuće regije.

Koliko je do sada poznato, BChE ne podliježe alternativnom prekrajanju na 3' kraju pa ne nastaju alternativne izoforme BChE ekspresijom pred mRNA transkripta kojim je kodirana BChE. Međutim, moguće su točkaste mutacije (insercije i delecije) i pomaci u okviru čitanja genetičkog koda (engl. *frameshift*) što rezultira pojavom od oko 65 poznatih prirodnih inačica ljudske BChE koje pokazuju različitu razinu enzimске aktivnosti.⁶⁸ Iako većina ljudi ima tzv. uobičajenu BChE, razlikujemo i inačice sa smanjenom katalitičkom aktivnošću (atipičnu, K, J i F inačicu), više od 30 različitih tih (engl. *silent*) inačica s katalitičkom aktivnošću do 2 %

uobičajene katalitičke aktivnosti te one s povišenom katalitičkom aktivnošću u odnosu na uobičajenu BChE (C5+, Cynthiana i Johannesburg inačica).^{19,46,69,70} Pojedinci koji imaju neku od tih inačica BChE nemaju za život opasnih posljedica. Međutim, takve osobe su osjetljivije na inhibitorno djelovanje organofosfornih (OP) spojeva, a s obzirom da BChE sudjeluje u metabolizmu velikog broja lijekova i ksenobiotika njihove doze se moraju prilagoditi ili je potrebno takve spojeve u potpunosti isključiti iz upotrebe.^{19,46} BChE između ostalog, hidrolizira kokain, aspirin i mišićni relaksans sukcinildikolin koji se koristi kao anestetik pa u slučaju nedostatka ili smanjene aktivnosti BChE dolazi do pojave produžene apneje.^{19,46} BChE je i jedini enzim u organizmu koji hidrolizira heroin.^{19,46} Sudjeluje i u aktivaciji nekih pred-lijekova pa tako i u biotransformaciji bambuterola u terbutalin koji ima antiasmatični učinak.^{19,46}

BChE se, kao i AChE, javlja u različitim molekulskim formama, uključujući monomere i oligomere. Na plazmatskim membranama mišićnih stanica, eritrocita i limfocita najzastupljenija je dimerna forma koja je GPI sidrom vezana na membranu. Monomerne i dimerne forme su zastupljene u mozgu, mišićima i crijevima, a u centralnom živčanom sustavu i neuro-muskularnim vezama nalaze se ColQ i PRiMA forme dok je u plazmi, tj. serumu najzastupljenija tetramerna forma.^{19,46}

Mehanizam hidrolize supstrata i strukturne domene aktivnog mjesta AChE i BChE su analogne. Međutim, za aktivno mjesto BChE karakteristično je da se umjesto 14 aromatskih aminokiselinskih ostataka prisutnih u AChE, ovdje nalazi 6 alifatskih i 8 aromatskih aminokiselinskih ostataka zbog čega BChE ima veći volumen aktivnog mjesta te time i više prostora za smještanje većih supstrata kao što je butirilkolin. Zbog ove razlike u aminokiselinama AChE i BChE pokazuju različitu osjetljivost prema određenim inhibitorima.^{43,45,46}

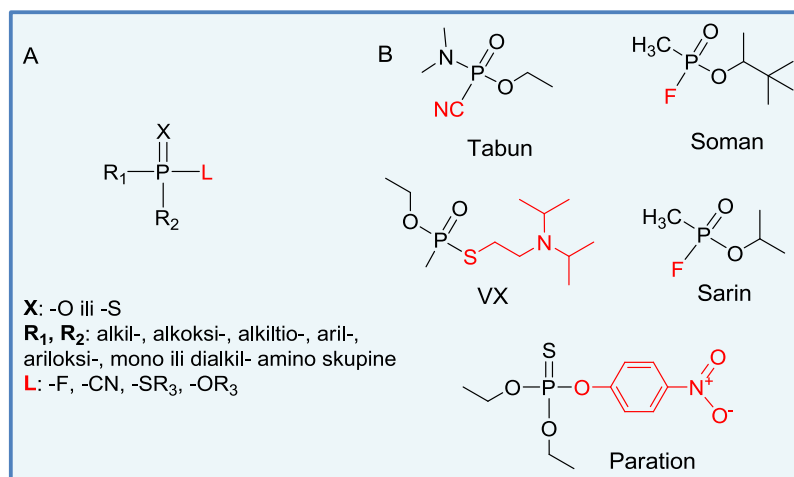
BChE je za razliku od AChE visoko *N*-glikozilirani protein.^{19,71,72} Na devet aminokiselinskih ostataka asparagina kovalentno su vezani kompleksni ugljikohidrati na koje otpada čak do 30 % od ukupne mase proteina.^{4,19,64,72} Tako veliki broj kompleksnih ugljikohidrata predstavljao je problem pri rješavanju kristalne strukture BChE koja je objavljena tek 2003. godine nakon što su uvedene višestruke mutacije (asparagina u glutamin) čime su se uklonila mjesta za glikozilaciju.^{37,73} Glikozilacija ima ulogu u smatanju, izlučivanju i stabilnosti proteina općenito pa tako i BChE, a smatra se da upravo visoki stupanj glikozilacije omogućava dugotrajnu stabilnost BChE u plazmi, tj. cirkulaciji, gdje je

najzastupljenija i gdje je njezina aktivnost najizraženija^{4,64,72,74}.

Budući da organofosforni spojevi inhibiraju BChE, ona djeluje kao prirodno čistilo organizma od tih spojeva. Zato se danas sve više istražuje upotreba uobičajene BChE izolirane iz ljudske plazme ili rekombinantne BChE kao biološkog čistila. Takva BChE može se primijeniti u obliku profilakse. U slučaju izloženosti visoko toksičnom organofosfornom spoju djelovala bi kao stehiometrijsko čistilo pa bi se koncentracija takvog spoja smanjila stvaranjem ireverzibilnih interakcija s BChE, čime bi se nativna AChE zaštitila od inhibicije.^{21,75,76}

2.2. Organofosforni spojevi

Organofosforni (OP) spojevi su esterski, amidni ili tiolni derivati fosforne, fosfonske ili fosfinske kiseline. Središnji fosforov atom OP spoja je peterovalentan, a osim dvostrukom vezom vezanog kisika ili sumpora, drugi i treći supstituent (R_1 , R_2) može biti aromatska ili alifatska skupina. Četvrti supstituent koji tvori najslabiju vezu s fosforovim atomom je tzv. izlazna skupina (L) (slika 2.7A).



Slika 2.7. A) Opća formula organofosfornih spojeva. B) Živčani bojni otrovi (tabun, soman, sarin, VX) i pesticid paration.

U skupinu OP spojeva pripadaju spojevi s različitim fizikalnim, kemijskim, biološkim i toksikološkim svojstvima. Prvi OP spojevi sintetizirani su u 19. stoljeću, ali se je tek početkom 20. stoljeća spoznalo njihovo pesticidno djelovanje te su se istraživanja vezana uz

OP spojeve razvijala u tom smjeru. Danas je raznolikost OP spojeva velika pa se tu ubrajaju živčani bojni otrovi i neki pesticidi (**slika 2.7B**), ali i razni retardanti, emulgatori, uljni aditivi i sl.⁷⁷ OP spojevi stvaraju interakcije sa serinskim esterazama: AChE, BChE, esterazom povezanom s neuropatskim djelovanjem (NTE), karboksilesterazom (CaE), s tripsinom i kimotripsinom te s hidrolazama fosfornih triestera: arildialkilfosfatazama, paraoksonazama (PON) i diizopropil-fluorofosfatazom (DFP).^{17,78} Strukturni su analozi prijelaznog stanja hidrolize acetilkolina pa djeluju kao jaki ireverzibilni inhibitori serinskih esteraza dok su supstrati za hidrolaze fosfornih triestera.⁷⁸ Vrlo su lipofilni i moguće je njihovo zadržavanje u masnom tkivu, tj. adipoznim stanicama odakle se tijekom vremena mogu otpuštati npr. u slučaju izloženosti organizma stresnim situacijama kao što su bolest, dugotrajna terapija lijekovima, povećana fizička aktivnost, mršavljenje i slično te tako mogu uzrokovati reinhibiciju serinskih esteraza.⁷⁹

2.2.1. Živčani bojni otrovi

Živčani bojni otrovi su izrazito toksični OP spojevi čija je primarna meta u organizmu sinaptička AChE.¹⁷ Ireverzibilna (progresivna) inhibicija AChE uzrokuje ozbiljne posljedice u organizmu što u konačnici može dovesti do smrti, ovisno o koncentraciji živčanog bojnog otrova kojoj je organizam izložen. S obzirom da fosfilirana AChE gubi svoju fiziološku funkciju dolazi do nakupljanja acetilkolina te trajne zasićenosti i prekomjerne stimulacije kolinergičkih (muskarinskih i nikotinskih) receptora u centralnom i perifernom živčanom sustavu pa se javlja tzv. kolinergička kriza što se manifestira pojavom simptoma kao što su paraliza mišića, napadi i respiratorna depresija (**tablica 2.2**).^{1,80,81} Do pojave simptoma dolazi ako je inhibirano iznad 50 % sinaptičke AChE, a smrt nastupa u slučaju inhibicije više od 90 % sinaptičke AChE.¹⁷ Zato je u slučaju izloženosti OP spojevima vrlo važno pravovremeno primijeniti terapiju, odnosno prije nego se OP spoj distribuira u organizmu do ciljanih tkiva i mozga, ili pohrani u adipoznim tkivima.

Prvi živčani bojni otrov nazvan tabun sintetizirao je 1936. godine njemački kemičar Gerhard Schrader, prvotno u potrazi za novim OP pesticidima. Zbog primijećene visoke toksičnosti za ljude razvijena je njegova primjena kao kemijskog oružja. Isti kemičar sintetizirao je i sarin 1937., a još je jedan Nijemac, Richard Kuhn, zaslužan za sintezu somana 1944. godine.^{77,80} Ovi spojevi sintetizirani u Njemačkoj pripadaju tzv. G seriji (GA - tabun, GB - sarin, GD – soman, **slika 2.7, tablica 2.3**) i vrlo su hlapljivi pa su najopasniji u obliku

aerosola, odnosno kada se udahnu. Druga skupina živčanih bojnih otrova je tzv. V serija čiji je najznačajniji predstavnik VX sintetiziran 1952. godine u Velikoj Britaniji (**slika 2.7, tablica 2.3**). Jednako je toksičan i kada se udahne i kada se apsorbira preko kože.⁸⁰ VX je ujedno i najpotentniji, tj. najtoksičniji živčani bojni otrov jer je za razliku od spojeva G serije stabilniji, manje hlapljiv, administrira se u organizam jednako učinkovito i inhalacijom i preko kože te je duže postojan u okolišu (**tablica 2.3**).^{80,82}

Tablica 2.2. Neki od simptoma koji se manifestiraju u organizmu nakon ireverzibilne inhibicije AChE podijeljeni prema tipu receptora (nikotinski i muskarinski) i stimulaciji centralnog ili perifernog živčanog sustava.^{1,80,81}

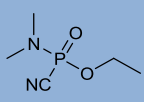
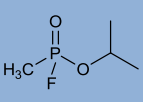
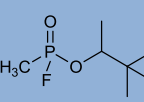
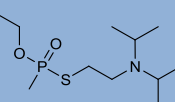
| | Muskarinski simptomi | Nikotinski simptomi |
|---------------------------------|--|--|
| Periferni živčani sustav | Egzokrine žlijezde: rinoreja suzenje slinjenje znojenje | tahikardija hipertenzija mišićna slabost konvulzije |
| | Glatki mišići: abdominalni grčevi dijareja učestalo uriniranje bradikardija | paraliza skeletnih mišića, uključujući dijafragmu i interkostalne mišiće |
| Centralni živčani sustav | Nikotinski i muskarinski simptomi | |
| | vrtoglavica glavobolja anksioznost nemir tremor zbunjenost pad koncentracije konvulzije respiratorna depresija | |

Tijekom 1940-ih godina u Njemačkoj, SAD-u, SSSR-u te kasnije u Libiji i Iraku proizvedena je i uskladištena velika količina živčanih bojnih otrova.^{17,80} Međutim, nema dokaza da su bili korišteni za vrijeme II. svjetskog rata, ali se njihova upotreba povezuje s Vijetnamskim i Zaljevskim ratom sredinom 1990-ih te u novije vrijeme s terorističkim napadima.^{17,80}

Svi živčani bojni otrovi su kiralni spojevi. Tabun, sarin i VX imaju jedan kiralni centar na fosforovom atomu što znači da imaju dva izomera (P_+ i P_-) dok soman ima kiralni centar i na ugljikovom atomu pinakolilne skupine tako da ima po dva diastereoizomera, tj. četiri izomera (C_+P_+ ; C_+P_- i C_-P_- ; C_-P_+).^{83,84} Izomeri imaju različita toksikološka svojstva i inhibiraju kolinesteraze različitom brzinom.^{84,85} Do razlika dolazi zbog asimetričnosti ždrijela aktivnog

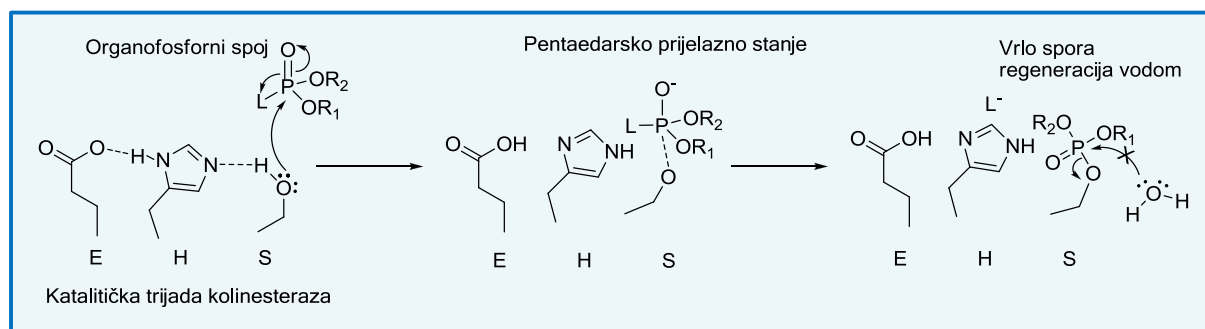
mjesta kolinesteraza, stoga AChE (a i BChE) pokazuje enantioselektivnost preferirajući tako vezanje jednog enantiomera.^{17,85,86} U slučaju tabuna i VX-a pokazano je da su izomeri *S* (-) konfiguracije potentniji i toksičniji inhibitori AChE od izomera *R* (+) konfiguracije.⁸⁴ Kada se govori o somanu, Benschop i sur. su pokazali da su diastereoisomeri s (-) konfiguracijom na atomu fosfora 20-50 puta toksičniji od P₊C_{+/-} para diastereoisomera, a i brzina inhibicije AChE je za 3-4 reda veličine viša s P₋ izomerima nego sa P₊ izomerima.^{84,87} Međutim, kada se govori o C_{+/-} P₋ izomerima, C₊ P₋ izomer oko 2 puta brže inhibira AChE, dok je zato C₋ P₋ oko 3 puta toksičniji.⁸⁴

Tablica 2.3. Fizikalna, kemijska i toksikološka svojstva nekih živčanih bojnih otrova.^{80,82}

| | TABUN (GA) | SARIN (GB) | SOMAN (GD) | VX |
|--|---|---|--|---|
| |  |  |  |  |
| Kemijsko ime | Etil- <i>N,N</i> -dimetil fosforamidocijanidat | Izopropilmetil fosfonofluoridat | 1,2,2-trimetilpropil metilfosfonotiolat | <i>O</i> -etil- <i>S</i> -(2-diizopropilaminoetil) metilfosfonotiolat |
| Kemijska formula | C ₅ H ₁₁ N ₂ O ₂ P ₂ | C ₄ H ₁₀ FO ₂ P | C ₇ H ₁₆ FO ₂ P | C ₁₁ H ₂₆ NO ₂ PS |
| Izgled, miris | Bistra do smečkasta tekućina, voćnog mirisa | Bistra tekućina, bez mirisa | Bistra tekućina, voćnog mirisa ili po kamforu | Gusta bistra do žućkasta tekućina, bez mirisa |
| Hlapljivost (mg/m³, 25°C) | 576-610 | 16400-22000 | 3060-3900 | 3-30 |
| Postojanost u okolišu | 24-36 h (t _{1/2}) | 2-24 h | Relativno postojan | 2-6 dana |
| LD₅₀ (mg/kg) (ljudi)* (p.c.) | 14-21 | 24 | 5 | 0,04 |

p.c. *per cutem* - preko kože; * procijenjeno prema životinjama

Živčani bojni otrovi su izrazito potentni ireverzibilni inhibitori kolinesteraza.² Mehanizam interakcije kolinesteraza i živčanih bojnih otrova analogan je mehanizmu hidrolize supstrata (slika 2.8).^{88,89} Tako se pri inhibiciji AChE živčanim bojnim otrovom, ili bilo kojim drugim OP spojem, formira pentaedarsko prijelazno stanje, nakon čega slijedi fosfiliranje enzima i otpuštanje izlazne skupine OP spoja.^{80,88,89} Razlika između spontane hidrolize supstrata i OP spoja je u brzini reakcije s vodom, naime deaciliranje AChE je puno brže od defosfilacije koja je zanemariva (može trajati satima, pa čak i danima).^{88,89}

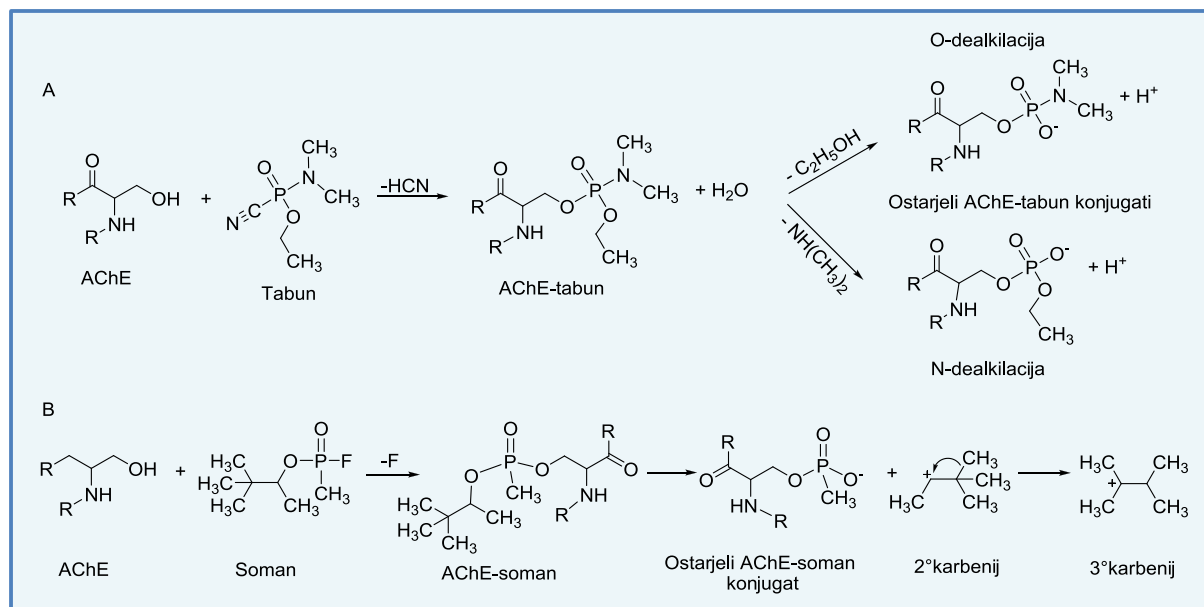


Slika 2.8. Mehanizam fosfilacije kolinesteraza živčanim bojnim otrovima (analogno i za druge OP spojeve). L označava izlaznu skupinu, a R_{1,2} označavaju supstituente kod organofosfornog spoja.

Nakon fosfilacije kolinesteraza moguće su tri reakcije. Jedna je već spomenuta spontana reaktivacija enzima vodom koja je zbog sporosti zanemariva. Druga moguća reakcija je dealkilacija ili starenje enzima pri čemu OP-AChE konjugat postaje negativno nabijen što onemogućava njegovu reaktivaciju, odnosno nukleofilni napad oksima ili vode. Starenje VX-AChE konjugata odvija se dealkilacijom alkoksi-supstituenta, tj. tzv. *O*-dealkilacijom pri čemu nastali oksianion formira ionsku vezu s protoniranim histidinom katalitičke trijade što dodatno stabilizira nastali konjugat i onemogućuje reaktivaciju AChE negativno nabijenim nukleofilima.^{90,91} U slučaju tabuna postoje dokazi da do starenja može doći osim gore spomenutom *O*-dealkilacijom i tzv. *N*-dealkilacijom (deaminacijom), odnosno cijepanjem P-N veze (**slika 2.9A**).⁹²⁻⁹⁴ Pretpostavlja se da do starenja soman-AChE konjugata dolazi tzv. "push-pull" mehanizmom, a smatra se da je izrazito brzo zbog formiranja terciarnog karbenija premještanjem metilne skupine sa sekundarnog pinakolilnog karbenija (**slika 2.9B**).^{17,95,96} Brzina dealkilacije razlikuje se ovisno o živčanom bojnom otrovu koji je u konjugatu s AChE, a ovisi o pH i temperaturi. Tako poluvrijeme starenja ($t_{1/2}$) pri pH 7,4 i 37 °C iznosi 19 h za tabun, 3 h za sarin, 37 h za VX, a za soman svega oko 2,5 min.^{78,97} Treća moguća reakcija je reaktivacija fosfiliranih kolinesteraza pomoću oksima koji su jači nukleofili od vode.

Iako je razvoj, proizvodnja, skladištenje i korištenje živčanih bojnih otrova zabranjeno Konvencijom o kemijskom oružju koja je stupila na snagu 1993. godine, a čije su potpisnice velik broj zemalja svijeta, živčani bojni otrovi su i dalje velika opasnost i prijetnja za čovječanstvo. Razne terorističke skupine ne prezaju od njihovog korištenja, čemu smo imali priliku svjedočiti, između ostalog, 1995. godine kada se dogodio teroristički napad u japanskoj podzemnoj željeznici,⁹⁸ ali i 2013. godine u Siriji, a u oba slučaja upotrijebljen je

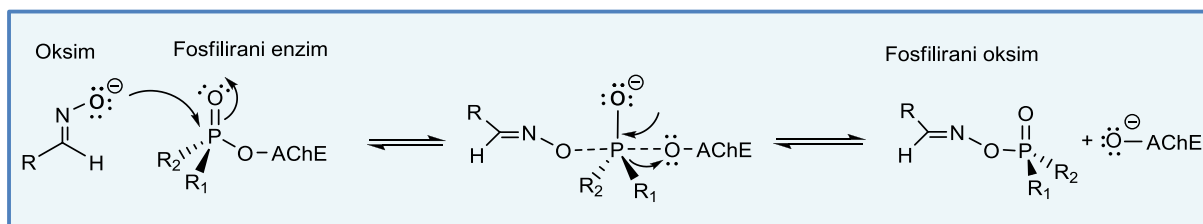
sarin. Zbog toga su istraživanja usmjerena na pronalaženje učinkovitih protuotrova, ali i zaštitnih mjera u obliku profilakse, od velikog značaja.



Slika 2.9. Mehанизam starenja A) AChE-tabun konjugata *O*- i *N*- dealkilacijom i B) AChE-soman konjugata "push-pull" mehanizmom.^{17,94}

2.3. Reaktivatori fosfiliranih kolinesteraza

Fosfilirane kolinesteraze mogu se reaktivirati, odnosno vratiti katalitičku aktivnost, djelovanjem nukleofila. U slučaju kada je taj nukleofil voda govorimo o spontanoj reaktivaciji, koja je, kao što je već ranije spomenuto, kod fosfiliranih kolinesteraza toliko spora da je zanemariva. Međutim, 1950-ih je pokazano da hidroksilamin i nikotinhidroksilaminska kiselina mogu reaktivirati inhibiranu AChE što je dovelo do pretpostavke da bi i drugi spojevi koji sadrže ionizacijsku NOH (oksimsku) skupinu mogli pokazati učinkovitost u reaktivaciji.⁹⁹ Upravo su se oksimi, heteroaromatski spojevi s kvaternim dušikom i NOH skupinom, pokazali takvima. Naime, nukleofilnim napadom oksimske hidroksilne skupine na elektrofilni fosforov atom dolazi do kidanja veze između fosforovog atoma i AChE. Nastaje slobodan enzim i fosfilirani oksim (**slika 2.10**). Kvaterni dušik oksima ostvaruje interakcije s aminokiselinskim ostatcima mjesta vezanja kolina u ždrijelu aktivnog mjesta AChE te tako sudjeluje u pozicioniranju, tj. orijentaciji oksima kako bi se oksimska skupina, tj. oksimatni anion našao na što optimalnijoj udaljenosti od fosfiliranog katalitičkog serina (5-6 Å) da bi moglo doći do nukleofilnog napada.

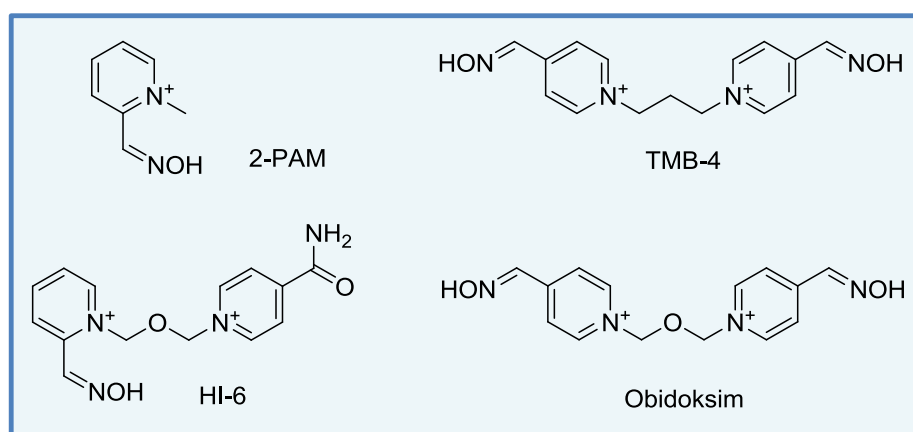


Slika 2.10. Mehanizam reaktivacije fosfilirane AChE oksimom. R = aromatski prsten ili ugljikovodični lanac, R₁, R₂ označavaju supstituente kod OP spoja.

U drugoj polovici 20. stoljeća sintetiziran je pralidoksim (2-PAM) te biskvaterni spojevi kao što su trimedoksim (TMB-4), obidoksim i HI-6 koji su danas u kliničkoj upotrebi kao tzv. klasični reaktivatori inhibiranih kolinesteraza (**slika 2.11**).^{17,81} Međutim, niti jedan od spomenutih oksima nije univerzalni reaktivator podjednako učinkovit u reaktivaciji aktivnosti kolinesteraza inhibiranih različitim OP spojevima. 2-PAM je djelotvoran u slučaju inhibicije AChE sarinom i VX-om, obidoksim u slučaju inhibicije sarinom, VX-om i tabunom dok je HI-6 učinkovit reaktivator sarinom i VX-om inhibirane AChE, a pokazuje i djelomičan učinak u reaktivaciji AChE fosfonilirane somanom.^{17,81} S obzirom da su svi ovi oksimi hidrofilni kvaterni amonijevi spojevi i kao takvi ne mogu prijeći krvno-moždanu barijeru njihov učinak je ograničen uglavnom na periferni živčani sustav. Koncentracija spomenutih oksima u mozgu ne prelazi 10 % njihove koncentracije u plazmi tako da mogu reaktivirati tek mali dio inhibirane AChE u mozgu.⁸ Danas su sintetizirani i istražuju se spojevi (oksimi) dizajnirani s ciljem da prolaze krvno-moždanu barijeru i djeluju kao učinkoviti reaktivatori inhibiranih kolinesteraza.^{31,100-102} Osim što nisu jednako učinkoviti reaktivatori kolinesteraza inhibiranih različitim OP spojevima, oksimi nisu ni dovoljno jaki nukleofili kako bi mogli reaktivirati ostarjeli OP-AChE konjugat. K tome mogu biti toksični, a moguće je da stvaraju i interakcije s drugim makromolekulama u organizmu što dodatno ograničava njihovu primjenu u terapiji trovanja OP spojevima.^{17,81}

Reaktivacijski učinak oksima osim o strukturi oksima ovisi i o strukturi konjugata OP spoja i kolinesteraze. Slaba učinkovitost oksima u slučaju inhibicije tabunom je i danas predmet istraživanja. Jedan od razloga je supstituirana amino skupina tabuna koja sterički zaklanja pristup oksimske skupine k elektrofilnom fosforu tabuna vezanog na katalitički serin.¹⁰³ Također, zbog slobodnog elektronskog para dušika amino skupine moguće je stvaranje rezonancijskih struktura tabuna pa oksimska skupina vjerojatno nije dovoljno jak

nukleofil da reaktivira takve strukture konjugata.¹¹ Isto tako, pomak fenilalanina na položaju 338 (mjesto vezanja kolina) pri formiranju tabun-AChE konjugata smanjuje volumen aktivnog mjesta i utječe na smještanje oksima.^{94,104} Tako se HI-6 ne može optimalno pozicionirati da bi bio uspješan reaktivator tabun-AChE konjugata. Steričke smetnje uzrokuje i supstituirana razgranata pinakolilna skupina somana, ali u slučaju reaktivacije soman-AChE konjugata primarni problem je brzo starenje tog konjugata.¹⁰⁵



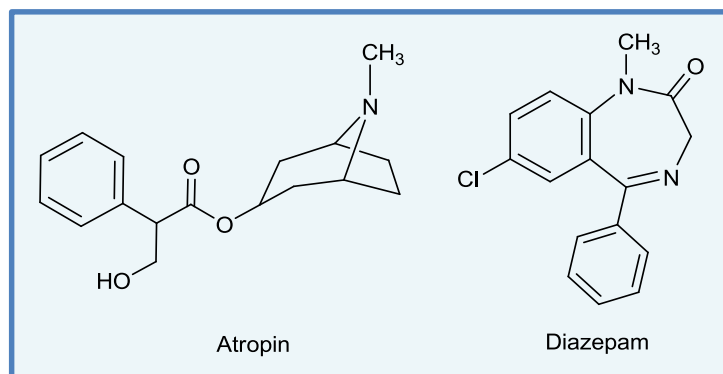
Slika 2.11. Struktura klasičnih reaktivatora (oksima) inhibiranih kolinesteraza koji su dozvoljeni za kliničku upotrebu.

Budući da su oksimi uglavnom dizajnirani kako bi sa što većom učinkovitošću reaktivirali AChE vrlo malo ih je uspješno u reaktivaciji fosfilirane BChE. Stoga je pronalazak učinkovitog reaktivatora BChE vrlo aktualno polje istraživanja budući da BChE djeluje kao prirodno čistilo organizma od OP spojeva što se može iskoristiti u profilaktičke svrhe.

2.4. Terapija u slučaju trovanja organofosforim spojevima

Učinkovitost terapije u slučaju trovanja OP spojem ovisi o njenoj pravovremenoj primjeni. Budući da klasični oksimi koji su dozvoljeni za kliničku upotrebu, ne prelaze krvno-moždanu barijeru terapija se mora primjeniti prije nego se inhibira sinaptička AChE čija je funkcija esencijalna za život. Brzo starenje OP-AChE konjugata, osobito onog sa somanom i različita učinkovitost oksima u reaktivaciji AChE obzirom na OP spoj kojim je enzim inhibiran, dodatno ograničava period primjene terapije i njenu djelotvornost. Terapija koja se danas koristi u slučaju izloženosti OP spoju sastoji se od primjene antikolinergika

(atropina), oksima i antikonvulziva. Atropin (**slika 2.12**) djeluje kao antagonist muskarinskih receptora te neutralizira simptome trovanja koji potječu od hiperstimulacije muskarinskih receptora i nema utjecaja na nikotinske receptore.^{1,17} Nažalost, atropin slabo prelazi krvno-moždanu barijeru, a u većim dozama je i sam toksičan te uzrokuje konvulzije i kardio-respiratorne smetnje.¹



Slika 2.12. Strukture antikolinergika atropina i antikonvulziva diazepam.

Od četiri spomenuta klasična oksima dozvoljena za kliničku i vojnu upotrebu (**slika 2.11**) 2-PAM se preferentno koristi u SAD-u i Velikoj Britaniji, TMB-4 u većini europskih zemalja, a HI-6 u Švedskoj i Kanadi.^{17,81} Uz atropin i oksim administrira se i antikonvulziv. Za sada je odobren diazepam (**slika 2.12**), međutim uskoro bi se mogao zamijeniti midazolamom za kojeg istraživanja pokazuju da ima bolju učinkovitost.¹ Zbog potrebe za brзом administracijom terapije nakon izloženosti OP spoju razvijeni su autoinjektori koji sadrže kombinaciju atropina i jednog od četiri klasična oksima.⁸¹ Prvenstveno su namijenjeni za primjenu u vojsci i u situacijama kada se može očekivati izloženost OP spoju (npr. u poljoprivredi i sl.).

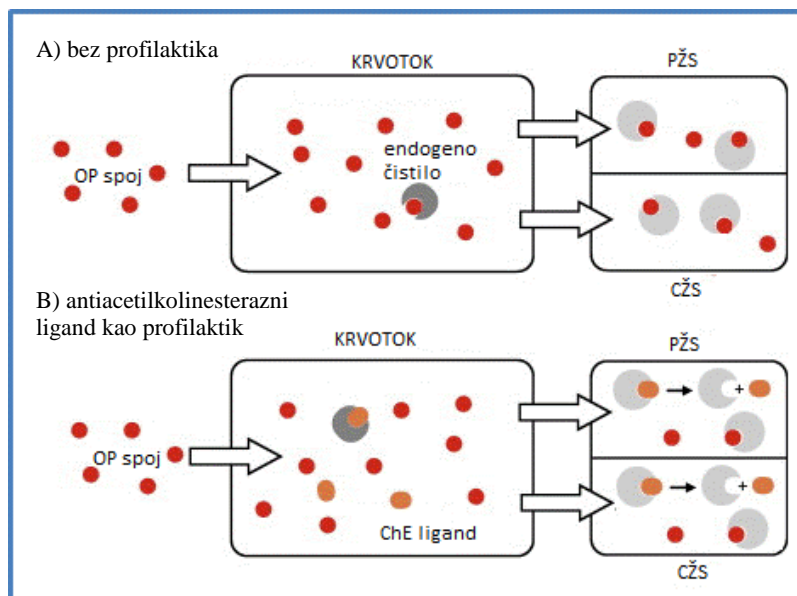
Budući da ne postoji univerzalni reaktivator fosfiliranih kolinesteraza i da je vrijeme primjene terapije ključno za njeno djelovanje, primjena profilaktika koji bi zaštitili nativnu AChE od inhibicije u slučajevima kada se može očekivati izloženost živčanim bojnim otrovima ili drugim OP spojevima, čini se kao logičan izbor. Upotreba profilaktika povećala bi i uspješnost naknadno administrirane terapije. Profilaksu je moguće ostvariti na dva načina: pomoću antiacetilkolinesteraznih sintetskih ili prirodnih spojeva (liganada) te primjenom egzogenih enzima koji djeluju kao biološka čistila organizma od OP spojeva.

2.4.1. Ligandi s kratkodjelujućim antiacetilkolinesteraznim učinkom

Kao ligandi s kratkodjelujućim antiacetilkolinesteraznim učinkom istražuju se različiti sintetski ili prirodni spojevi koji djeluju tako da kratkoročno inhibiraju nativnu AChE što onda onemogućava vezanje OP spoja (**slika 2.13**). Takvi spojevi mogu stvarati kovalentne interakcije s AChE, kao npr. karbamati. Međutim, za razliku od defosfilacije, dekarbamilacija je relativno brza i acetilkolinesterazna aktivnost se ubrzo spontano reaktivira.¹⁰⁶ Profilaktični učinak prirodnog karbamata fizostigmina (iz biljke *Physostigma venenosum*) koji se koristi u medicini za liječenje *Myastheniae gravis*, kao i sintetičkog karbamata neostigmina, poznat je već duže vrijeme. Međutim, iako su ovi spojevi djelotvorni u slučaju izloženosti nekolicini OP spojeva, tek se karbamat piridostigmin pokazao učinkovitim profilaktikom i u slučaju izloženosti somanu.¹⁰⁷⁻¹¹⁰ Stoga je danas za korištenje u vojsci odobren upravo piridostigmin.^{17,107,109} Profilaktička učinkovitost piridostigmina povećava se s povećanjem doze, ali se također povećavaju i neželjene nuspojave (većinom gastrointestinalnog tipa).^{17,107,109} Problem se djelomično riješio kombiniranjem piridostigmina s antikolinergicima triheksifinidilom i benaktizinom. Proizvod je nazvan PANPAL i upotrebljava se samo u češkoj vojsci.¹⁰⁶ Dobra učinkovitost ove kombinacije, uz primjenu terapije nakon izloženosti živčanom bojnom otrovu, pokazala se djelotvornom ne samo u slučaju somana nego i VX-a, tabuna, sarina i ciklosarina.^{106,110} Međutim, piridostigmin ne prelazi krvno-moždanu barijeru pa je njegovo profilaktično djelovanje ograničeno na periferni živčani sustav.^{106,107,110}

Istražuju se i spojevi koji stvaraju nekovalentne interakcije s AChE, tj. djeluju kao reverzibilni inhibitori, a s obzirom na mjesto interakcije s AChE mogu biti kompetitivni i nekompetitivni. Kompetitivni inhibitori se natječu s OP spojem za vezanje u katalitičko mjesto AChE. Uspješnost vezanja ovisi o afinitetu AChE prema spoju. Nekompetitivni inhibitori se vežu u periferno mjesto AChE. U oba slučaja dolazi do promjene konformacije enzima što onemogućava smještanje OP spoja u aktivno mjesto AChE. Neki od reverzibilnih inhibitora AChE koji se istražuju kao potencijalni profilaktici su već u primjeni kao lijekovi za liječenje Parkinsonove ili Alzheimerove bolesti. To su npr. fizostigmin (eserin), donepezil, rivastigmin, huperzin A i galantamin.^{14,111,112} Najzanimljiviji je biljni alkaloid galantamin (nađen u visibabi, amarilusu, sunovratu i ljiljanu) koji djeluje kao kompetitivni inhibitor AChE.^{14,112} Prelazi krvno-moždanu barijeru, terapijske doze nisu toksične, a ujedno ima i neuroprotektivna svojstva (nikotinski alosterički ligand) te štiti mozak od neurodegeneracije prouzrokovane somanom.^{112,113} Vrijeme poluživota galantamina u cirkulaciji je prilično dugo,

do 7 h, a moguća je i oralna primjena, međutim još uvijek nije odobren za upotrebu kao profilaktik.^{14,113}



Slika 2.13. Djelovanje profilaktika u slučaju izloženosti OP spojevima.²⁶ A) bez primjene profilaktika OP spoj ulazi u krvotok i distribuira se u periferni živčani sustav (PŽS) i centralni živčani sustav (CŽS) gdje fosfilira AChE. Endogeno biološko čistilo (npr. BChE) na sebe veže mali dio OP spoja, ali nedovoljno da se zaštiti nativna AChE od inhibicije. B) vezanjem liganda koji ima kratkodjelujuće antiacetilkolinesterazno svojstvo aktivnost AChE je reverzibilno inhibirana što onemogućava njenu fosfilaciju OP spojem. Pretpostavka je da će takvi ligandi prijeći krvno-moždanu barijeru te zaštititi sinaptičku AChE od inhibicije.

Oksimi su također potencijalni profilaktici. Djeluju kao reverzibilni inhibitori AChE, a njihovom primjenom se ujedno osigurava i određena koncentracija antidota u cirkulaciji prije izloženosti OP spoju.^{81,106,110,114} Kratko zadržavanje u cirkulaciji, doziranje, toksičnost i nemogućnost prelaska krvno-moždane barijere su problemi na kojima još treba poraditi.^{17,106} Međutim, za upotrebu u češkoj i slovačkoj vojsci odobren je HI-6 koji se administrira pomoću flastera zalijepljenog na kožu (TRANSANT).^{18,106}

2.4.2. Biološka čistila

Alternativa kratkodjelujućim antiacetilkolinesteraznim ligandima su egzogeni enzimi, humanog ili drugog porijekla (bakterijskog/fungalnog) koji bi neutralizirali OP spojeve još u krvotoku, prije nego ostvare interakcije sa sinaptičkom AChE, tj. prije nego se distribuiraju u organizmu ili pohrane u adipoznom tkivu.

Za razliku od kratkodjelujućih liganada, toksičnost bioloških čistila je zanemariva, ali bi administracija veće količine egzogenog enzima mogla poremetiti neke metaboličke procese, a u slučaju administracije enzima koji nisu humanog porijekla treba imati na umu i mogući imunološki odgovor organizma.²⁶ Taj problem moguće je riješiti pegilacijom (dodavanjem polietilen-glikolnih adukata) ili inkluzijom enzima koji nisu humanog porijekla u nanospremnik.^{26,110} Djelovanje bioloških čistila mora biti brzo, ireverzibilno i specifično prema OP spojevima.²¹ Ne smiju utjecati na metaboličke procese i njihova primjena ne bi smjela biti toksična za organizam, a zadržavanje u cirkulaciji mora biti što duže.²¹ Upotrebom takvih bioloških čistila izbjegle bi se nuspojave povezane s korištenjem antiacetilkolinesteraznih liganada kao profilaktika.^{21,115} Razlikujemo stehiometrijska, katalitička i pseudokatalitička čistila (**slika 2.14**).

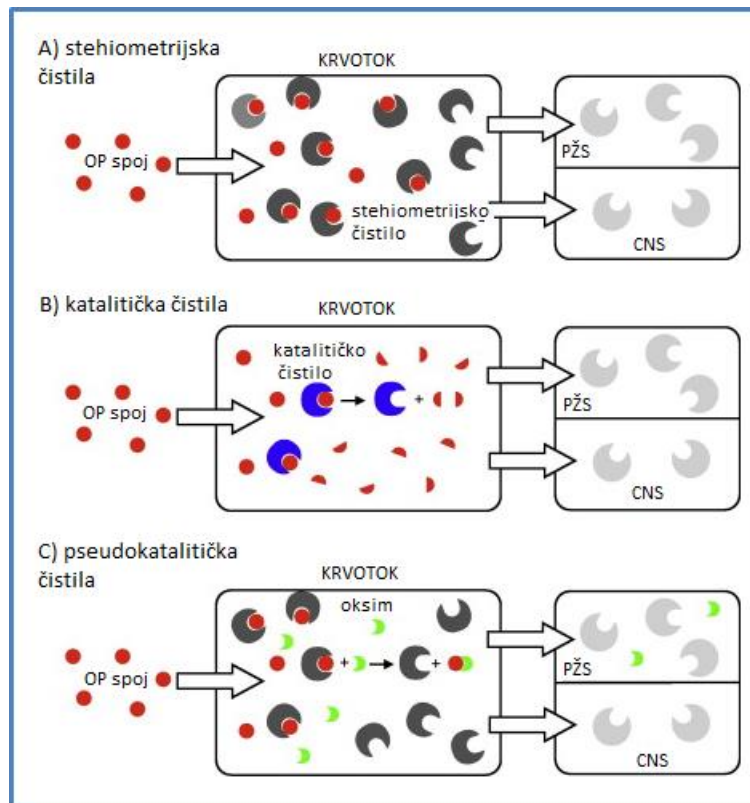
Stehiometrijska čistila su egzogeni enzimi koji ostvaruju ireverzibilne interakcije s OP spojevima i to u omjeru 1:1, tj. jedna molekula enzima fosfilira se jednom molekulom OP spoja (**slika 2.14A**). Na taj se način koncentracija OP spoja u krvotoku snizi, ali i enzim ostaje trajno inhibiran. Da bi učinak stehiometrijskog čistila bio djelotvoran takav enzim se mora primijeniti u visokoj koncentraciji, jer OP spoj mora biti uklonjen unutar jednog cirkulacijskog perioda, što je kod čovjeka oko 7 min.²¹ Kako bi se izbjegla mogućnost imunološkog odgovora organizma na primjenu egzogenih enzima najviše se istražuje upotreba ljudske BChE. Kao što je već spomenuto, BChE je slična AChE, podložna je fosfilaciji te kao takva djeluje i kao prirodno endogeno čistilo organizma od OP spojeva. Međutim, njena koncentracija u krvotoku (oko 50 nM) nije dostatna kako bi se zaštitila sinaptička AChE od inhibicije smrtonosnim dozama OP spojeva. Ljudska BChE brzo se inhibira VX-om, somanom, tabunom i sarinom, a poluvrijeme cirkulacije u krvotoku ($t_{1/2}$) je 12 do 15 dana.¹¹⁵ Primarni izvor BChE za egzogenu upotrebu je ljudska plazma. Doza od 200 mg/70 kg djeluje profilaktički u slučaju izloženosti dozi 2-5 x LD₅₀ živčanih bojnih otrova.²⁵ Istraživanja na životinjama pokazala su da bi administracija veće doze ljudske BChE pružila zaštitu od izloženosti do 5,5 x LD₅₀ somana i 8 x LD₅₀ VX-a.¹¹⁶ S obzirom da je

izolacija i pročišćavanje ljudske BChE iz plazme prilično skupo, a i količina plazme ovisi o dostupnim donorima, istraživanja su se usmjerila na rekombinantnu ljudsku BChE koja se može proizvesti u ekspresijskim sustavima kao što su CHO stanice,^{73,118} stanice vinske mušice,¹¹⁸ larvama dudovog svilca,²⁴ duhanu²³ i transgeničnim kozama (mlijeko)²². Za razliku od ljudske BChE izolirane iz plazme koja je tetramer, rekombinantna ljudska BChE eksprimirana u mlijeku transgeničnih koza je uglavnom dimer.²¹ Njeno vrijeme cirkulacije u krvotoku je znatno kraće (sati, a ne dani) zbog nižeg stupnja oligomerizacije i promjena u glikozilaciji pa ju je potrebno pegilirati.^{22,64} Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) odobrila je korištenje BChE izolirane i pročišćene iz ljudske plazme pa je ona danas uvedena u primjenu kao profilaktik u američkoj vojsci, a od 2005. godine odobrena je i upotreba pegilirane rekombinantne ljudske BChE proizvedene u mlijeku transgeničnih koza.²² Proizvod je komercijalno dostupan pod imenom Protexia[®].²² Moguća je ekspresija i ljudske rekombinantne AChE u duhanu, a pegilirani enzim pokazuje veću učinkovitost kao čistilo i veću stereoselektivnost prema toksičnim izomerima somana, tabuna i VX-a od BChE, što onda smanjuje koncentraciju enzima koju je potrebno administrirati da bi enzim djelovao kao čistilo.¹¹⁹⁻¹²¹ Međutim, primjena rekombinantne ljudske AChE za sada nije zaživjela.

Katalitičkim čistilima nazivaju se enzimi koji mogu hidrolizirati OP spoj još u krvotoku, prije nego se distribuira u organizmu (**slika 2.14B**). Prednost katalitičkih čistila, u odnosu na stehiometrijska, je u tome što niža koncentracija takvog enzima može zaštititi nativnu AChE od fosfilacije, jer jedan enzim neutralizira (razgradi) više molekula OP spoja. Postoji nekoliko ljudskih enzima za koje su OP spojevi supstrati, a koji se istražuju kao potencijalna katalitička čistila: paraoksonaza 1 (PON1) iz plazme, eritrocitna i jetrena prolidaza, jetrena karboksilesteraza (CaE1), jetreni marker starenja (SMP-30) i citosolne aminopeptidaze (AMPP).^{18,26,110,122} PON 1 ima fosfotriesteraznu, laktonaznu i arilesteraznu aktivnost. Sintetizira se u jetri, a krvotokom cirkulira u kompleksu s HDL-om (*"high-density"* lipoproteinom). Hidrolizira nekolicinu OP spojeva velikom brzinom, enantioselektivna je te preferira toksičniji *S* (-) enantiomer tabuna, ali nažalost pokazuje veću enantioselektivnost prema manje toksičnim izomerima somana.^{123,124} Povećanje katalitičke aktivnosti PON1 za 10 do 100 puta bilo bi dovoljno da učinkovito djeluje kao čistilo u slučaju izloženosti različitim živčanim bojnim otrovima, stoga se istražuju mutacije koje bi omogućile povećanje katalitičke aktivnosti.¹¹⁰ PON1 se može isto kao BChE izolirati iz plazme, ali kako je u kompleksu s HDL-om izolacija je komplicirana i skupa, a izolirani enzim nestabilan.^{110,122,125}

Ekspresija rekombinantne ljudske PON1 moguća je u *E. coli*¹²⁶ a takav je enzim potrebno konjugirati s HDL-om kako bi bio stabilan i pegilirati kako bi se produžilo vrijeme cirkulacije u krvotoku^{18,122}. Među istraživanim enzimima je i ljudska prolidaza koja hidrolizira živčane bojne otrove G-serije učinkovitije nego PON1.^{26,127} Strukturno je slična bakterijskim fosfotriesterazama (PTE), a rekombinantni enzim moguće je eksprimirati u *S. cerevisiae* i *E. coli*.^{18,26,31} Bakterijske fosfotriesteraze (PTE), diizopropilfluorofosfataza (DFP-aza) izolirana iz lignje, bakterijske prolidaze, fungalne lakaze, i hem-kloroperoksidaze također hidroliziraju OP spojeve.^{18,26,122} Ovi enzimi su zanimljivi jer je moguća njihova primjena i u biotehnoške svrhe, npr. pri uništavanju zaliha živčanih bojnih otrova, dekontaminaciji tla, odjeće i vode.¹⁸ Neki od njih su se pokazali i djelotvornim katalitičkim čistilima kao npr. lakaze koje učinkovito hidroliziraju VX, kao i hem-kloroperoksidaze, te bakterijske PTE koje su učinkovite u hidrolizi paraoksona, sarina, somana i VX-a.^{119,128} PTE pokazuju stereoselektivnost pa se istražuju inačice PTE s različitim mutacijama koje bi favorizirale toksičnije izomere živčanih bojnih otrova.¹²⁸ S obzirom da su to enzimi koji nisu humanog porijekla problem je pojava imunološkog odgovora i kratko vrijeme cirkulacije pa ih je potrebno pegilirati, odnosno inkapsulirati. Tako inkapsulirana PTE ima vrijeme cirkulacije do nekoliko tjedana.¹¹⁹ AChE i BChE također je moguće, uvođenjem mutacija, transformirati u katalitička čistila. Ta ideja potekla je od Järv-ove hipoteze da za učinkovitu reakciju s fosfiliranom kolinesterazom nukleofil mora biti smješten u blizini oksianionske šupljine tako da može ili aktivirati molekulu vode ili će on sam izvesti nukleofilni napad i pocijepati vezu između fosforovog atoma i kolinesteraze.¹²⁹ Prva istraživana inačica bila je ona ljudske BChE gdje je glicin na položaju 117 mutiran u histidin (G117H) te je tako uveden drugi nukleofil. Ta inačica BChE može sporo hidrolizirati paraokson, sarin, VX i još neke OP spojeve, ali ne i soman zbog brzog starenja soman-ChE konjugata.^{18,66,121} Nakon ovog pokušaja s BChE napravljeno je još šezdesetak inačica AChE i BChE, ali niti jedna se nije pokazala učinkovitijom u hidrolizi OP spojeva od ionako slabo učinkovite G117H inačice ljudske BChE. Zbog velike raznolikosti OP spojeva, različite specifičnosti i afiniteta AChE i katalitičkih čistila prema enantiomerima OP spojeva nemoguće je izdvojiti jedan enzim kao učinkovito katalitičko čistilo u slučaju izloženosti različitim OP spojevima.⁶⁶ Veća djelotvornost bi se mogla postići administracijom kombinacije više različitih enzima. Takve kombinacije enzima mogle bi se proizvoditi u obliku dekontaminacijskih otopina, ugraditi u zaštitnu opremu ili različite preparate za primjenu preko kože, što bi bilo korisno za

medicinsko osoblje, policiju, vatrogasce ili bilo koju profesiju, u slučajevima kada se sumnja na moguću izloženost OP spojevima.



Slika 2.14. Djelovanje profilaktika u slučaju izloženosti OP spojevima.²⁶ A) stehiometrijsko čistilo veže OP spoj u krvotoku (1:1) što sprječava fosfilaciju AChE u PŽS i CŽS. B) katalitičko čistilo hidrolizira OP spoj u krvotoku prije nego se distribuira u PŽS i CŽS. C) primjena egzogenog enzima u kombinaciji s oksimom omogućuje cikličku fosfilaciju i reaktivaciju tog enzima te razgradnju OP spoja u krvotoku.

Kao *pseudokatalitička čistila* primjenjuju se egzogeni enzimi koji će se fosfilirati OP spojem, u kombinaciji s oksimom koji će reaktivirati taj enzim (**slika 2.14C**). Pseudokatalitička čistila su u stvari stehiometrijska čistila primjenjena u kombinaciji s oksimom što im omogućava ponovljivo djelovanje jer se nastali konjugat reaktivira pomoću oksima čime se aktivnost enzima regenerira. U svrhu pronalaženja učinkovitih pseudokatalitičkih čistila istražuju se razne kombinacije oksim–enzim parova. Od enzima se preferiraju oni ljudskog porijekla (npr. BChE), čija je brzina fosfilacije OP spojem reda veličine ili veća od brzine fosfilacije native AChE. Dizajniran je veliki broj inačica AChE, a od iznimne je važnosti istraživanje mutacija koje bi omogućile usporavanje starenja, posebice

konjugata sa somanom. Uz to se kontinuirano istražuju novi oksimi kao potencijalni reaktivatori koji bi učinkovito i brzo reaktivirali inhibiranu enzimsku komponentu pseudokatalitičkog čistila. Prvotno se BChE nije pokazala kao dobar izbor za pseudokatalitičko čistilo jer su klasični oksimi uglavnom namjenjeni reaktivaciji AChE te je reaktivacija BChE-OP konjugata tim spojevima bila neučinkovita.¹³⁰ Međutim, istraživanjem reaktivacije fosfilirane BChE nekim novije sintetiziranim piridinijevim oksimima ipak se potvrdio njen potencijal kao pseudokatalitičkog čistila.¹³⁵ Zato je interes za dizajniranje oksima specifičnih za reaktivaciju BChE inhibirane OP spojevima u porastu. Neki od novosintetiziranih nepiridinijevih oksima pokazali su se kao vrlo učinkoviti reaktivatori VX-om, ciklosarinom i paraoksonom inhibirane BChE, ali ipak manje učinkoviti u slučaju inhibicije tabunom i sarinom.¹³¹ Sit i sur. su nedavno sintetizirali seriju neutralnih imidazolijevih oksima koji mogu prijeći krvno-moždanu barijeru.¹³⁵ Pokazano je da su neki od tih oksima učinkoviti reaktivatori sarinom, ciklosarinom, VX-om i paraoksonom inhibirane BChE, ali i AChE, a njihov potencijal da prelaze krvno-moždanu barijeru dodatno bi unaprijedio terapijski učinak u slučaju izloženosti nekim od tih živčanih bojnih otrova.¹³² Mutacijom aminokiselinskih ostataka u aktivnom mjestu AChE dobivene su inačice s karakteristikama kao što je povećana brzina fosfilacije i/ili reaktivacije, usporeno starenje OP-enzim konjugata te inačice enzima s kombinacijom tih karakteristika.^{29,133} Takvi enzimi su se u kombinaciji s oksimom pokazali kao manje ili više učinkoviti pseudokatalitički sustavi u slučaju razgradnje različitih OP spojeva.^{30,134-138} Identificirano je i nekoliko inačica AChE koje usporavaju starenje njihovih konjugata sa somanom.^{27,45} Najučinkovitijom se pokazala inačica AChE u kojoj je fenilalanin kolinskog mjesta na položaju 338 mutiran u alanin (F338A).^{27,28,97,139} Ta mutacija lako se kombinira s mutacijom tirozina 337 kolinskog mjesta u alanin (Y337A) kojom se povećava volumen aktivnog mjesta enzima što bi moglo dovesti do brže reaktivacije fosfilirane inačice oksimom.³⁰ Dakle, kombinacija te dvije mutacije trebala bi rezultirati usporenim starenjem konjugata sa somanom i povećanjem brzine njegove reaktivacije oksimom. Isto tako, pronalaženje oksima koji bi učinkovito reaktivirao i egzogeni enzim i native kolinesteraze dodatno bi unaprijedilo učinak pseudokatalitičkog čistila. Stoga je istraživanje oksimom potpomognute enzimске razgradnje OP spojeva vrlo atraktivno područje istraživanja.

§ 3. *EKSPERIMENTALNI DIO*

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Pufer, supstrat, reagens, otapalo

U pokusima je korišten $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ natrijev fosfatni pufer pH 7,4 pripremljen titracijom $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ otopina soli Na_2HPO_4 i NaH_2PO_4 , pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Za određivanje pH korišten je pH-metar SevenEasy pH s InLab[®] 413 elektrodom (Mettler-Toledo GmbH, Švicarska), koji je baždaren standardnim otopinama pufera pH $4,01 \pm 0,02$, pH $7,00 \pm 0,02$ i pH $9,21 \pm 0,02$ (Mettler-Toledo GmbH, Švicarska).

Kao supstrat kolinesteraza korišten je acetiltiokolin-jodid (ATCh; Sigma-Aldrich, SAD). Ishodna otopina supstrata koncentracije 10 ili 20 mmol dm^{-3} kao i sva dodatna razrjeđenja pripremljeni su otapanjem u destiliranoj vodi neposredno prije pokusa. Konačna koncentracija ATCh u pokusima bila je 1 mmol dm^{-3} .

Otopina 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeve kiseline (DTNB) (Sigma-Aldrich, SAD), koncentracije 6 mmol dm^{-3} , korištena je za određivanje aktivnosti enzima Ellmanovom metodom¹⁴⁰, a priređena je u $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ natrijevu fosfatnom puferu pH 7,4. Konačna koncentracija DTNB-a u pokusima bila je $0,3 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Dimetil-sulfoksid (DMSO, Kemika, Zagreb) korišten je za otapanje nekih JAR oksima. Konačni postotak DMSO-a u pokusima bio je manji od 1 %.

Sve korištene kemikalije bile su analitičke čistoće.

3.2. Enzimski preparati

Rekombinantna ljudska AChE i inačice ljudske AChE pripremljene su na Sveučilištu u Kaliforniji, San Diego, SAD prema ranije opisanoj proceduri.^{28,101} Korištene su inačice AChE s mutiranim aminokiselinskim ostacima u mjestu vezanja kolina: inačica s mutacijom u kojoj je tirozin na položaju 337 mutiran u alanin (Y337A) te inačica s mutacijom tirozina na položaju 337 u alanin i fenilalanina na položaju 338 u alanin (Y337A/F338A). Pripremljeni enzimski preparati su visoke čistoće i monomerni. Pročišćenu oligomernu BChE izoliranu iz ljudske plazme (uobičajena inačica) donirao je *United States Army Medical Research Institute of Chemical Defense* (USAMRICD), Edgewood, SAD.

Razrjeđenja enzima priređena su neposredno prije pokusa u 0,1 %-tnoj otopini albumina goveđeg seruma (Sigma-Aldrich, SAD) pripremljenoj u fosfatnom puferu.

Za *ex vivo* pokuse korištena je heparinizirana ljudska venska krv. Uzorke su donirali zaposlenici Jedinice za biokemiju i organsku analitičku kemiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada. Krv poslije nije dodatno tretirana. Uzorci su čuvani na +4 °C do upotrebe te nisu dodatno razrjeđivani.

3.3. Inhibitori kolinesteraza

Živčani bojni otrovi, tabun (etil-*N,N*-dimetilfosforamidocijanidat), soman (1,2,2-trimetilpropil metilfosfonotiolat) i VX (*O*-etil-*S*-(2-diizopropilaminoetil)metil fosfonotiolat) kupljeni su od *NC Laboratory*, Spiez, Švicarska.

Ishodne otopine tabuna, somana i VX-a (5000 µg ml⁻¹) pripremljene su u izopropilnom alkoholu i čuvane pri +4 °C, dok su daljnja razrjeđenja priređena u destiliranoj vodi neposredno prije pokusa.

Selektivni inhibitor AChE, BW284C51 (1,5-bis(4-alildimetil-amonijfenil)pentan-3-on dibromid) kao i etopropazin, selektivni inhibitor BChE, kupljeni su od Sigma-Aldrich, SAD. Ishodne otopine BW284C51 i etopropazina koncentracije 1 i 0,5 mmol dm⁻³ napravljene su u destiliranoj vodi te su čuvane pri +4 °C. Konačna koncentracija BW284C51, odnosno etopropazina u pokusu bila je 0,01 tj. 0,02 mmol dm⁻³.

3.4. Oksimi

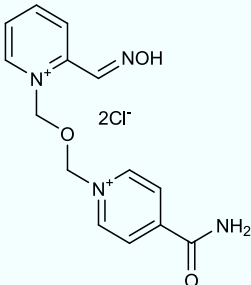
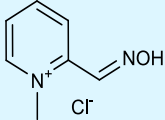
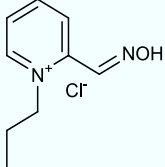
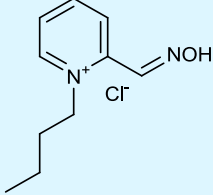
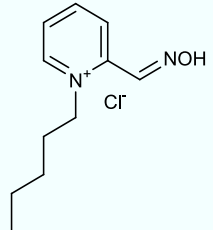
Za ovo istraživanje odabrano je, na temelju određenih preliminarnih istraživanja (iz serije od stotinjak novih oksima), 15 JAR oksima uz 2 klasična oksima (HI-6 i 2-PAM). Odabrani oksimi mogu se podijeliti na piridinijeve, piridinio-imidazolijeve i imidazolijeve oksime, od kojih svi bisoksimi imaju triazolski prsten u poveznici. Strukture ispitivanih oksima, njihova imena i kratice prikazane su u **tablici 3.1**.

Oksim HI-6 kupljen je od *United States Biological*, Swampscott, SAD, a 2-PAM od Sigma, SAD. Novi JAR oksimi dizajnirani su prema strukturi aktivnog mjesta AChE i sintetizirani su na *The Scripps Research Institute*, La Jolla, California, SAD. Oksimi s triazolskim prstenom sintetizirani su klik-kemijskom reakcijom, odnosno cikloadicijskom

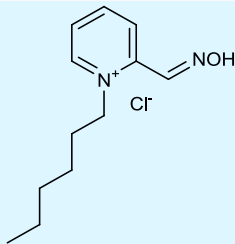
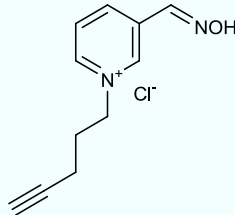
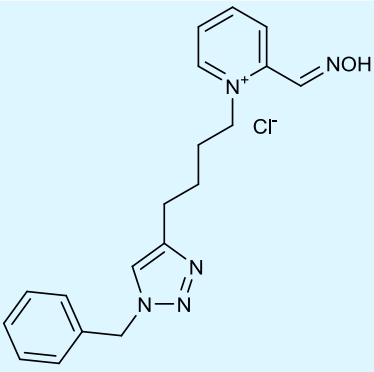
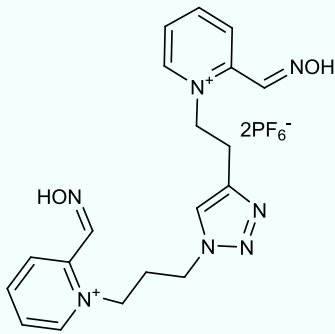
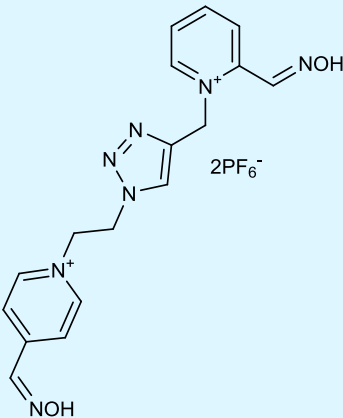
reakcijom kataliziranom bakrom, između azidnih i alkinskih strukturnih jedinica.^{28,141-143} Svi navedeni spojevi bili su analitičke čistoće.

Ishodne otopine oksima (10 mmol dm^{-3} ili 100 mmol dm^{-3}) priređene su u destiliranoj vodi (HI-6, 2-PAM,), puferu (JAR288A, JAR288B, JAR288C, JAR1-47A, JAR1-81A) ili DMSO-u (JAR2-22B, JAR2-28B, JAR-153, JAR3-289-28, JAR2-168, JAR2-155, JAR2-175, JAR2-167, JAR2-177, JAR2-183) te su čuvane pri $+4 \text{ }^\circ\text{C}$. Daljnja razrjeđenja oksima načinjena su neposredno prije pokusa.

Tablica 3.1. Strukture i kemijska imena istraživanih oksima.

| | STRUKTURA | KEMIJSKO IME |
|----------|---|---|
| HI-6 |  | 4-karbamoil-1-[2-(hidroksiiminometil)piridinio-1-il]metoksimetil]piridinijev diklorid |
| 2-PAM |  | 2-hidroksiminometil-1-metilpiridinijev klorid |
| JAR2-22B |  | 2-hidroksiminometil-1-propilpiridinijev klorid |
| JAR288A |  | 1-butil-2-(hidroksiiminometil)piridinijev klorid |
| JAR288B |  | 2-hidroksiiminometil-1-pentilpiridinijev klorid |

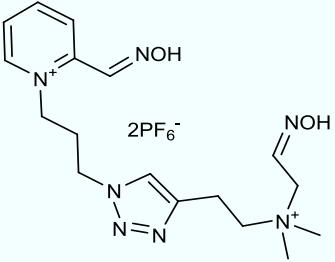
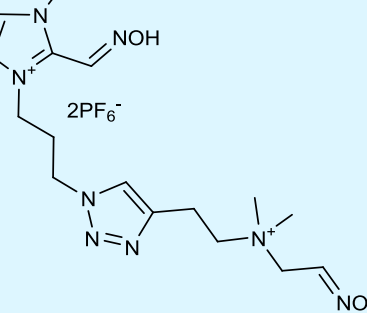
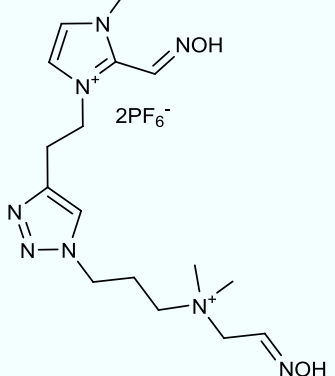
Tablica 3.1. Nastavak.

| OKSIM | STRUKTURA | KEMIJSKO IME |
|----------|---|--|
| JAR288C |  | 1-heksil-2-(hidroksiiminometil)piridinijev klorid |
| JAR1-47A |  | 3-hidroksiiminometil-1-(pent-4-in-1-il)piridinijev klorid |
| JAR1-81A |  | 1-[4-(1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)but-1-il]-2-(hidroksiiminometil)piridinijev klorid |
| JAR2-28B |  | 2-hidroksiiminometil-1-[[2-[3-[2-(hidroksiiminometil)piridinio-1-il]propil]-1H-1,2,3-triazol-4-il]etil]piridinijev diheksafluorofosfat |
| JAR2-153 |  | 2-hidroksiiminometil-1-[[1-[2-[4-(hidroksiiminometil)piridinio-1-il]etil]metil]piridinijev diheksafluorofosfat |

Tablica 3.1. Nastavak.

| OKSIM | STRUKTURA | KEMIJSKO IME |
|-------------|-----------|--|
| JAR3-289-28 | | 2-hidroksiiminometil-3-metil-1-[[1-[2-[4-(hidroksiiminometil)piridinio-1-il]etil]-1H-1,2,3-triazol-4-il]etil]imidazolijev diklorid |
| JAR2-168 | | 2-hidroksiiminometil-3-metil-1-[[1-[3-(2-hidroksiiminometil)piridinio-1-il]propil]-1H-1,2,3-triazol-4-il]etil]imidazolijev diheksafluorofosfat |
| JAR2-155 | | 2-hidroksiiminometil-3-metil-1-[[4-[2-(2-hidroksiiminometil)piridinio-1-il]etil]-1H-1,2,3-triazol-1-il]propil]imidazolijev diheksafluorofosfat |
| JAR2-167 | | 2-hidroksiiminometil-3-metil-1-[[4-[2-(2-hidroksiiminometil-3-metilimidazol-1-il)etil]-1H-1,2,3-triazol-1-il]propil]imidazolijev diheksafluorofosfat |

Tablica 3.1. Nastavak.

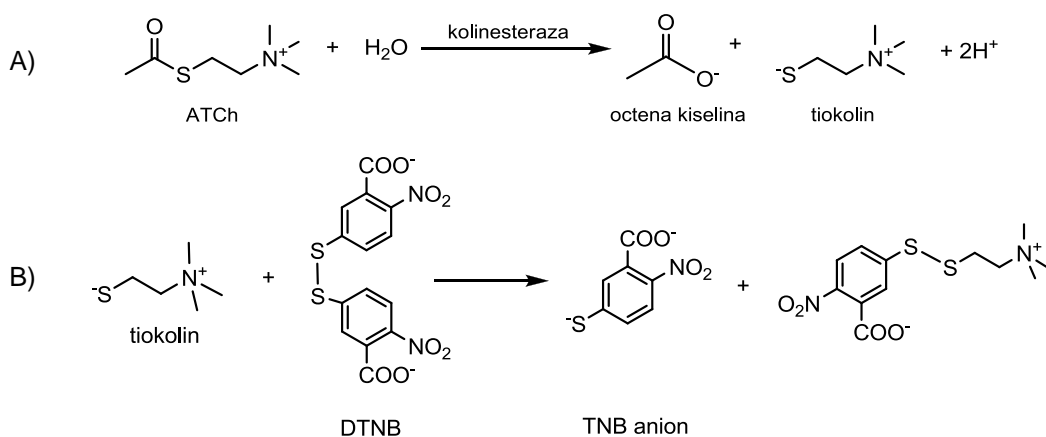
| OKSIM | STRUKTURA | KEMIJSKO IME |
|----------|---|--|
| JAR2-175 |  | 1-[[4-[2-[<i>N</i> -(hidroksiiminometil)dimetilamonio]etil]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il]propil]-2-(hidroksiiminometil)piridinijev diheksafluorofosfat |
| JAR2-177 |  | 1-[[4-[2-[<i>N</i> -(hidroksiiminometil)dimetilamonio]etil]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il]propil]-2-hidroksiiminometil-3-metilimidazolijev diheksafluorofosfat |
| JAR2-183 |  | 1-[[1-[3-[<i>N</i> -(hidroksiiminometil)dimetilamonio]propil]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il]etil]-2-hidroksiiminometil-3-metilimidazolijev diheksafluorofosfat |

3.5. Određivanje aktivnosti kolinesteraza metodom po Ellmanu

Aktivnost kolinesteraza praćena je spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu,¹⁴⁰ pri 25 °C uz ATCh kao supstrat i DTNB kao reagens.

Enzimskom hidrolizom ATCh nastaje tiokolin (TCh) koji zatim reagira s tiolnim reagensom DTNB-om, a nastali anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB⁻) daje žuto obojenje reakcijskoj smjesi koje se može pratiti spektrofotometrijski (slika 3.1). Porast apsorbancije odgovara intenzitetu obojenja, a prati se pri valnoj duljini od 412 nm i

proporcionalan je aktivnosti enzima. U slučaju *ex vivo* pokusa, kada je izvor enzima bila ljudska venska krv, porast apsorbancije praćen je pri valnoj duljini od 436 nm kako bi se smanjila početna apsorbancija uzorka uzrokovana hemoglobinom.



Slika 3.1. Ellmanova metoda:¹⁴⁰ A) enzimskom hidrolizom acetiltiokolina oslobađa se tiokolin, B) tiokolin potom reagira s DTNB-om pri čemu se oslobađa žuti anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB⁻).

Za mjerenja aktivnosti Ellmanovom metodom korišten je spektrofotometar CARY 300 (Varian Inc. Australija) s termostatiranim kućištem i kivete s optičkim putem od 1 cm.

Tijekom mjerenja aktivnosti kolinesteraza, promjena apsorbancije kod svih uzoraka bila je linearna s vremenom, odnosno mjerenja su provedena u uvjetima nepromjenjivosti početne koncentracije supstrata.

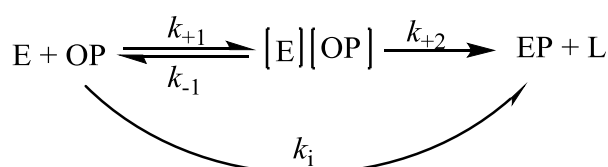
3.6. Progressivna inhibicija kolinesteraza organofosfornim spojevima

Brzina progresivne (ireverzibilne) inhibicije određena je praćenjem vremenskog tijeka fosfilacije kolinesteraza tabunom, somanom i VX-om.

Reakcijska smjesa za praćenje progresivne inhibicije (volumena 1,0 mL) sadržavala je 0,3 mmol dm⁻³ DTNB, fosfatni pufer i enzim. Konačna razrjeđenja AChE, BChE i inačica AChE u reakcijskoj smjesi bila su od 3,5 x 10⁵ do 3,8 x 10⁶ puta kako bi se promjena apsorbancije kontrolne aktivnosti enzima kretala oko ΔA/min = 0,1, tj. kako bi promjena apsorbancije tijekom mjerenja bila linearna s vremenom. Inhibicija je započeta dodatkom inhibitora (tabuna/somana/VX-a) u reakcijsku smjesu. U pokusima su korištene tri do četiri

koncentracije inhibitora (0,5-100 nmol dm⁻³). Uzorci su inkubirani s inhibitorom određeno vrijeme (0-60 min) nakon čega je inhibicija zaustavljena dodatkom supstrata (1,0 mmol dm⁻³ ATCh) u reakcijsku smjesu i izmjerena je preostala aktivnost enzima. Kako bi se odredila aktivnost enzima u $t = 0$ min, reakcijskoj smjesi koja je sadržavala pufer, DTNB, ATCh i inhibitor dodan je enzim nakon čega je počelo mjerenje aktivnosti enzima. Mjerenja su trajala jednu minutu. Pad aktivnosti praćen je u odnosu na kontrolnu aktivnost enzima tj. kada reakcijska smjesa nije sadržavala OP spoj. Umjesto inhibitora u reakcijsku smjesu dodan je odgovarajući volumen pufera.

Progresivna inhibicija kolinesteraza OP spojevima opisana je prema **shemi 1**:



Shema 1

gdje kovalentnom reakcijom enzima (E) i OP spoja (OP), preko [E][OP] reverzibilnog kompleksa Michaelis-Menten-inog tipa nastaje fosfilirani enzim (EP) uz oslobađanje izlazne skupine organofosfata (L); k_{+1} i k_{-1} predstavljaju konstante brzina reakcije asocijacije, odnosno disocijacije [E][OP] kompleksa, k_{+2} predstavlja maksimalnu konstantu brzine inhibicije prvog reda, a k_i sveukupnu konstantu brzine inhibicije drugog reda.

Shema 1 opisana je jednačbom:

$$\ln \frac{v_0}{v_i} = \frac{k_{+2} \cdot [\text{OP}]}{K_i + [\text{OP}]} \cdot t \quad (1)$$

gdje su v_i i v_0 aktivnosti enzima u prisutnosti, odnosno odsutnosti inhibitora (kontrolna proba), [OP] je koncentracija inhibitora korištena u inhibiciji, t je vrijeme trajanja inhibicije, k_{+2} je maksimalna konstanta brzine inhibicije prvog reda, a K_i konstanta disocijacije reverzibilnog kompleksa enzima i OP spoja.

U uvjetima kada je $[\text{OP}] \ll K_i$, k_{+2} i K_i se ne mogu zasebno odrediti pa jednačba (1) poprima oblik:

$$\ln \frac{v_0}{v_i} = \frac{k_{+2}}{K_i} \cdot [\text{OP}] \cdot t = k_i \cdot [\text{OP}] \cdot t \quad (2)$$

gdje k_i predstavlja sveukupnu konstantu brzine inhibicije drugog reda.

Konstanta k_i određena je linearnom regresijom iz korelacije ovisnosti $\ln(v_i/v_0)$ o vremenu inhibicije t prema jednadžbi:

$$\ln \frac{v_0}{v_i} = k_{\text{obs}} \cdot t \quad (3)$$

gdje je k_{obs} prividna konstanta brzine inhibicije prvog reda za određenu koncentraciju inhibitora pa je prema jednadžbi (2) sveukupna konstanta brzine inhibicije drugog reda (k_i):

$$k_i = \frac{k_{\text{obs}}}{[\text{OP}]} \quad (4)$$

3.7. Starenje fosfiliranih kolinesteraza

Konstanta brzine starenja (k_a) i poluvrijeme starenja ($t_{1/2}$) određeni su za somanom fosfoniliranu Y337A/F338A inačicu AChE. Inačica je inhibirana 4 min s 10 puta većom koncentracijom somana čime je postignuto 95-100 % inhibicije. Inhibirana Y337A/F338A inačica AChE profiltrirana je zatim kroz Quick Spin Sephadex G-50 kolonicu prema uputama proizvođača (*Roche Diagnostics*, GmbH, Mannheim, Njemačka) kako bi se uklonio nekonjugirani soman. Alikvoti inhibiranog enzima uzeti su u određena vremena od početka inhibicije (15 min do 3,5 h) i razrijeđeni 10 puta u puferu koji je sadržavao 1 mmol dm^{-3} HI-6. Budući da se ostarjeli fosfilirani enzim ne može reaktivirati, postotak inačice AChE koji je moguće reaktivirati u vremenu t određen je mjerenjem postotka reaktivacije Y337A/F338A, nakon 10 min inkubacije s HI-6. Alikvot tog uzorka razrijeđen je još 100 puta dodatkom u reakcijsku smjesu za mjerenje aktivnosti enzima ukupnog volumena 1,0 mL koja je sadržavala fosfatni pufer i DTNB ($0,3 \text{ mmol dm}^{-3}$). Mjerenje aktivnosti započeto je dodatkom supstrata ATCh ($1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$) i trajalo je dvije minute. Kroz paralelnu Quick Spin Sephadex G-50 kolonicu profiltriran je istovremeno i neinhibirani uzorak Y337A/F338A, koji je umjesto somana sadržavao određeni volumen pufera. Alikvot neinhibirane inačice AChE također je inkubiran s oksimom (kontrolna smjesa) te je izmjerena kontrolna aktivnost enzima na identičan, gore opisan način. Reaktivirana i kontrolna aktivnost

Y337A/F338A inačice AChE umanjene su za neenzimsku reakciju između HI-6 i ATCh izmjerenu u uzorku koji je umjesto enzima sadržavao određeni volumen pufera.

Konstanta brzine starenja (k_a) određena je linearnom regresijom, iz nagiba pravca logaritamske ovisnosti postotka inačice AChE koji je moguće reaktivirati u vremenu t o vremenu t :

$$\log \frac{100 \cdot (v_r - v_i)_t}{(v_0 - v_i)_t} = -k_a \cdot t \quad (5)$$

gdje v_0 predstavlja maksimalnu reaktiviranu aktivnost inhibirane Y337A/F338A inačice AChE u vremenu t u prisutnosti HI-6, v_r je aktivnost reaktiviranog enzima nakon inhibicije u vremenu t , a v_i aktivnost inhibiranog enzima bez prisustva HI-6, t predstavlja vrijeme nakon inhibicije koje je prethodilo inkubaciji s HI-6.

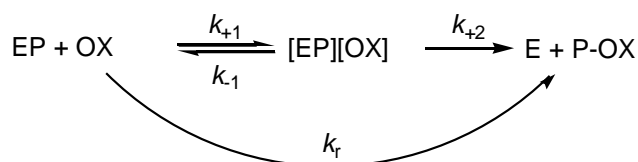
Rezultat je izražen i kao poluvrijeme starenja ($t_{1/2}$):

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_a} \quad (6)$$

3.8. Reaktivacija fosfiliranih kolinesteraza oksimima

Reaktivacija kolinesteraza inhibiranih tabunom somanom i VX-om određena je praćenjem vremenskog tijeka povratka aktivnosti fosfiliranih kolinesteraza u prisutnosti oksima.

Reaktivacija fosfiliranih kolinesteraza oksimima opisana je prema **shemi 2**:



Shema 2

gdje EP predstavlja fosfilirani enzim, $[\text{EP}][\text{OX}]$ reverzibilni kompleks Michaelis-Menten-inog tipa između EP i oksima (OX), E je slobodni enzim, P-OX fosfilirani oksim, k_{+1} i k_{-1} predstavljaju konstante brzina reakcije asocijacije, odnosno disocijacije $[\text{EP}][\text{OX}]$ kompleksa, k_{+2} je konstanta brzine reaktivacije prvog reda (odnosno konstanta brzine nukleofilnog

uklanjanja vezanog inhibitora) a k_r ukupna konstanta brzine reaktivacije drugog reda.

Reakcija reaktivacije (**shema 2**) opisana je jednadžbom:

$$\ln \frac{[EP]_0}{[EP]_t} = \frac{k_{+2} \cdot [OX]}{K_{OX} + [OX]} \cdot t = k_{obs} \cdot t \quad (7)$$

gdje su $[EP]_0$ i $[EP]_t$ koncentracije fosfiliranog enzima u vremenu 0 odnosno u vremenu t , K_{OX} odgovara omjeru $(k_{-1}+k_{+2})/k_{+1}$ te predstavlja disocijacijsku konstantu $[EP][OX]$ kompleksa, k_{obs} je prividna konstanta brzine reaktivacije prvog reda za određenu koncentraciju oksima.

Ukupna konstanta brzine reaktivacije drugog reda, k_r , izražena je kao omjer:

$$k_r = \frac{k_{+2}}{K_{OX}} \quad (8)$$

Rezultati mjerenja izraženi su kao maksimalni postotak reaktivacije enzima (*Reakt._{max}*):

$$Reakt._{max} = \frac{v_{(EP+OX)_t}}{v_{(E+OX)}} \cdot 100\% \quad (9)$$

gdje $v_{(EP+OX)_t}$ predstavlja aktivnost reaktiviranog enzima oksimom u vremenu t dok $v_{(E+OX)}$ predstavlja aktivnost neinhibiranog enzima u prisutnosti oksima (kontrolna aktivnost).

Enzim je inkubiran određeni vremenski period (2-60 min) da se postigne 95-100 % inhibicije s oko 10 puta većom koncentracijom OP spoja. Inhibirani enzim je zatim profiltriran kroz Quick Spin Sephadex G-50 kolonicu prema uputama proizvođača (*Roche Diagnostics*, GmbH, Mannheim, Njemačka) kako bi se uklonio višak nekonjugiranog OP spoja. S obzirom da je kapacitet kolonice 80 μ L korišten je koncentriraniji enzim. Nakon filtracije, a prije početka same reaktivacije, enzim je razrijeđen do potrebne mjere u 0,1 %-tnoj otopini albumina goveđeg seruma u fosfatnom puferu. Proces reaktivacije započet je inkubacijom alikvota tako razrijeđenog inhibiranog enzima s odgovarajućom koncentracijom oksima u fosfatnom puferu (enzim razrijeđen još 10 puta). U različitim vremenskim intervalima uzimani su alikvoti reaktivacijske smjese te su razrijeđeni još 100

puta u reakcijskoj smjesi za mjerenje aktivnosti enzima, ukupnog volumena 1 mL, koja je sadržavala fosfatni pufer i $30 \mu\text{mol dm}^{-3}$ DTNB. Mjerenje aktivnosti trajalo je 2 min i započeto je dodatkom ATCh (konačne koncentracije $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$). Na identičan način, istovremeno je kroz paralelnu Quick Spin Sephadex G-50 kolonicu profiltriran neinhibirani uzorak enzima, umjesto OP spoja sadržavao je određeni volumen pufera, koji je također razrijeđen do iste mjere kao i inhibirani enzim te je alikvot inkubiran u fosfatnom puferu s istom koncentracijom oksima koja je korištena u reaktivaciji. Uzimanjem alikvota iz tog kontrolnog uzorka i daljnjim razrjeđivanjem u reakcijskoj smjesi za mjerenje aktivnosti enzima, na isti način je izmjerena kontrolna aktivnost neinhibiranog enzima u prisutnosti oksima. U ovom pokusu enzim je u konačnici razrijeđen koliko je potrebno da kontrolna aktivnost, tj. aktivnost neinhibiranog enzima bude oko $\Delta A/\text{min} = 0,1$. Aktivnost enzima određena kod reaktivacije kao i kontrolna aktivnost umanjene su za vrijednost neenzimske reakcije između oksima i ATCh. Vrijednost neenzimske reakcije izmjerena je dodavanjem uzorka koji nije sadržavao enzim ni OP spoj u reakcijsku smjesu ukupnog volumena 1 mL, koja je sadržavala fosfatni pufer i $0,3 \text{ mmol dm}^{-3}$ DTNB. Mjerenje je trajalo 2 min i započeto je dodatkom ATCh (konačne koncentracije $1,0 \text{ mmol dm}^{-3}$).

Iz dobivenih rezultata nacrtan je graf ovisnosti postotka reaktivacije dobiven za pojedinu koncentraciju oksima ($Reakt_{max}$) o vremenu reaktivacije t . Zatim je iz početnog linearnog dijela korelacijom $\log(100-Reakt_{max})$ o vremenu reaktivacije t linearnom regresijom određena k_{obs} za svaku koncentraciju oksima. Budući da $(100-Reakt_{max})$ odgovara $100 \cdot [EP]_t/[EP]_0$, konstante brzine reaktivacije određene su iz korelacije ovisnosti k_{obs} o koncentraciji oksima prema jednadžbi (7).

3.9. *Ex vivo* oksim-enzim potpomognuta razgradnja OP spoja

Razgradnja OP spoja praćena je *ex vivo* u uzorku ljudske venske krvi u koji je dodan egzogeni enzim (BChE, Y337A ili Y337A/F338A inačica AChE) nakon čega je uzorak inkubiran s OP spojem. Odnos koncentracije OP spoja i egzogenog enzima u uzorku krvi bio je 10:1 ili 50:1. Nakon vremena potrebnog za postizanje 95-100 % inhibicije (15-60 min) u uzorak je dodan određeni oksim u 1, odnosno $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ koncentraciji. Alikvot uzorka uzet je u vremenskim intervalima (15 s do 1 h) i razrijeđen 1000 puta u reakcijskoj smjesi za mjerenje aktivnosti enzima, ukupnog volumena 1 mL, koja je sadržavala fosfatni pufer i DTNB ($0,3$

mmol dm⁻³). Mjerenje aktivnosti trajalo je 2 min i započeto je dodatkom ATCh (konačne koncentracije 1,0 mmol dm⁻³) u reakcijsku smjesu za mjerenje aktivnosti enzima. Isti postupak proveden je za uzorak u koji nije dodan egzogeni enzim (inhibirana venska krv uz dodatak oksima) te za neinhibirane (kontrolne) uzorke, i to za uzorak koji sadrži vensku krv, egzogeni enzim i oksim, odnosno uzorak venske krvi koji sadržava samo oksim.

Izmjerena aktivnost uzorka izražena je kao postotak kontrolne aktivnosti:

$$Reakt. = \frac{v_{(R)t}}{v_{(K)}} \cdot 100\% \quad (10)$$

gdje *Reakt.* predstavlja postotak aktivnost enzima, $v_{(R)t}$ predstavlja reaktiviranu aktivnost uzorka, odnosno povrat aktivnosti kolinesteraza u uzorku koja je posljedica razgradnje živčanog bojnog otrova, a $v_{(K)}$ kontrolnu aktivnost.

Iz odnosa postotka reaktivacije enzima (*Reakt.*) o vremenu t koja prikazuje razgradnju OP spoja potpomognutu oksimom i enzimom, može se odrediti vrijeme za koje je OP spoj u potpunosti razgrađen, tj. vrijeme kada je postignut maksimalni reaktivirani postotak aktivnosti enzima.

U uzorku venske krvi određen je i postotak AChE, odnosno BChE. Mjerena je ukupna aktivnost kolinesteraza u venskoj krvi te aktivnost uz prisutnost selektivnog inhibitora AChE ili BChE. Usporedbom ovih aktivnosti određen je postotak AChE i BChE u uzorku krvi. Tako je aktivnost AChE određena uz etopropazin (selektivni inhibitor BChE, konačne koncentracije 20 μmol dm⁻³), a aktivnost BChE uz selektivni inhibitor AChE, BW284C51 (konačna koncentracija u pokusu 10 μmol dm⁻³).

3.10. Obrada rezultata

Za svaku praćenu reakciju provedena su minimalno tri mjerenja. Statistička obrada rezultata i izračuni kinetičkih konstanti, kao i grafički prikazi izrađeni su pomoću odgovarajućih statističkih paketa Microsoft Excel i GraphPad Prism.

§ 4. *REZULTATI I RASPRAVA*

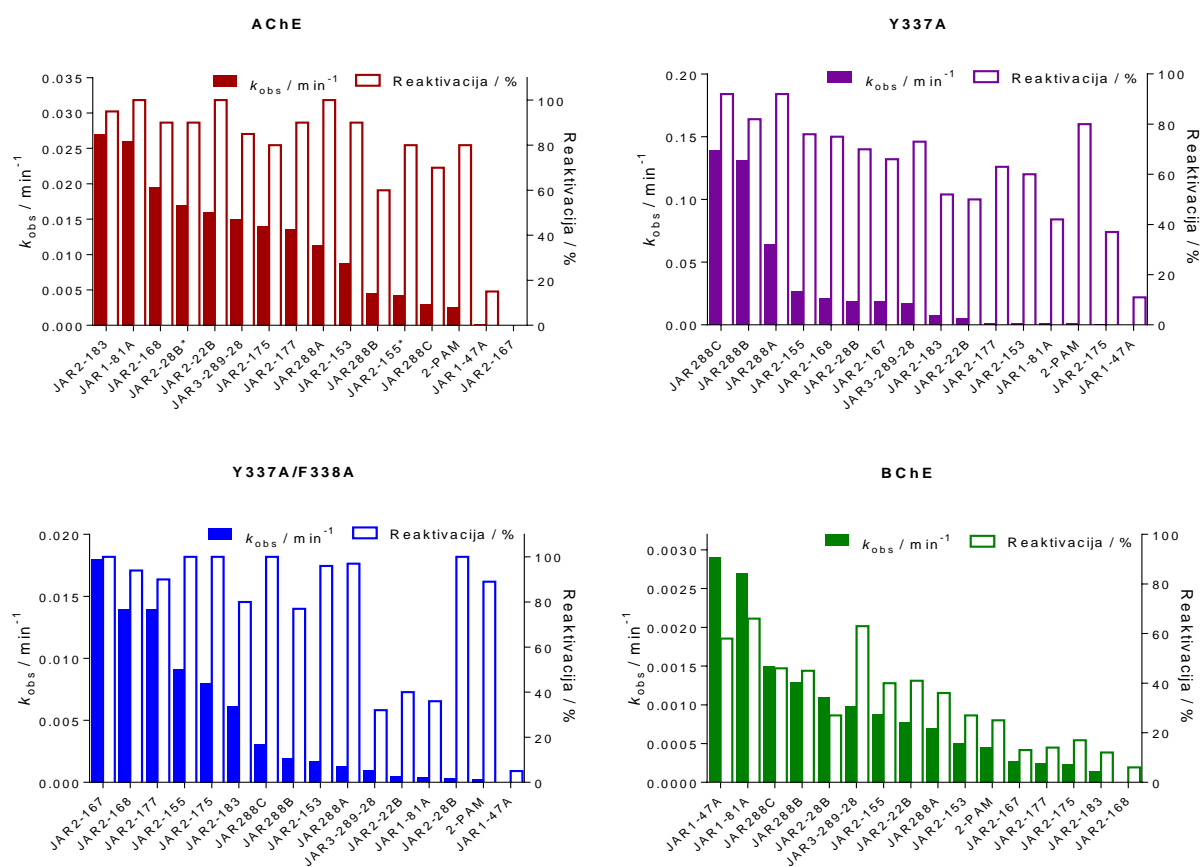
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Reaktivacija tabunom inhibiranih kolinesteraza

Učinkovitost brojnih oksima, uključujući i one klasične, u reaktivaciji tabunom inhibirane AChE vrlo je mala.^{103,137,144-147} Iz kristalne strukture konjugata tabuna i mišje AChE vidljivo je da njegovim formiranjem dolazi do promjene konformacije aminokiselinskih ostataka F338 i H447 što dovodi do smanjenja volumena u aktivnom mjestu AChE.^{94,104} Takve steričke smetnje onemogućavaju pozicioniranje oksima, između ostalih i HI-6, s oksimskom skupinom orijentiranom prema fosforiliranom katalitičkom serinu. Uz to, i slobodan elektronski par amidne skupine tabuna dodatno otežava nukleofilni napad oksimske skupine na fosforilirani katalitički serin.^{11,94} Stoga je pronalaženje učinkovitog reaktivatora tabunom fosforiliranih kolinesteraza i dalje aktualno područje istraživanja.

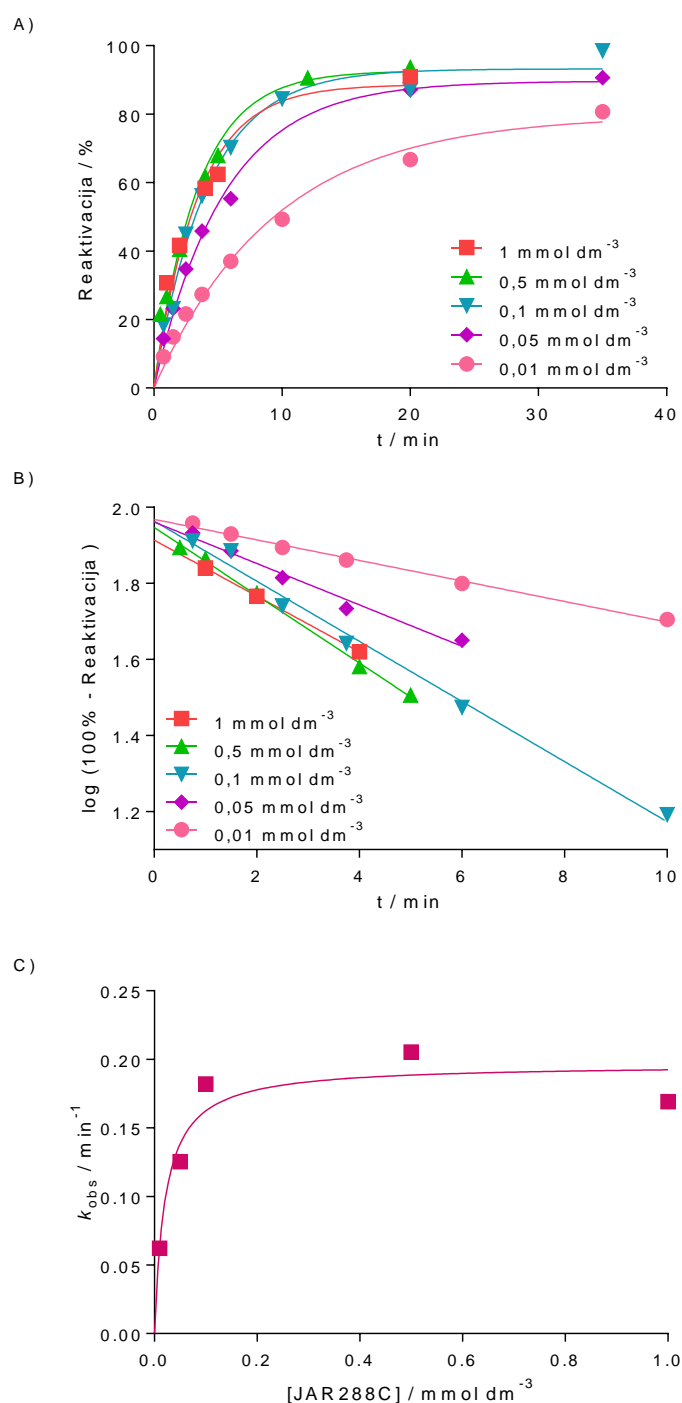
Kao reaktivatori tabunom inhibiranih AChE, njenih inačica i BChE ispitano je 15 novih JAR oksima (monopiridinijevi, imidazolijevi i piridinio-imidazolijevi, od kojih svi bisoksimi sadrže poveznicu s triazolskim prstenom) te klasični oksim 2-PAM. Za inicijalnu pretragu korištena je jedna koncentracija oksima, obično 1 mmol dm⁻³, ili 0,2 i 0,1 mmol dm⁻³ za reaktivaciju AChE s oksimima JAR2-28B, odnosno JAR2-155 zbog izražene reverzibilne inhibicije AChE tim oksimima. Reaktivacija kolinesteraza fosforiliranih tabunom praćena je unutar 24 h te je određen maksimalni postotak reaktivacije i prividna konstanta brzine reaktivacije prvog reda (k_{obs}) uz jednu koncentraciju oksima (**slika 4.1**). Međutim, inicijalnom pretragom nije pronađen niti jedan oksim koji bi bio jednako učinkovit reaktivator svih četiriju kolinesteraza inhibiranih tabunom. Povrat aktivnosti enzima veći od 50 % postiglo je 14 oksima u reaktivaciji AChE, svega 3 oksima u reaktivaciji BChE te 13 odnosno 12 oksima u reaktivaciji Y337A i Y337A/F338A inačica AChE. Iako su postotci reaktivacije relativno visoki, konstante brzine reaktivacije prvog reda, k_{obs} , razlikuju se između enzima u redu veličine (**slika 4.1**). Najbrža reaktivacija, s k_{obs} konstantom većom od 0,05 min⁻¹, zabilježena je za fosforiliranu Y337A inačicu AChE s JAR288C, JAR288B i JAR288A oksimima. Važno je istaknuti da su ova tri JAR oksima monopiridinijevi analozi 2-PAM-a. Međutim, sam 2-PAM nije bio djelotvoran reaktivator te inačice, kao ni ostalih kolinesteraza u slučaju inhibicije tabunom jer je tek nakon 24 h zabilježen relativno visok postotak reaktivacije (oko

80 %). Značajna razlika u brzini reaktivacije između JAR oksima u odnosu na 2-PAM ističe kako i mala promjena u strukturi oksima može doprinjeti uspješnosti reaktivacije.



Slika 4.1. Reaktivacija tabunom inhibiranih kolinesteraza (%) s oksimima postignuta unutar 24 h uz prividnu konstantu brzine reaktivacije prvog reda (k_{obs}). Koncentracija oksima bila je 1 mmol dm⁻³, osim za JAR2-28B i JAR2-155 koji su kod AChE testirani u 0,2 mmol dm⁻³ odnosno 0,1 mmol dm⁻³ koncentraciji. Redosljed oksima na slici odgovara srednjoj vrijednosti eksperimentalno određenih konstanti k_{obs} , poredanim od najviše do najniže.

Obzirom na rezultate inicijalne pretrage izdvojeno je nekoliko najučinkovitijih reaktivatora svake od tabunom inhibiranih kolinesteraza te je za njih načinjena detaljna kinetika reaktivacije uz nekoliko koncentracija oksima (reprezentativni prikaz na **slici 4.2**). Praćen je porast aktivnosti enzima tijekom 24 h te su određene prividne konstante brzine uz svaku pojedinu koncentraciju oksima, k_{obs} . Zatim su iz ovisnosti k_{obs} i koncentracije oksima određeni kinetički parametri kao što su: k_{+2} - konstanta brzine nukleofilnog uklanjanja vezanog OP spoja, K_{OX} - konstanta disocijacije kompleksa fosfilirani enzim-oksima, k_r - ukupna konstanta brzine reaktivacije drugog reda te maksimalni postignuti postotak reaktivacije (Reakt._{max}) i vrijeme (t) u kojem je on postignut.



Slika 4.2. Reaktivacija tabunom fosforilirane Y337A inačice AChE s oksimom JAR288C (primjer jednog pokusa). A) Ovisnost postignutog postotka reaktivacije fosforiliranog enzima o vremenu i o koncentraciji oksima. B) Određivanje konstante brzine reaktivacije prvog reda, k_{obs} , za danu koncentraciju oksima linearizacijom početnog dijela krivulje dobivene u grafu A). C) Iz ovisnosti k_{obs} o koncentraciji oksima određene su jednadžbom (7) maksimalna konstanta brzine reaktivacije prvog reda, k_{+2} , i konstanta disocijacije kompleksa fosforilirani enzim-oksime, K_{OX} . Jednadžbom (8) određena je ukupna konstanta brzine reaktivacije drugog reda, k_r .

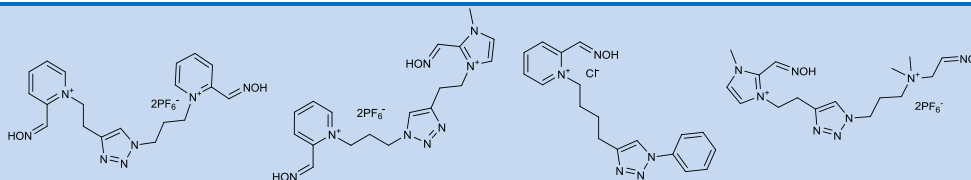
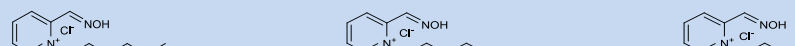
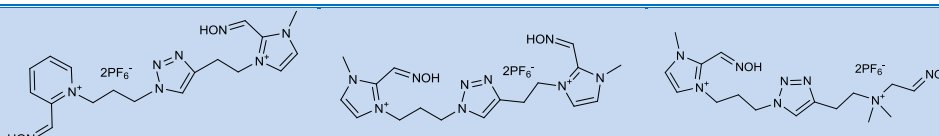

Parametri reaktivacije tabunom fosforiliranih kolinesteraza sumirani su u **tablici 4.1**. Najučinkovitiji reaktivatori tabunom fosforilirane AChE iz inicijalne pretrage, JAR2-183, JAR1-81A, JAR2-168 i JAR2-28B, u pokusima detaljne kinetike postigli su vrlo visok postotak reaktivacije enzima (80-100 %). Među njima se JAR2-28B ističe kao najučinkovitiji reaktivator AChE s najvišom određenom ukupnom konstantom brzine reaktivacije, k_r , od $3000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (**tablica 4.1, slika 4.3A**). Oksimi JAR1-81A i JAR2-183, iako su postigli najveće brzine reaktivacije (k_{+2} oko $0,03 \text{ min}^{-1}$), pokazali su se najmanje učinkovitim reaktivatorima zbog relativno niskog afiniteta ($1/K_{OX}$) fosforilirane AChE prema njima (**tablica 4.1**). Valja istaknuti kako svi oksimi za koje je načinjena detaljna kinetika u slučaju inhibicije AChE tabunom imaju triazolski prsten. Testirani oksimi, iako se uglavnom radi o bisoksimima, međusobno se razlikuju po tome da li imaju dva piridinijeva prstena, kombinaciju piridinijevog i imidazolijevog prstena ili samo jedan piridinijev, odnosno imidazolijev prsten. Međutim, budući da su oksimi s triazolskim prstenom sintetizirani klik-kemijom iz azidnih i alkinskih jedinica, primjećuju se i određene strukturne sličnosti. Tako oksimi JAR2-28B i JAR2-168 imaju identičnu azidnu, a oksimi JAR2-168 i JAR2-183 alkinsku jedinicu. S obzirom na zajedničke strukturne elemente tih oksima i na slične K_{OX} konstante JAR2-28B i JAR2-168 (oko 30 puta manje od JAR2-183), možemo pretpostaviti da piridinijev prsten azidne strukturne jedinice tih oksima povećava afinitet fosforilirane AChE prema njima. Međutim, oksimska skupina na piridinijevom prstenu nije idealno pozicionirana prema katalitičkom serinu fosforilirane AChE pa je brzina reaktivacije tim oksimima niža od one određene za JAR2-183. Da bi došlo do uspješne reaktivacije oksimska skupina mora biti pozicionirana u blizinu i orijentirana prema fosforiliranom katalitičkom serinu. Oksim u kompleksu s enzimom može zauzeti različite konformacije, ovisno o interakcijama s aminokiselinama aktivnog mjesta enzima te se orijentirati na dva načina, o čemu ovisi i učinkovitost reaktivacije. U skladu s tim, da bi došlo do reaktivacije fosforilirane AChE s JAR1-81A, ili bilo kojim monoksimom, nužna je usmjerenost oksimske skupine prema fosforiliranom katalitičkom serinu.

Inačice AChE dizajnirane su, između ostalog, s ciljem da uvedene mutacije u aktivnom mjestu AChE pospješuju reaktivaciju, odnosno omoguće bolje pristajanje i orijentaciju oksima u aktivnom mjestu enzima. Kao najučinkovitiji reaktivatori tabunom inhibirane Y337A inačice istaknuli su se monopiridinijevi oksimi: JAR288C, JAR288B i JAR288A. Ovi oksimi međusobno se razlikuju samo po duljini supstituenta na piridinijevom prstenu (heksilni,

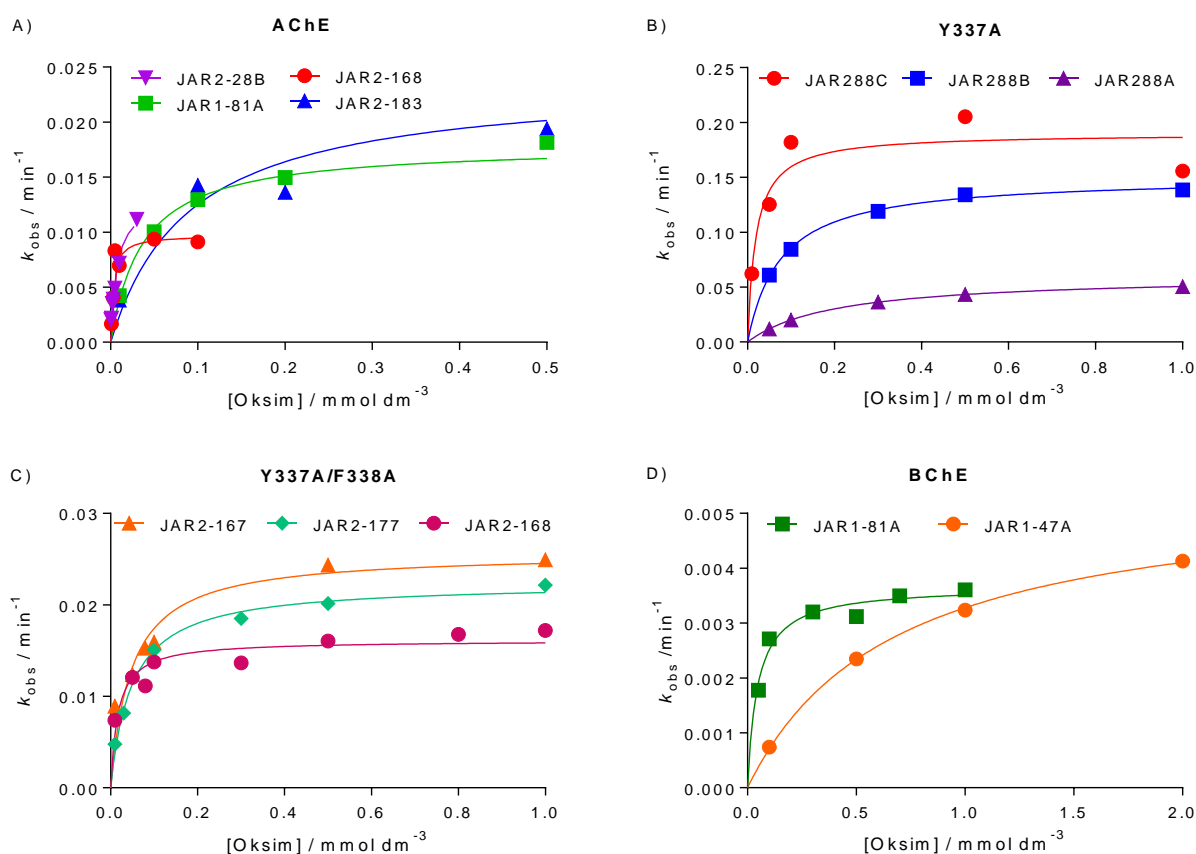
butilni i propilni). Prema određenim konstantama k_{+2} i K_{OX} , primjećuje se da duljina tog supstituenta ima značajnu ulogu u učinkovitosti reaktivacije (**tablica 4.1, slika 4.3B**). Naime, s duljinom lanca bočnog supstituenta povećava se hidrofobnost molekule, a što je oksim hidrofobniji povoljnije su i njegove interakcije s aminokiselinama aktivnog mjesta enzima. Oksim JAR288C (heksilni supstituent na piridinijevom prstenu) istaknuo se s najvišom postignutom k_{+2} konstantom od $0,2 \text{ min}^{-1}$ i najnižom K_{OX} konstantom, odnosno ukupnom konstantom brzine reaktivacije, k_r , od $6000 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$, što ga čini najučinkovitijim reaktivatorom tabunom fosforilirane Y337A inačice AChE. Na **slici 4.2** dan je prikaz pokusa reaktivacije tabunom inhibirane Y337A uz raspon koncentracija JAR288C oksima. Vidi se da je za 20 min vraćeno oko 90 % enzimske aktivnosti uz 1 mmol dm^{-3} JAR 288C. Dakle, mutacija aromatskog tirozina u kolinskom veznom mjestu alifatskim alaninom pozitivno je utjecala na smještanje i orijentaciju oksima u položaj povoljan za stvaranje većeg broja produktivnih interakcija s aminokiselinskim ostacima aktivnog mjesta enzima što je rezultiralo uspješnom defosforilacijom katalitičkog serina, odnosno povećanjem konstante k_{+2} u odnosu na AChE i postizanjem visoke ukupne konstante brzine reaktivacije drugog reda, k_r .

Oksimi JAR2-168, JAR2-167 i JAR2-177 izdvojeni su inicijalnom pretragom kao najučinkovitiji reaktivatori tabunom inhibirane Y337A/F338A inačice AChE. Iako su sva tri oksima reaktivirala fosforiliranu Y337A/F338A inačicu 100 %, JAR2-167 se istaknuo s najvišom k_{+2} konstantom, ali zbog 3 puta višeg afiniteta fosforilirane inačice prema JAR2-168 ovaj oksim se pokazao najučinkovitijim reaktivatorom (**tablica 4.1, slika 4.3C**). Ovi oksimi su bisoksimi s triazolskim prstenom u poveznici. Oksim JAR2-168 sadrži piridinijev i imidazolijev prsten, JAR2-177 jedan imidazolijev, a JAR2-167 dva imidazolijeva prstena. Za oksime JAR2-167 i JAR2-177 koji sadrže istu strukturnu jedinicu s oksimskom skupinom na imidazolijevom prstenu određena je viša k_{+2} konstanta od one za JAR2-168. Piridinijev prsten JAR2-168 oksima povećava stabilizaciju i afinitet, ali oksimska skupina nije u idealnom položaju za nukleofilni napad na fosforilirani katalitički serin pa je i k_{+2} konstanta niža. Interesantno, oksim JAR2-168 se istaknuo kao reaktivator i divljeg tipa AChE i Y337A/F338A inačice AChE (**tablica 4.1**). Međutim, kinetičke konstante ukazuju da dvostruka mutacija u kolinskom veznom mjestu ne mijenja značajno brzinu defosforilacije Y337A/F338A inačice (svega 1,5 puta), ali zato smanjuje njen afinitet prema JAR2-168 oksimu za čak 6 puta u odnosu na fosforiliranu AChE.

Tablica 4.1. Reaktivacija tabunom inhibiranih kolinesteraza: kinetičke konstante (\pm standardna pogreška) izračunate jednadžbama (7)–(9) iz prividnih konstanti k_{obs} , dobivenih iz provedenih pokusa, maksimalni postotci reaktivacije (Reakt._{max}) i vrijeme (t) u kojem su postignuti.

| | |
|---|---|
| AChE |  |
| Oksim ($\mu\text{mol dm}^{-3}$) | JAR2-28B (0,5-300) JAR2-168 (1-1000) JAR1-81A (10-1000) JAR2-183 (5-2000) |
| k_{+2} / min^{-1} | 0,015 \pm 0,001 0,010 \pm 0,001 0,026 \pm 0,003 0,028 \pm 0,002 |
| $K_{\text{OX}} / \mu\text{mol dm}^{-3}$ | 5 \pm 1 4 \pm 2 73 \pm 36 126 \pm 35 |
| $k_r / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$ | 3000 \pm 630 2500 \pm 1275 355 \pm 180 220 \pm 65 |
| Reakt. _{max} / % | 90 80 100 95 |
| t / min | 180-240 130-300 180 180 |
| Y337A |  |
| Oksim ($\mu\text{mol dm}^{-3}$) | JAR288C (10-1000) JAR288B (20-1000) JAR288A (50-1000) |
| k_{+2} / min^{-1} | 0,201 \pm 0,010 0,158 \pm 0,010 0,056 \pm 0,005 |
| $K_{\text{OX}} / \mu\text{mol dm}^{-3}$ | 33 \pm 7 69 \pm 19 214 \pm 56 |
| $k_r / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$ | 6090 \pm 1240 2290 \pm 650 260 \pm 70 |
| Reakt. _{max} / % | 90 90 90 |
| t / min | 20 20 60 |
| Y337A/F338A |  |
| Oksim ($\mu\text{mol dm}^{-3}$) | JAR2-168 (5-1000) JAR2-167 (10-1000) JAR2-177 (10-1000) |
| k_{+2} / min^{-1} | 0,016 \pm 0,001 0,033 \pm 0,002 0,024 \pm 0,002 |
| $K_{\text{OX}} / \mu\text{mol dm}^{-3}$ | 24 \pm 6 68 \pm 18 59 \pm 21 |
| $k_r / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$ | 670 \pm 170 485 \pm 130 410 \pm 150 |
| Reakt. _{max} / % | 100 100 100 |
| t / min | 180 230 150 |
| BChE |  |
| Oksim ($\mu\text{mol dm}^{-3}$) | JAR1-81A (50-1000) JAR1-47A (100-2000) |
| k_{+2} / min^{-1} | 0,0050 \pm 0,0010 0,0060 \pm 0,0010 |
| $K_{\text{OX}} / \mu\text{mol dm}^{-3}$ | 127 \pm 96 365 \pm 290 |
| $k_r / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$ | 40 \pm 30 15 \pm 10 |
| Reakt. _{max} / % | 40-80 20-90 |
| t / h | 10 12 |

Uklanjanjem Y337 i F338 povećan je volumen aktivnog mjesta enzima što smanjuje broj mogućih π - π interakcija oksima i enzima. Zbog toga je moguć i veći broj orijentacija oksima što otežava formiranje prijelaznog stanja reaktivacije pa je JAR2-168 učinkovitiji reaktivator tabunom fosforilirane AChE s oko 4 puta većom k_r konstantom.

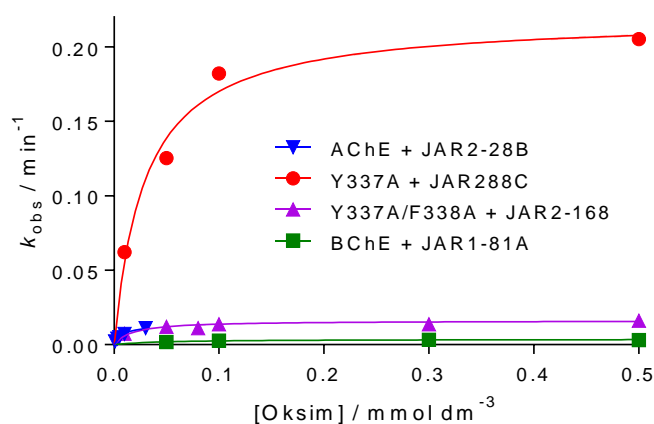


Slika 4.3. Najučinkovitiji reaktivatori tabunom fosforiliranih kolinesteraza (**tablica 4.1**). Ovisnost brzine reaktivacije o koncentraciji testiranih oksima iz najmanje tri pokusa.

U inicijalnoj pretrazi reaktivatora tabunom fosforilirane BChE maksimalni postotak reaktivacije veći od 50 % postigla su tek tri testirana oksima: JAR1-47A, JAR1-81A i JAR288C. Izrazito niske k_{obs} konstante za oksime testirane u 1 mmol dm^{-3} koncentraciji, pri čemu je najviša k_{obs} desetak puta niža od najviše k_{obs} određene pri reaktivaciji AChE, dalo je naslutiti da niti jedan od tih oksima neće značajno doprinjeti uspješnosti reaktivacije tabunom fosforilirane BChE. Oksimi JAR1-81A i JAR1-47A ispitani u detaljnoj kinetici reaktivirali su oko 20-90 % aktivnosti BChE, ovisno o koncentraciji oksima, ali tek nakon 10-12 h (**tablica 4.1**). Raspon maksimuma reaktivacije i platoe koji se javljaju prilikom reaktivacije uz više

koncentracija oksima za sada je teško objasniti. Moguće je da dolazi do reinhibicije reaktivirane kolinesteraze fosfiliranim oksimom. Naime, pokazano je da konjugati tog tipa (nekolicine OP spojeva i 2-, 3- te 4-PAM-a) mogu biti jednako potentni, pa i jači inhibitori od samih OP spojeva.^{148,149} Izrazito mala brzina defosforilacije (niska k_{+2} konstanta) i mali afinitet fosforiliranog enzima za oksim, $1/K_{OX}$, diskreditirali su daljnje istraživanje BChE u kombinaciji s testiranim oksimima kao pseudokatalitičkog čistila u slučaju inhibicije tabunom (**tablica 4.1, slika 4.3D**). Ta činjenica nije toliko iznenađujuća s obzirom da su ispitivani oksimi dizajnirani kao potencijalni reaktivatori fosfilirane AChE. Na temelju kristalne strukture BChE-tabun konjugata za pretpostaviti je da je sama struktura, a između ostalog i veći volumen unutar aktivnog mjesta BChE ili nedostatak aromatskih aminokiselina, uzrok brojnim neproduktivnim interakcijama s oksimom unutar aktivnog mjesta enzima, što je u konačnici rezultiralo neučinkovitom reaktivacijom.^{147,150,151}

Na **slici 4.4** prikazana je ovisnost k_{obs} konstante o rasponu koncentracija najučinkovitijih reaktivatora svake od tabunom inhibiranih kolinesteraza.



Slika 4.4. Sumarni prikaz najučinkovitijih reaktivatora tabunom fosforiliranih kolinesteraza oksimima (**tablica 4.1**). Ovisnost brzine reaktivacije o koncentraciji testiranih oksima iz najmanje tri pokusa.

U suglasju s literaturom, najučinkovitiji reaktivatori izdvojeni su prema kriterijima koji podrazumjevaju visok postotak reaktivacije, visoku vrijednost konstante brzine defosfilacije katalitičkog serina (k_{+2}) i relativno dobar afinitet fosfilifane AChE za oksim ($1/K_{OX}$)^{7,152} jer bi previsok afinitet (nmol dm⁻³ do fmol dm⁻³) ukazivao na veći broj interakcija oksima s aminokiselinama aktivnog mjesta. Osim povoljnih, mogu se stvoriti i one neproduktivne

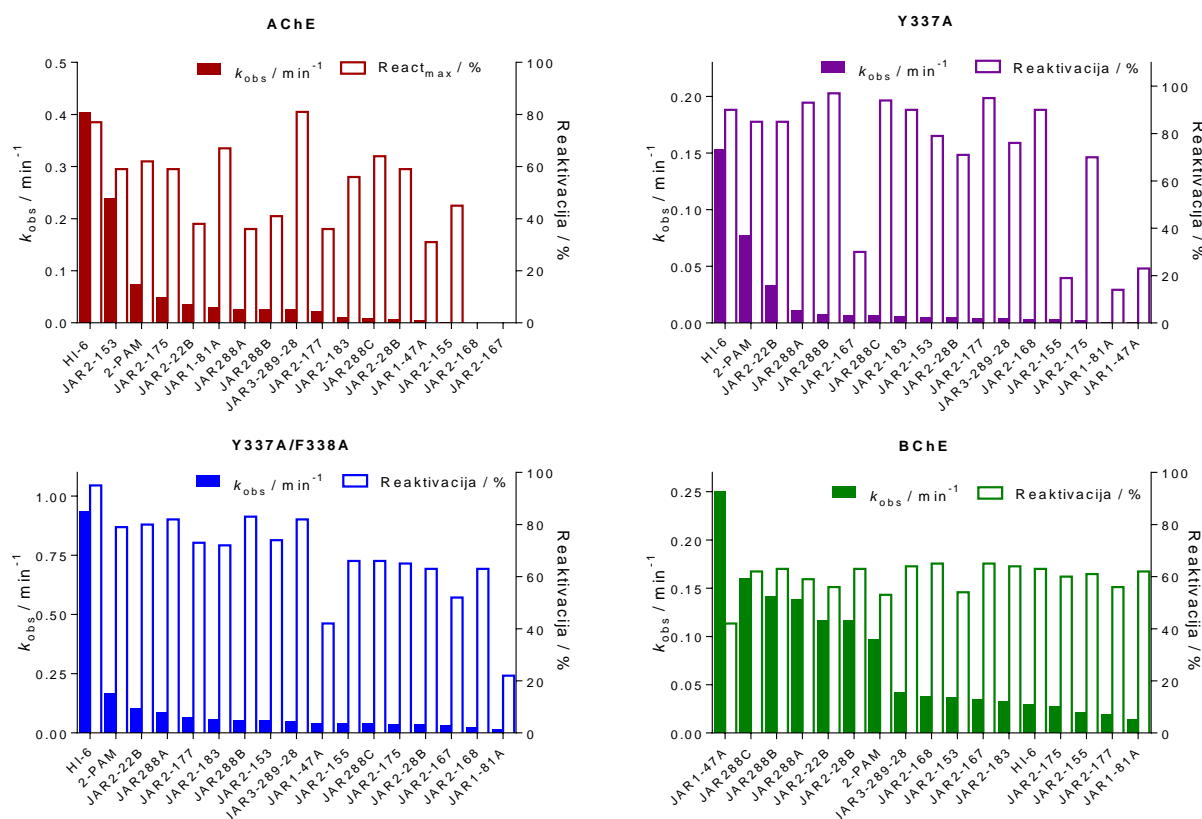
interakcije koje bi orijentirale i stabilizirale oksim u ne tako povoljan položaj za nukleofilni napad u odnosu na fosforilirani katalitički serin pa bi reaktivacija izostala ili bi bila jako spora. Vidljivo je da izuzetno povećanje k_{+2} konstante ($0,2 \text{ min}^{-1}$) u reaktivaciji Y337A inačice AChE s JAR288C ističe ovaj par za daljnje testiranje kao pseudokatalitičkog čistila u *ex vivo* uvjetima.

4.2. Reaktivacija VX-om inhibiranih kolinesteraza

Kristalna struktura konjugata AChE (*T. californica*) i VX-a pokazala je da fosfonilacijom dolazi do promjene konformacije imidazolnog prstena katalitičkog histidina AChE, slično kao kod tabuna, kako bi se omogućilo smještanje etoksi supstituenta VX-a.⁹⁰ Međutim, za razliku od tabuna, kolinesteraze inhibirane VX-om lakše je reaktivirati. Naime, Sidell i Grof su još 1974.¹⁵³ godine pokazali da su klasični oksimi HI-6 i 2-PAM učinkovit reaktivatori VX-om inhibirane AChE, što je dodatno potvrđeno istraživanjima narednih godina.^{9,144,153-157}

U skladu s tim, ovim istraživanjem testirana je učinkovitost 15 novih JAR oksima i dva klasična oksima, HI-6 i 2-PAM, kao reaktivatora kolinesteraza fosfoniliranih VX-om. Rezultat inicijalne pretrage dan je na **slici 4.5**. Oksimi JAR2-28B i JAR2-155 su u 1 mmol dm^{-3} koncentraciji reverzibilno inhibirali AChE pa su stoga testirani u nižoj, $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ koncentraciji. Povrat aktivnosti enzima veći od 50 % unutar 24 h postignut je s 9 oksima u reaktivaciji AChE, 16 oksima u reaktivaciji BChE te 13 odnosno 15 oksima u reaktivaciji Y337A i Y337A/F338A inačica AChE. Kao najučinkovitiji reaktivator VX-om inhibirane AChE i njenih inačica istaknuo se HI-6, dok je monopiridinijev oksim JAR1-47A pokazao potencijal u reaktivaciji fosfonilirane BChE (**slika 4.5**). Najdjelotvorniji reaktivatori su uglavnom bili piridinijevi oksimi (HI-6, 2-PAM i njegovi monopiridinijevi JAR analozi). Jedini oksim s triazolskim prstenom u poveznici koji se pokazao djelotvornim reaktivatorom VX-om inhibirane AChE bio je JAR2-153.

Za najučinkovitije reaktivatore iz inicijalne pretrage načinjena je detaljna kinetika reaktivacije uz nekoliko koncentracija oksima kako bi se odredili parametri reaktivacije kolinesteraza sumirani u **tablici 4.2**. Prema ovim rezultatima, piridinijevi oksimi s oksimskom skupinom uglavnom u *ortho* položaju istaknuli su se kao učinkoviti reaktivatori ispitivanih kolinesteraza. Izuzetak je JAR1-47A čija je oksimska skupina u *meta* položaju.

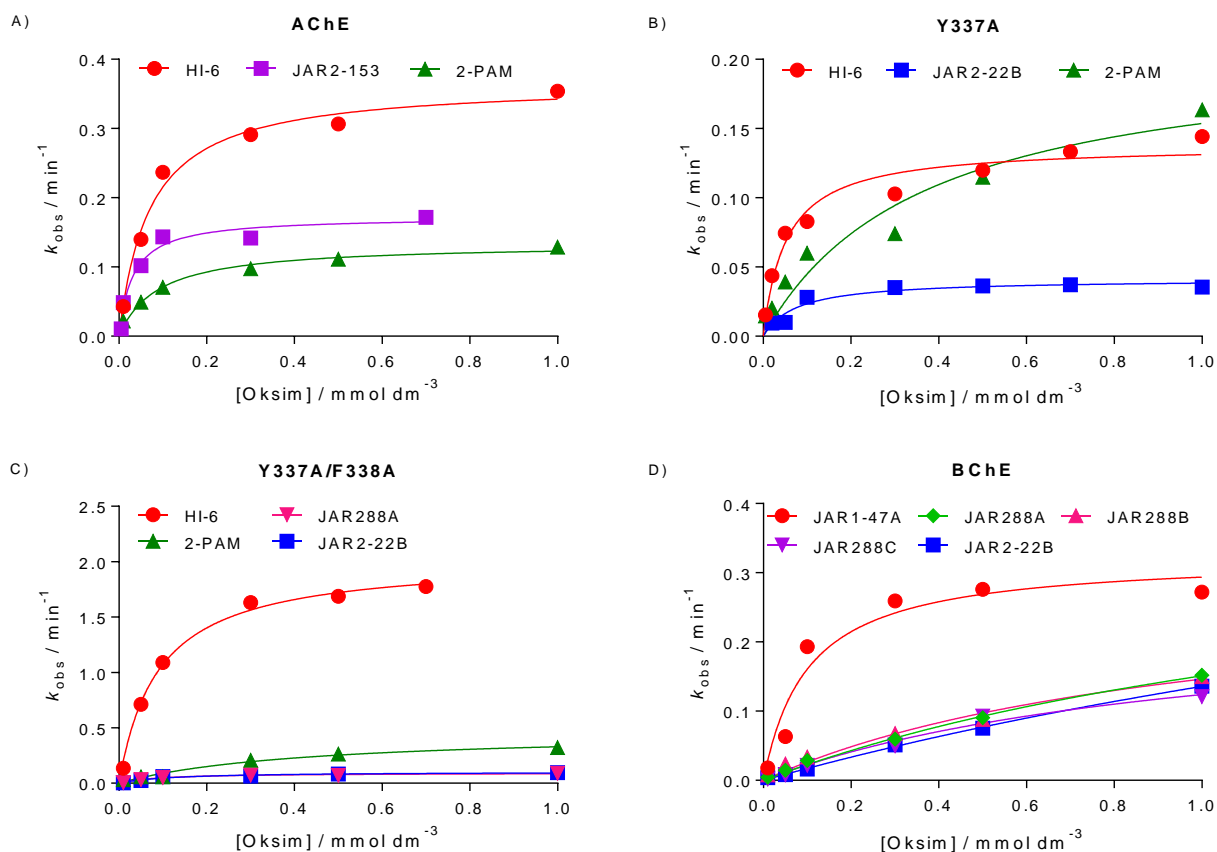


Slika 4.5. Reaktivacija VX-om inhibiranih kolinesteraza (%) s oksimima postignuta unutar 24 h uz prividnu konstantu brzine reaktivacije prvog reda (k_{obs}). Koncentracija oksima bila je 1 mmol dm^{-3} , osim za JAR2-28B i JAR2-155 koji su kod AChE testirani u $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ koncentraciji. Redosljed oksima na slici odgovara srednjoj vrijednosti eksperimentalno određenih konstanti k_{obs} , poredanim od najviše do najniže.

U reaktivaciji VX-om fosfonilirane AChE kao najdjelotvorniji reaktivator istaknuo se HI-6 s 2 odnosno 3 puta većom k_{+2} konstantom od JAR2-153 i 2-PAM-a (**tablica 4.2, slika 4.6A**). Međutim, zbog 2 puta većeg afiniteta fosfonilirane AChE određenog za JAR2-153 taj oksim ima neznatno višu k_r konstantu od HI-6. Visok postotak reaktivacije (70-90 %) postignut je s HI-6 i JAR2-153 oksimima, ali u slučaju 2-PAM-a dolazi do pojave reaktivacijskih platoa (moguće zbog reinhibicije reaktivirane kolinesteraze fosfiliranim oksimom) i ovisno o njegovoj koncentraciji reaktivirano je 40-80 % fosfoniliranog enzima. S obzirom na strukturne razlike najučinkovitijih reaktivatora, od kojih je JAR2-153 bisoksim s triazolским prstenom u poveznici između dva piridinijeva prstena, HI-6 je bispiridinijev monoksim s kisikom u poveznici, a 2-PAM je monopiridinijev oksim, ne može se diskutirati o preferenciji VX-om fosfonilirane AChE prema određenoj strukturi oksima.

Tablica 4.2. Reaktivacija VX-om inhibiranih kolinesteraza: kinetičke konstante (\pm standardna pogreška) izračunate jednadžbama (7)–(9) iz prividnih konstanti, k_{obs} , dobivenih iz provedenih pokusa, maksimalni postotci reaktivacije (Reakt._{max}) i vrijeme (t) u kojem su postignuti.

| | | | | | |
|---|-----------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| AChE | | | | | |
| Oksim ($\mu\text{mol dm}^{-3}$) | JAR2-153 (5-700) | HI-6 (10-1000) | 2-PAM (10-1000) | | |
| k_{+2} / min^{-1} | $0,153 \pm 0,008$ | $0,333 \pm 0,015$ | $0,116 \pm 0,007$ | | |
| $K_{\text{OX}} / \mu\text{mol dm}^{-3}$ | 24 ± 6 | 58 ± 11 | 58 ± 15 | | |
| $k_r / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$ | 6380 ± 160 | 5740 ± 1120 | 2000 ± 530 | | |
| Reakt. _{max} / % | 70 | 90 | 40-80 | | |
| t / min | 30-60 | 15-60 | 30-90 | | |
| Y337A | | | | | |
| Oksim ($\mu\text{mol dm}^{-3}$) | HI-6 (0,5-1000) | 2-PAM (0,5-1000) | JAR2-22B (20-1000) | | |
| k_{+2} / min^{-1} | $0,142 \pm 0,006$ | $0,154 \pm 0,019$ | $0,038 \pm 0,004$ | | |
| $K_{\text{OX}} / \mu\text{mol dm}^{-3}$ | 40 ± 5 | 110 ± 45 | 60 ± 25 | | |
| $k_r / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$ | 3530 ± 720 | 1400 ± 640 | 600 ± 280 | | |
| Reakt. _{max} / % | 80 | 10-65 | 35-60 | | |
| t / min | 25-90 | 20-40 | 60-90 | | |
| Y337A/F338A | | | | | |
| Oksim ($\mu\text{mol dm}^{-3}$) | HI-6 (10-1000) | 2-PAM (10-1000) | JAR288A (10-1000) | JAR2-22B (10-1000) | |
| k_{+2} / min^{-1} | $1,850 \pm 0,072$ | $0,411 \pm 0,037$ | $0,080 \pm 0,005$ | $0,107 \pm 0,006$ | |
| $K_{\text{OX}} / \mu\text{mol dm}^{-3}$ | 58 ± 9 | 317 ± 72 | 65 ± 17 | 128 ± 24 | |
| $k_r / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$ | 31900 ± 5100 | 1300 ± 320 | 1230 ± 330 | 840 ± 160 | |
| Reakt. _{max} / % | 95 | 20-80 | 40-80 | 25-80 | |
| t / min | 1-15 | 15-40 | 40-90 | 30-60 | |
| BChE | | | | | |
| Oksim ($\mu\text{mol dm}^{-3}$) | JAR1-47A (1-1000) | JAR288B (1-1000) | JAR2-22B (1-1000) | JAR288C (1-1000) | JAR288A (1-1000) |
| k_{+2} / min^{-1} | $0,288 \pm 0,020$ | $0,187 \pm 0,035$ | $0,332 \pm 0,102$ | $0,331 \pm 0,093$ | $0,450 \pm 0,123$ |
| $K_{\text{OX}} / \mu\text{mol dm}^{-3}$ | 90 ± 26 | 538 ± 208 | 1329 ± 609 | 1315 ± 567 | 1866 ± 712 |
| $k_r / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$ | 3200 ± 950 | 350 ± 150 | 260 ± 140 | 250 ± 130 | 240 ± 110 |
| Reakt. _{max} / % | 5-45 | 10-60 | 10-65 | 10-70 | 10-65 |
| t / h | 5 | 20-60 | 20-60 | 20-60 | 20-60 |



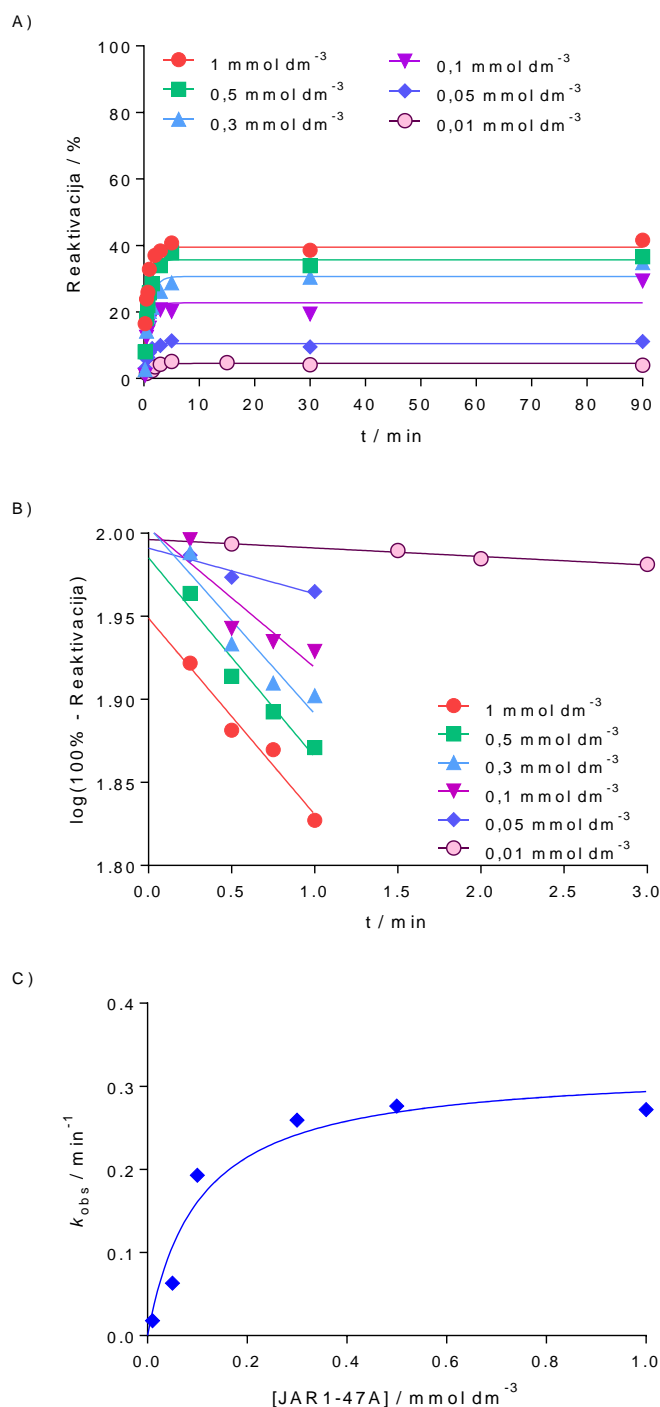
Slika 4.6. Najučinkovitiji reaktivatori VX-om fosforiliranih kolinesteraza (tablica 4.2). Ovisnost brzine reaktivacije o koncentraciji testiranih oksima iz najmanje tri pokusa.

Objekti VX-om fosfonilirane inačice AChE također su uz visok postotak povrata aktivnosti najučinkovitije reaktivirane s HI-6. Uvođenje dvostruke mutacije rezultiralo je, u odnosu na AChE, s 5,5 puta većom konstantom k_{+2} , dok je afinitet fosfonilirane Y337A/F338A inačice za HI-6 ostao nepromijenjen (tablica 4.2, slika 4.6). Tako je 95 % aktivnosti VX-om inhibirane Y337A/F338A inačice reaktivirano s 1 mmol dm^{-3} HI-6 za samo 1 min, a sa 100 puta nižom koncentracijom HI-6 za 15 min (tablica 4.2). Dakle, zamjenom dva aromatska aminokiselinska ogranka (Y i F) CH_3 skupinama (A) uklonjena je mogućnost stvaranja π - π interakcija tirozina i fenilalanina s HI-6 te je povećan volumen u aktivnom mjestu enzima što je olakšalo smještanje HI-6 u aktivno mjesto i njegov pristup fosfoniliranom katalitičkom serinu. Povećao se broj mogućih kutova orijentacije oksimske skupine u odnosu na fosfonilirani serin, tj. uspješnost nukleofilnog napada oksimske skupine na fosforov atom što opisuje konstanta k_{+2} . Kako je molekulsko modeliranje HI-6 u aktivno mjesto AChE pokazalo da se oksimska skupina nalazi na udaljenosti 5,4 Å od fosfoniliranog katalitičkog serina, a

samo 3,7 Å od fosforovog atoma fosfonilirane Y337A/F338A inačice AChE,²⁸ možemo reći da je združeni utjecaj Y337A i F338A mutacija u kolinskom mjestu AChE ključan za ovdje utvrđenu uspješnost reaktivacije VX-om fosfonilirane Y337A/F338A s HI-6. Poslije HI-6, slabiji učinak u reaktivaciji VX-om inhibirane Y337A/F338A inačice AChE pokazali su 2-PAM i njegovi monopiridinijevi analozi JAR288A i JAR2-22B. Međutim javljaju se reaktivacijski platoi (moguća reinhibicija enzima fosfoniliranim oksimom), a postotak reaktivacije fosfonilirane inačice bio je 20-80 % (ovisno o koncentraciji oksima) za razliku od gotovo 100 %-tne reaktivacije s HI-6.

Mutacija Y337A, osim na smanjenje k_{+2} konstante, neznatno je utjecala i na afinitet fosfoniliranog Y337A prema HI-6 koji je 1,5 puta veći od onog AChE (**tablica 4.2, slika 4.6B**). Slabiji učinak u reaktivaciji pokazali su 2-PAM s oko 3 puta nižim afinitetom fosfonilirane Y337A prema tom oksimu te JAR2-22B. Slično kao kod Y337A/F338A inačice, pri reaktivaciji s rasponom koncentracija 2-PAM-a i JAR2-22B oksima javljaju se platoi i reaktivira se 10-65 % enzima, za razliku od 80 %-tne reaktivacije s HI-6.

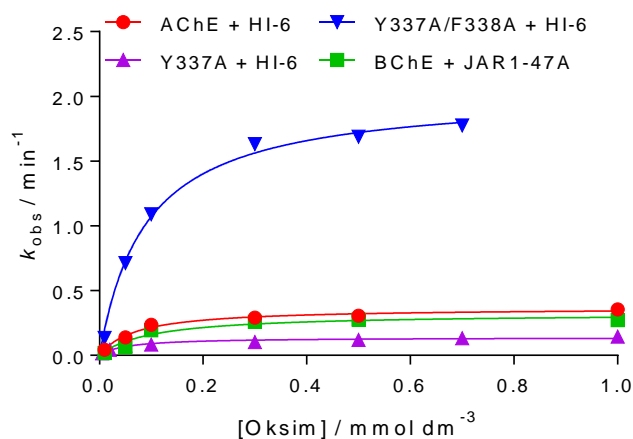
Kao djelotvorni reaktivatori VX-om inhibirane BChE inicijalnom pretragom su izdvojeni oksimi JAR1-47A, JAR288B, JAR2-22B, JAR288C i JAR288A. Detaljnom kinetikom određene konstante k_{+2} su relativno visoke (oko 0,2-0,45 min⁻¹) dok se postotak reaktivacije inhibirane BChE, ovisno o koncentraciji oksima, kretao od 5 do 70 % (**tablica 4.2**). No, afinitet fosfonilirane BChE prema testiranim oksimima je slab (K_{OX} uglavnom veći od 1 mmol dm⁻³). Izuzetak je oksim JAR1-47A koji se zbog relativno dobrog afiniteta istaknuo kao najdjelotvorniji reaktivator BChE inhibirane VX-om (**tablica 4.2**). Međutim, iako je maksimalni postotak reaktivacije postignut za samo 5 min, iznosio je tek 40 %. **Slika 4.7** prikazuje reaktivaciju VX-om inhibirane BChE s JAR1-47A oksimom. Uočava se pojava reaktivacijskih platoa ovisno o koncentraciji JAR1-47A (**slika 4.7A**), a dolazi i do nakupljanja reverzibilnog [E-OP][OX] kompleksa (**slika 4.7B**) i zasićenja enzima pri višim koncentracijama JAR1-47A oksima (**slika 4.7C**). Mogući uzrok pojave reaktivacijskih platoa je reinhibicija BChE fosfoniliranim oksimom. Oksimi JAR2-22B, JAR 288B, JAR288C te JAR288A su monopiridinijevi analozi 2-PAM-a s oksimskom skupinom u *ortho* položaju, koji se međusobno razlikuju samo po duljini supstituenta na piridinijevom prstenu. Zanimljivo je primjetiti da fosfonilirana BChE ima slab afinitet za te oksime u odnosu na najučinkovitiji reaktivator, JAR1-47A, koji ima oksimsku skupinu u *meta* položaju na piridinijevom prstenu i alkinski supstituent ($K_{OX} < 1$ mmol dm⁻³).



Slika 4.7. Reaktivacija VX-om inhibirane BChE s oksimom JAR1-47A (primjer jednog pokusa). A) Ovisnost postignutog postotka reaktivacije fosfoniliranog enzima o vremenu i o koncentraciji oksima. B) Određivanje konstante brzine reaktivacije prvog reda, k_{obs} , za danu koncentraciju oksima linearizacijom početnog dijela krivulje dobivene u grafu A). C) Iz ovisnosti k_{obs} o koncentraciji oksima određene su jednadžbom (7) maksimalna konstanta brzine reaktivacije prvog reda, k_{+2} , i konstanta disocijacije kompleksa fosfonilirani enzim-oksim, K_{OX} . Jednadžbom (8) određena je ukupna konstanta brzine reaktivacije drugog reda, k_r .

Isto tako je interesantno da se monopiridinijev oksim JAR2-22B izdvaja kao potencijalni reaktivator za BChE kao i za inačice AChE. Uvidom u **tablicu 4.2** uočava se da je konstanta k_{+2} određena za reaktivaciju BChE s JAR2-22B bila 9, tj. 3 puta viša od one određene za Y337A, odnosno Y337A/F338A inačicu AChE. Međutim, zbog slabog afiniteta fosfonilirane BChE reaktivacija VX-om inhibirane BChE s JAR2-22B oksimom nije učinkovita.

Sumiranjem rezultata najučinkovitije reaktivacije za sve četiri kolinesteraze inhibirane VX-om na **slici 4.8** vidljivo je da se Y337A/F338A i HI-6 ističu po reaktivaciji kao najpotencijalniji pseudokatalitički par za razgradnju VX-a.



Slika 4.8. Sumarni prikaz najučinkovitijih reaktivatora VX-om fosfoniliranih kolinesteraza oksimima (**tablica 4.2**). Ovisnost brzine reaktivacije o koncentraciji testiranih oksima iz najmanje tri pokusa.

4.3. Starenje somanom inhibirane Y337A/F338A inačice acetilkolinesteraze

Jedna od mogućih reakcija nakon fosfilacije katalitičkog serina kolinesteraza je starenje nastalog konjugata čime dolazi do formiranja negativnog naboja na konjugatu te enzim ostaje ireverzibilno inhibiran. Konjugati svih OP spojeva s kolinesterazama stare, ali vrijeme nakon kojeg enzim postaje trajno inhibiran razlikuje se ovisno o enzimu i vezanom OP spoju. Pokazano je da najbrže stare konjugati AChE i metilfosfonil difluorida te metilfosfonil diklorida, prekursora u sintezi somana, sarina i VX-a, a zatim konjugati AChE i somana.¹⁵⁸ Poluvrijeme starenja ljudskih AChE, BChE i Y337A inačice AChE inhibiranih somanom je 6 do 9 min pri pH 8 i 25 °C (**tablica 4.3**). Snižavanje pH ubrzava starenje pa je tako pokazano

da ljudska AChE inhibirana somanom pri fiziološkom pH 7,4 i 25 °C ima poluvrijeme starenja manje od 2 min¹² nakon kojeg je reaktivacija oksimima nemoguća.

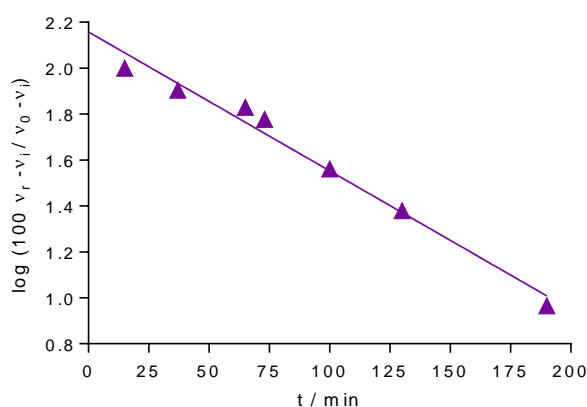
Kristalna struktura ostarjelog i tek formiranog konjugata AChE (*T. californica*) i somana pokazala je da važnu ulogu u procesu starenja imaju aminokiselinski ostatci E199, F331, E443, H440 i Y84 (*T. californica*) koji odgovaraju E202, F338, E450, H447 i W86 ljudske AChE.^{97,159,160} Predloženi mehanizam koji opisuje ubrzano stvaranje karbenijevog iona, tj. brzo starenje konjugata AChE i somana uključuje utjecaj molekule vode na cijepanje veze između O₂ i C_α atoma somana. Naime, stvaranjem vodikove veze između vode i Y133 povećava se polarnost O₂-C_α veze što ubrzava cijepanje iste.^{97,163} Nadalje, dolazi do stabilizacije naboja na kisiku i otpuštanja nestabilnog sekundarnog pinakolilnog karbenija (1,2,2 trimetilpropil-karbenij) nakon čega slijedi premještanje metilnog ostatka s C_β na C_α atom i stvaranja tercijarnog karbenija (2,3 dimetilbutil-karbenija) (**slika 2.9**).^{97,163} Starenjem dolazi do neznatne, ali ipak važne promjene u položaju imidazolskog prstena H447 što dovodi do stvaranja "slanog" mosta između imidazolskog prstena histidina i O₂ pinakolilnog ostatka somana.¹⁶³ Smatra se da H447 nije direktno uključen u mehanizam starenja zbog steričkih smetnji uzrokovanih velikom razgranatom pinakolilnom skupinom somana i položaja imidazolskog prstena koji nije idealan za stvaranje vodikove veze s kisikom pinakolila (odnosno protoniranje kisika pinakolila) nego doprinosi stabilizaciji kompleksa elektrostatskim efektom.¹⁶³ E202 se nalazi u blizini C_α atoma somana s kojim stvara elektrostatske interakcije te stabilizira nastajanje sekundarnog karbenijevog iona, a W86 na isti način stabilizira pozitivni naboj sekundarnog karbenija.^{97,163} Starenje dodatno ubrzavaju i elektrostatske interakcije F338 s H447 čime se stabilizira imidazolski prsten histidina i olakšava stvaranje oksonijevog iona konjugata.^{97,163}

Tablica 4.3. Konstante brzine starenja, k_a , i poluvrijeme starenja, $t_{1/2}$, kolinesteraza fosfoniliranih somanom. Konstante su određene pri 25 °C i pH 8, odnosno pH 7,4.

| Kolinesteraza | | k_a (min ⁻¹) | $t_{1/2}$ (min) | Referenca |
|---------------|--------------------|----------------------------|-----------------|------------|
| pH 7,4 | Y337A/F338A | 0,014 | 50,00 | - |
| | AChE | 0,54 | 1,3 | 12 |
| pH 8 | AChE | 0,11 | 6,30 | 97,161,162 |
| | BChE | 0,08 | 9,00 | 97,161,162 |
| | Y337A | 0,16 | 4,33 | 97,161,162 |

Budući da je rješavanje kristalnih struktura ostarjelog i tek nastalog konjugata AChE i somana dalo odgovor koji su aminokiselinski ostatci uključeni u mehanizam starenja, mutacijom tih aminokiselina dizajnirane su inačice AChE kod kojih bi reakcija starenja morala biti sporija.^{27,28,97} Daljnjim istraživanjima je među tim inačicama AChE pronađen velik broj onih koje su, u većoj ili manjoj mjeri, usporile starenje konjugata sa somanom.^{27,28,97}

Da bi se odredio utjecaj kombinacije Y337A i F338A mutacija na brzinu starenja, praćen je postotak aktivnosti enzima reaktiviranog s HI-6 u vremenu. Na **slici 4.9** dan je grafički prikaz vremenskog tijeka starenja somanom fosfonilirane Y337A/F338A inačice AChE. Nagib pravca predstavlja konstantu brzine starenja, k_a , Y337A/F338A inačice fosfonilirane somanom (**tablica 4.3**).

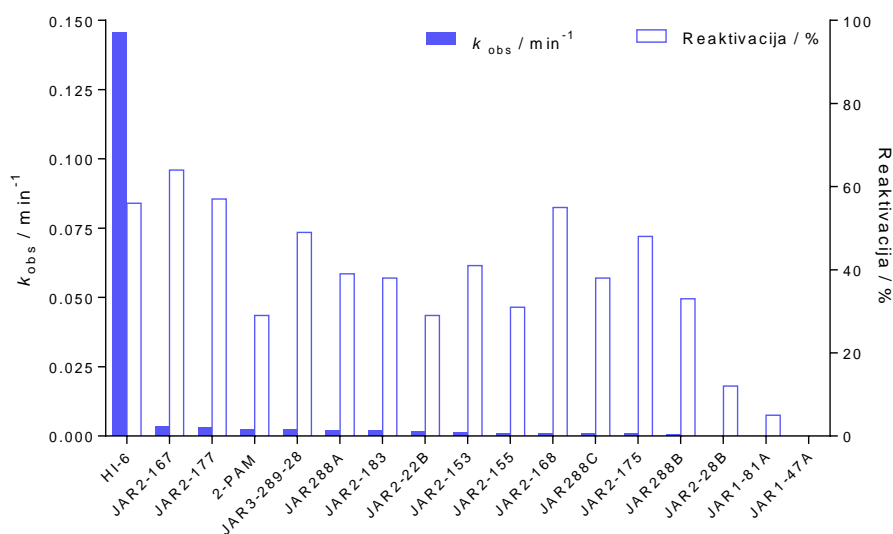


Slika 4.9. Primjer jednog pokusa starenja somanom fosfonilirane Y337A/F338A inačice AChE. Logaritamska ovisnost aktivnosti somanom inhibirane frakcije Y337A/F338A inačice AChE reaktivirane s HI-6 (1 mmol dm^{-3}) o vremenu. Nagib pravca predstavlja konstantu brzine starenja, k_a , određenu prema jednadžbi (5). Poluvrijeme starenja ($t_{1/2}$) određeno je iz konstante k_a prema jednadžbi (6).

Oko 35 puta duže poluvrijeme starenja u odnosu na fosfoniliranu AChE pri pH 7,4 i 25 °C pokazalo je da F338A mutacija Y337A/F338A inačice AChE doprinosi usporavanju starenja soman–Y337A/F338A konjugata. Vremensko razdoblje od 50 min u kojem je moguća reaktivacija fosfonilirane inačice uvelike povećava mogućnost terapije, odnosno primjene profilakse u slučaju trovanja somanom. Stoga je Y337A/F338A dobar kandidat za istraživanje kao enzimskom komponenta pseudokatalitičkog čistila u kombinaciji s oksimom, posebice ako bi se pronašao učinkovit reaktivator te inačice AChE fosfonilirane somanom.

4.4. Reaktivacija somanom inhibiranih kolinesteraza

Obzirom na izrazito brzo starenje konjugata kolinesteraza i somana, reaktivacija ispitivanih kolinesteraza fosfoniliranih somanom praćena je samo za Y337A/F338A inačicu AChE za koju je određeno da usporeno stari. Inicijalnom pretragom reaktivacije Y337A/F338A inačice fosfonilirane somanom određen je postotak reaktivacije i prividna konstanta brzine reaktivacije prvog reda (k_{obs}) uz 1 mmol dm^{-3} oksime (**slika 4.10**).



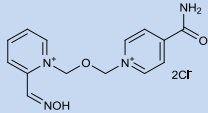
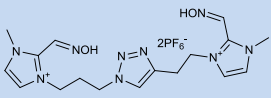
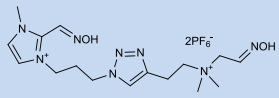
Slika 4.10. Reaktivacija somanom inhibirane Y337A/F338A inačice AChE (%) s oksimima postignuta unutar 24 h uz prividnu konstantu brzine reaktivacije prvog reda (k_{obs}). Koncentracija oksima bila je 1 mmol dm^{-3} . Redosljed oksima na slici odgovara srednjoj vrijednosti eksperimentalno određenih konstanti k_{obs} , poredanim od najviše do najniže.

Od 17 testiranih, samo su 4 oksima reaktivirala od 50 do 65 % aktivnosti enzima unutar 24 h (**slika 4.10**). Međutim, konstante k_{obs} su izrazito niske ($0,001\text{-}0,003 \text{ min}^{-1}$), izuzev one određene za HI-6 (oko $0,15 \text{ min}^{-1}$). Valja spomenuti da je još 1981. godine pokazano da oksimi koji su relativno učinkoviti u reaktivaciji somanom inhibirane AChE imaju oksimsku skupinu u *ortho* položaju na piridinijevom prstenu i kisik u poveznici između dva piridinijeva prstena te da dodatnoj stabilizaciji oksima u aktivnom mjestu AChE doprinosi CO-NH_2 skupina.¹⁰⁵ Tom strukturnom opisu odgovara, između ostalih, i oksim HI-6.

Detaljnijom kinetikom reaktivacije načinjenom uz širi raspon koncentracija oksima, za tri najučinkovitija reaktivatora somanom fosfonilirane Y337A/F338A inačice AChE: HI-6,

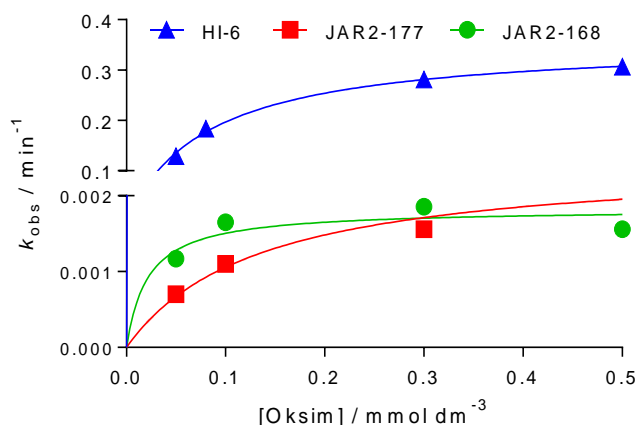
JAR2-167 i JAR2-177, određene su kinetičke konstante te ostali parametri reaktivacije sumirani u **tablici 4.4**.

Tablica 4.4. Reaktivacija somanom inhibirane Y337A/F338A inačice AChE: kinetičke konstante (\pm standardna pogreška) izračunate jednadžbama (7)–(9) iz prividnih konstanti, k_{obs} , dobivenih iz provedenih eksperimenata, maksimalni postotci reaktivacije ($\text{Reakt.}_{\text{max}}$) i vrijeme (t) u kojem su postignuti.

| Y337A/F338A |  |  |  |
|---|---|--|---|
| Oksim (mmol dm ⁻³) | HI-6 (0,05–1) | JAR2-167 (0,05–1) | JAR2-177 (0,05–2) |
| k_{+2} / min^{-1} | 0,210 \pm 0,035 | 0,0020 \pm 0,0001 | 0,0030 \pm 0,0010 |
| $K_{\text{OX}} / \mu\text{mol dm}^{-3}$ | 60 \pm 37 | 33 \pm 15 | 162 \pm 56 |
| $k_r / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$ | 3560 \pm 1930 | 60 \pm 25 | 20 \pm 5 |
| Reakt. $_{\text{max}}$ / % | 60 | 15–50 | 20–60 |
| t / min | 10-30 | 300 | 300 |

HI-6 se ističe među testiranim oksimima po oko 100 puta većoj konstanti k_{+2} od one u slučaju reaktivacije Y337A/F338A s JAR2-167 i JAR2-177 oksimima, što se može uočiti i na **slici 4.11**. Reaktivacijom somanom inhibirane Y337A/F338A inačice AChE pomoću HI-6 vraćeno je oko 60 % aktivnosti enzima u 30 min. Međutim, u slučaju reaktivacije s JAR2-167 i JAR2-177 oksimima, dolazi do pojave reaktivacijskih platoa, najvjerojatnije zbog starenja konjugata pa je, ovisno o koncentraciji oksima, vraćeno tijekom dužeg vremena tek 15-60 % aktivnosti enzima. Inačica Y337A/F338A dizajnirana je s ciljem da F338A mutacija uspori starenje konjugata Y337A/F338A i somana te da mutacija Y337A dovede do povećanja brzine reaktivacije konjugata.^{27,28,30} Međutim, izgleda da mutacija tirozina 337 u alanin nije u slučaju JAR oksima olakšala bliže smještanje i orijentaciju oksimske skupine prema fosfoniliranom serinu kao što je to pokazano za reaktivaciju Y337A inačice inhibirane OP spojevima sličnim somanu s HI-6.¹⁶⁴ Očite razlike u kinetičkim parametrima reaktivacije (**tablica 4.4**) potvrđuju ulogu strukturnih elemenata, određenih prije skoro 35 godina, na učinkovitost oksima u reaktivaciji konjugata sa somanom. Naime, oba JAR oksima su imidazolijevi bisoksimi i sadrže triazolski prsten u poveznici po čemu se strukturno bitno razlikuju od najučinkovitijeg reaktivatora somanom inhibirane Y337A/F338A inačice,

bispiridinijevog monoksima HI-6 s kisikom u poveznici. Visoka vrijednost konstante defosfonilacije i postotak reaktivacije inhibiranog Y337A/F338A s HI-6 veći od 50 % omogućuju njegovo daljnje testiranje u paru s HI-6 za *ex vivo* razgradnju somana.



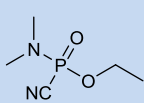
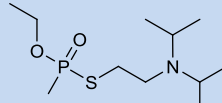
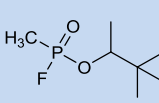
Slika 4.11. Najučinkovitiji reaktivatori somanom fosfonilirane Y337A/F338A inačice AChE (tablica 4.4). Ovisnost brzine reaktivacije o koncentraciji testiranih oksima iz najmanje tri pokusa.

Nadalje, valja spomenuti da je soman specifičan i po tome što ima dva kiralna centra. Jedan kiralni centar se nalazi na fosforovom atomu, a drugi na ugljikovom atomu (C_a) pinakolilne skupine pa prema tome soman ima i četiri izomera, odnosno dva dijastereoizomera: $P_{(+/-; R/S)} C_{(+/-; S/R)}$. AChE pokazuje veću stereoselektivnost prema P_S dijastereoizomerima i to $7,5 \times 10^4$ puta veću prema $P_S C_S$ stereoizomeru u odnosu na $P_R C_R$ stereoizomer.^{84,165} Izomeri utječu i na brzinu starenja AChE. Međutim brzina starenja konjugata AChE i $P_S C_S$, odnosno $P_S C_R$ stereoizomera, s kojima AChE preferentno stvara interakcije, bitno se ne razlikuje.^{84,165} Također se zna da AChE pokazuje približno dva puta veću stereoselektivnost prema $P_S C_S$ stereoizomeru koji se brže i reaktivira, nego prema $P_S C_R$ stereoizomeru, ali i da pojedinačne mutacije Y337A i F338A nisu utjecale na stereoselektivnost.^{12,28,164} Dakle, može se pretpostaviti da će stereoselektivnost inhibicije i reaktivacije Y337A/F338A inačice AChE biti slična stereoselektivnosti divljeg tipa AChE.

4.5. Inhibicija aktivnosti kolinesteraza tabunom, VX-om i somanom

Tabun, soman i VX su iznimno potentni ireverzibilni inhibitori kolinesteraza^{80,82} te je za očekivati da mutacije u aktivnom mjestu nativnog enzima mogu utjecati na brzinu fosfilacije. Kako bi se utvrdio utjecaj mutacija Y337A i Y337A/F338A u mjestu vezanja kolina AChE određene su konstante brzine inhibicije, k_i , za AChE, inačice AChE i BChE. Iz ovisnosti aktivnosti enzima o vremenu inkubacije uz nekoliko koncentracija tabuna, VX-a ili somana određena je prividna konstanta brzine inhibicije, k_{obs} . nakon čega je iz linearne ovisnosti k_{obs} o koncentraciji OP spoja određena konstanta brzine inhibicije drugog reda, k_i (**slika 4.12**, **tablica 4.5**). Konstante određene za inhibiciju AChE i BChE u skladu su s onima objavljenim u literaturi.^{103,130}

Tablica 4.5. Konstante brzine inhibicije drugog reda (k_i) kolinesteraza tabunom, VX-om i somanom. Rezultati u tablici predstavljaju srednju vrijednost provedenih eksperimenata \pm standardna devijacija.

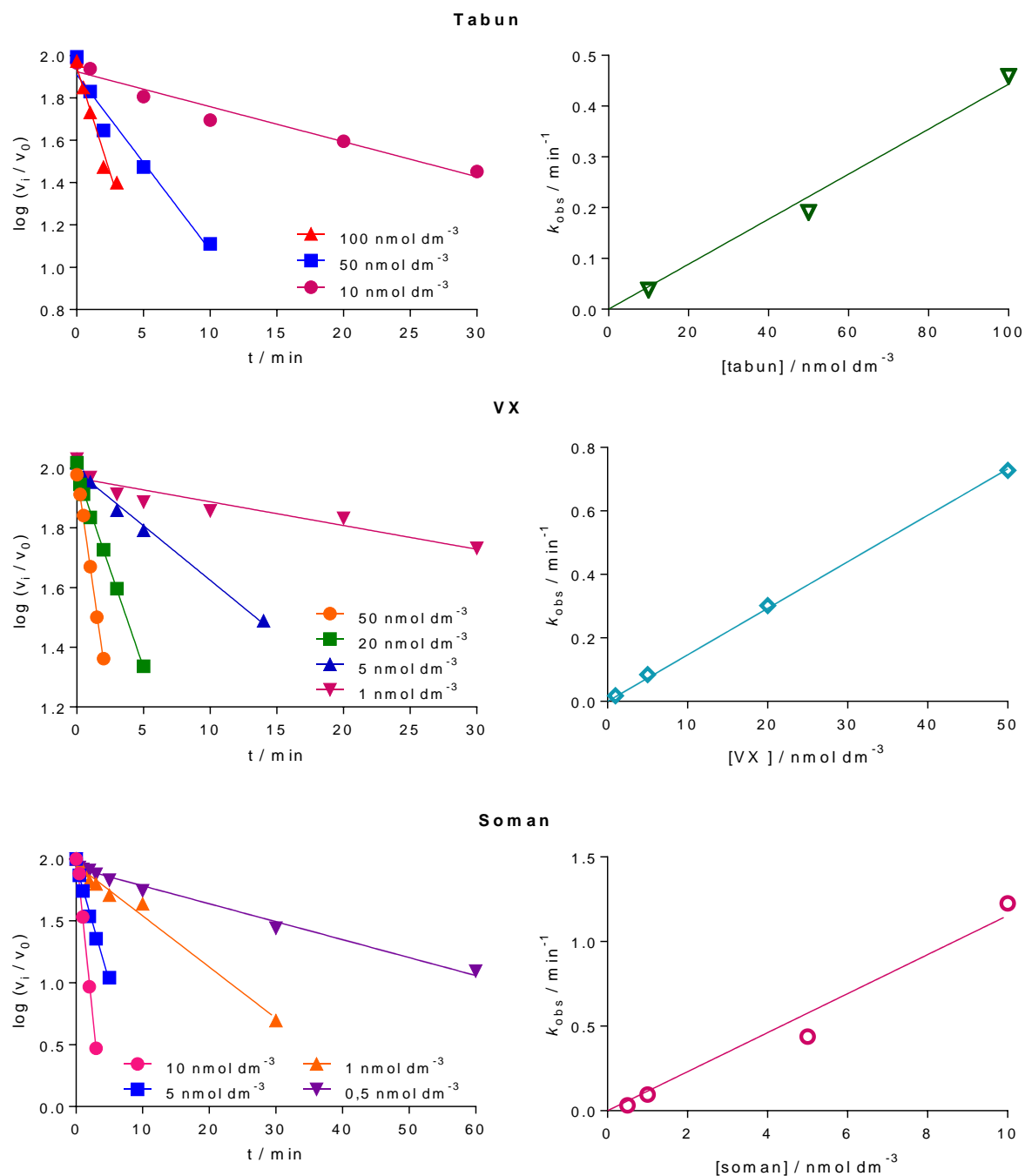
| | $k_i / \text{dm}^3 \mu\text{mol}^{-1} \text{min}^{-1}$ | | |
|-------------|---|--|---|
| |  |  |  |
| | Tabun | VX | Soman |
| AChE | $4,7 \pm 0,2$ | $11,1 \pm 1,1$ | $100,0 \pm 0,2$ |
| BChE | $1,2^a$ | $4,0 \pm 0,1$ | $82,6 \pm 2,3$ |
| Y337A | $1,1^b$ | $44,8 \pm 0,6$ | $38,3 \pm 1,7$ |
| Y337A/F338A | $40,0 \pm 2,5$ | $14,4 \pm 1,6$ | $77,2 \pm 0,01$ |

^a vrijednost određena za ljudsku BChE (plazma); ^b vrijednost određena za Y337A inačicu AChE miša

Brzina inhibicije AChE prati trend soman > VX > tabun. Dakle, AChE se najbrže inhibira somanom koji se s konstantom k_i od $10^8 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ svrstava u kategoriju najbržih inhibitora. Naime, soman već u koncentraciji od 10 nmol dm^{-3} inhibira AChE u potpunosti za 2-3 min (**slika 4.12**). Usporedbe radi, za približno 80 %-tnu inhibiciju AChE tabunom u 50 nmol dm^{-3} koncentraciji potrebno je 10-15 min, a VX-om iste koncentracije 3-5 min.

Isti trend inhibicije s OP spojevima primjećuje se i za inhibiciju BChE (**tablica 4.5**), iako se BChE inhibira nešto sporije od AChE svim testiranim OP spojevima. Tako je brzina inhibicije BChE sporija oko 4 puta od brzine inhibicije AChE u slučaju inhibicije tabunom, za

20 % od brzine inhibicije AChE u slučaju inhibicije somanom te 2,8 puta od inhibicije AChE u slučaju inhibicije VX-om.



Slika 4.12. Progresivna inhibicija AChE tabunom, VX-om i somanom (primjer jednog pokusa). Iz korelacije pada aktivnosti enzima u vremenu određena je prividna konstanta brzine inhibicije uz ispitivanu koncentraciju OP spoja, k_{obs} , a konstanta brzine inhibicije drugog reda, k_i , iz ovisnosti k_{obs} o koncentraciji OP spoja.

Konstante inhibicije Y337A i Y337A/F338A inačica AChE istog su reda veličine kao one za divlji tip AChE (**tablica 4.5**). Određeno je da se Y337A inačica AChE najbrže inhibira VX-om, i to oko 4 puta brže nego divlji tip AChE. Međutim, zamjena dvije aromatske aminokiseline malim alifatskim alaninima u slučaju inhibicije somanom rezultirala je neznatnim smanjenjem brzine inhibicije, ali zato je imala za posljedicu ubrzanje inhibicije tabunom za 9 puta u odnosu na divlji tip AChE. Naime, uklanjanjem aromatskih ograna tirozina i fenilalanina olakšano je pozicioniranje tabuna u blizinu katalitičkog serina enzima.

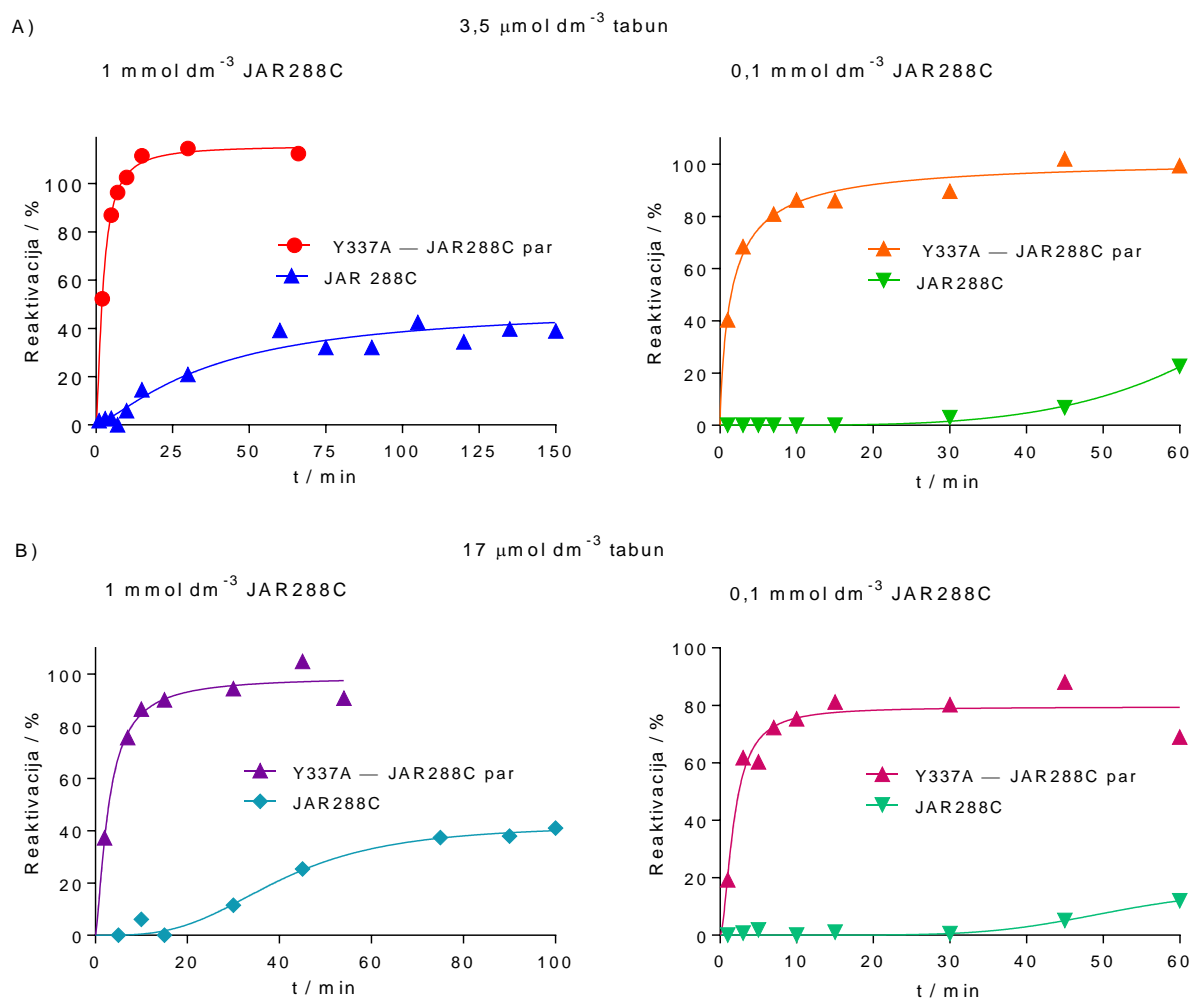
Za učinkovito biološko čistilo važno je da konstanta brzine inhibicije k_i , bude barem reda veličine one određene za AChE divljeg tipa, ili viša. Egzogeni enzimi s nižom brzinom inhibicije nisu dobar odabir za enzimsku komponentu pseudokatalitičkog čistila jer ne bi učinkovito razgradili OP spoj ciklusima inhibicije i reaktivacije enzima prije nego se OP spoj distribuirao u organizmu i inhibira sinaptičku AChE. Razgradnja OP spoja oksim-enzim parom bila bi u tom slučaju ograničena brzinom inhibicije enzima OP spojem, a ne učinkovitošću reaktivatora, odnosno brzinom reaktivacije inhibiranog enzima.³⁰ Budući da je BChE endogeno stehiometrijsko čistilo, a odobrena je i od strane FDA za korištenje u profilaksi kao egzogeni enzim, njena neznatno niža k_i od onih određenih za AChE pri inhibiciji tabunom, VX-om i somanom, omogućuje razvoj pseudokatalitičkog čistila na bazi BChE uz učinkovit reaktivator. Međutim, poznato je da BChE inhibirana somanom stari u vrlo kratkom vremenu (9 min, pH 8)⁹⁷ što predstavlja otegotnu okolnost u razvoju pseudokatalitičkog čistila za razgradnju somana. Nadalje, Y337A/F338A inačica AChE se zbog deseterostrukog ubrzanja inhibicije tabunom i brzine inhibicije VX-om i somanom slične onoj divljeg tipa AChE, može izdvojiti kao potencijalna enzimskom komponenta pseudokatalitičkog čistila za razgradnju tih živčanih bojnih otrova. S druge strane, iako je brzina inhibicije Y337A inačice AChE tabunom nešto sporija od brzine inhibicije divljeg tipa AChE, njena vrlo učinkovita reaktivacija s oksimom JAR288C (**tablica 4.1**) izdvaja ovaj par kao najpotencijalniji par za razmatranje kao pseudokatalitičkog čistila u slučaju trovanja tabunom. Potencijal za razgradnju VX-a imaju obje inačice AChE jer su uvedene mutacije rezultirale ubrzanjem inhibicije (**tablica 4.5**), a u ovom istraživanju su izdvojeni i njihovi učinkoviti reaktivatori (**tablica 4.2**).

4.6. *Ex vivo* oksim-enzim potpomognuta razgradnja živčanih bojnih otrova

Oksim-enzim potpomognutu razgradnju živčanih bojnih otrova moguće je pratiti u ljudskoj krvi, a *ex vivo* pokusom simulirani su uvjeti slični onima koji se mogu očekivati u krvotoku u slučaju izloženosti OP spoju. Učinak razgradnje OP spoja prije nego se on distribuira u organizmu ključan je za očuvanje aktivnosti sinaptičke AChE i sprječavanje pojave ozbiljnih toksičnih posljedica za organizam pa čak i smrti. Kako bi se u uzorku venske krvi ispitala učinkovitost oksim-enzim para kao pseudokatalitičkog čistila u krv je dodana jedna od ispitivanih kolinesteraza prije inkubacije s deseterostrukim ili pedeseterostrukim suviškom OP spoja. Nakon inkubacije takvog sustava u trajanju od 10 min do 1 h, da se postigne 100 %-tna inhibicija aktivnosti uzorka, dodan je oksim. S obzirom da krv sadrži eritrocitnu AChE i BChE, simultano se pratila reaktivacija inhibiranog uzorka venske krvi testiranim oksimom da se vidi doprinos nativnih (endogenih) kolinesteraza razgradnji OP spoja. Razgradnja OP spoja očitovala se porastom mjerene aktivnosti kolinesteraza u uzorku što je označavalo uspješnu cikličku inhibiciju enzimske komponente pseudokatalitičkog čistila OP spojem i njenu reaktivaciju oksimom.

4.6.1. *Tabun*

Za oksim-enzim potpomognutu razgradnju tabuna u *ex vivo* uvjetima testirani su Y337A inačica AChE i oksim JAR288C, koji su izabrani na osnovu svojih kinetičkih karakteristika. Ljudska venska krv obogaćena je Y337A inačicom AChE i inkubirana s 10 ili 50 puta višom koncentracijom tabuna te je zatim nakon dodatka JAR288C praćen povrat enzimske aktivnosti. Pokusi su prikazani na **slici 4.13**. U slučaju deseterostrukog suviška tabuna od Y337A i uz 1 mmol dm^{-3} JAR288C, tabun je u potpunosti razgrađen za otprilike 15 min nakon čega je katalitička aktivnost sustava dosegla svoj maksimum od 100 %. Dobiveni rezultati su u skladu s *in vitro* pokusom, kada je 90 % aktivnosti Y337A inačice reaktivirano za 20 min (**tablica 4.1**). Potpuna razgradnja tabuna vidljiva je unutar otprilike 20 min i u slučaju kombinacije Y337A s nižom koncentracijom JAR288C oksima (**slika 4.13**). Povrat aktivnosti enzima i to gotovo u potpunosti u vrlo kratkom vremenu znači da je ciklus inhibicije Y337A inačice AChE tabunom i reaktivacije JAR288C oksimom bio izrazito brz što čini par JAR288C–Y3337A djelotvornim pseudokatalitičkim čistilom tabuna.



Slika 4.13. *Ex vivo* JAR288C–Y337A potpomognuta razgradnja A) $3,5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ i B) $17 \mu\text{mol dm}^{-3}$ tabuna (primjer jednog pokusa). Uzorak ljudske venske krvi obogaćen je 330 nmol dm^{-3} Y337A inačicom AChE u koji je nakon inkubacije s tabunom dodan JAR288C (1 ili $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$).

Kako je određeno da ljudska krv sadrži 80-85 % AChE i 15-20 % BChE učinkovitost pseudokatalitičkog čistila mogla bi se dodatno unaprijediti ukoliko bi oksim bio učinkovit reaktivator i nativne AChE, odnosno BChE. Stoga je ovdje paralelno provjerena i reaktivacija nativnih kolinesteraza u uzorku venske krvi. Prema inicijalnoj pretrazi (**slika 4.1**), *in vitro* aktivnost tabunom inhibirane AChE i BChE oksimom JAR288C (1 mmol dm^{-3}) vraćena je na 50-60 %, ali puno sporije nego u slučaju reaktivacije tabunom inhibirane Y337A inačice AChE (niža k_{obs} konstanta u odnosu na Y337A). Stoga se u ovom slučaju nije niti moglo očekivati značajno unaprijeđenje učinkovitosti pseudokatalitičkog čistila reaktivacijom nativne AChE i BChE, kao što se i vidi na **slici 4.13A** gdje je potrebno sat vremena za reaktivaciju nativnih kolinesteraza s višom koncentracijom JAR288C oksima. Početni zastoj reaktivacije s

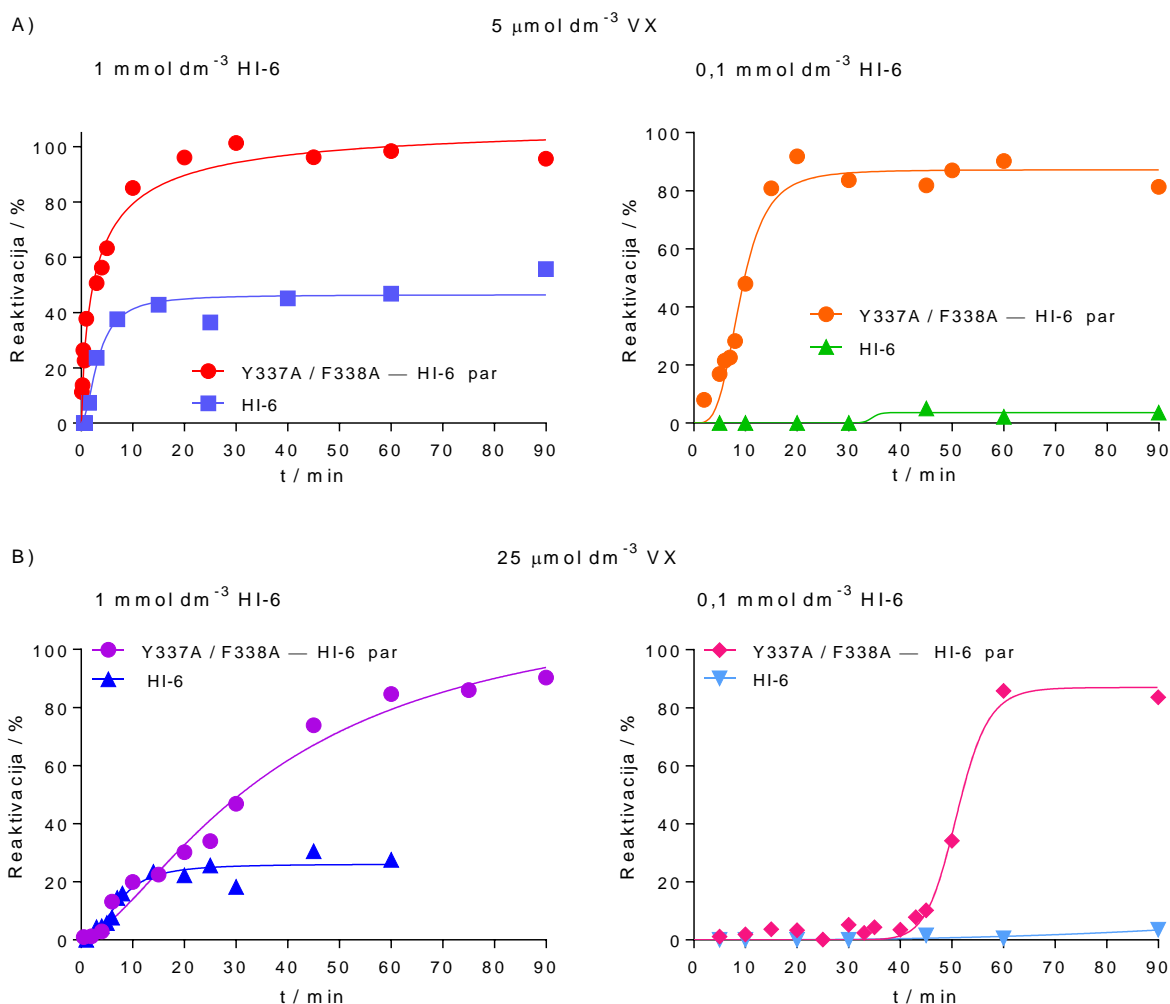
višom koncentracijom tabuna, odnosno nižom koncentracijom oksima, dodatno ukazuje na podkapacitiranost venske krvi kao čistila. Reaktivacija nije vidljiva sve dok se koncentracija tabuna i kolinesteraza ne približi stehiometrijskom odnosu. Tek kada koncentracija reaktiviranih kolinesteraza postane veća od koncentracije slobodnog tabuna počinje trend porasta aktivnosti enzima.

4.6.2. VX

Oksim-enzim potpomognuta razgradnja VX-a u *ex vivo* uvjetima ispitana je s nekoliko kombinacija enzima i njihovim najučinkovitijim reaktivatorima (**tablica 4.2**), i to inačice AChE s HI-6, a BChE s JAR1-47A. Par Y337A/F338A i HI-6 u *ex vivo* uvjetima testiran je uz deseterostruki, odnosno pedeseterostruki suvišak VX-a u odnosu na samu inačicu AChE. Potpuna razgradnja VX-a (vidljiva kao postizanje maksimalne aktivnosti kolinesteraza u uzorku nakon inhibicije) primjećuje se 15 do 20 min nakon dodatka 1 mmol dm⁻³ HI-6 u uzorak venske krvi obogaćene Y337A/F338A inačicom koja je inkubirana s 10 puta višom koncentracijom VX-a (**slika 4.14**). Maksimalni povrat aktivnosti kolinesteraza od 100 % postignut je i u pseudokatalitičkom sustavu inkubiranom s 50 puta višom koncentracijom VX-a, ali je vrijeme potrebno da se razgradi VX bilo 50-60 min (**slika 4.14B**). Također i niža koncentracija HI-6 u kombinaciji s Y337A/F338A uspješno je razgradila obje koncentracije VX-a. Jedino je u slučaju pedeseterostrukog suviška VX-a vidljiv zastoj povrata aktivnosti u trajanju od oko 40 min. U tom vremenu dolazi do ponavljanja ciklusa inhibicije Y337A/F338A inačice AChE VX-om i njene reaktivacije oksimom, a tek kada se koncentracija slobodnog VX-a približi koncentraciji enzima može uslijediti značajan povrat aktivnosti enzima i potpuna razgradnja VX-a. U skladu s tim, 20 min nakon početnog zastoja, odnosno otprilike nakon 60 min od dodatka oksima, postignut je maksimalni postotak reaktivacije od oko 80 %.

Obzirom da je *in vitro* pokusima pokazano kako je VX-om inhibirana Y337A inačica također uspješno reaktivirana pomoću HI-6 (**tablica 4.2**) i taj oksim-enzim par ispitana je u *ex vivo* uvjetima razgradnje VX-a. **Slika 4.15** prikazuje razgradnju VX-a potpomognutu parom HI-6 i Y337A. Primjećuje se učinkovita razgradnja niže koncentracije VX-a s višom koncentracijom HI-6 te povrat aktivnosti uzorka u potpunosti nakon 30 min. Pri inkubaciji uzorka venske krvi obogaćene Y337A inačicom s višom koncentracijom VX-a uočen je

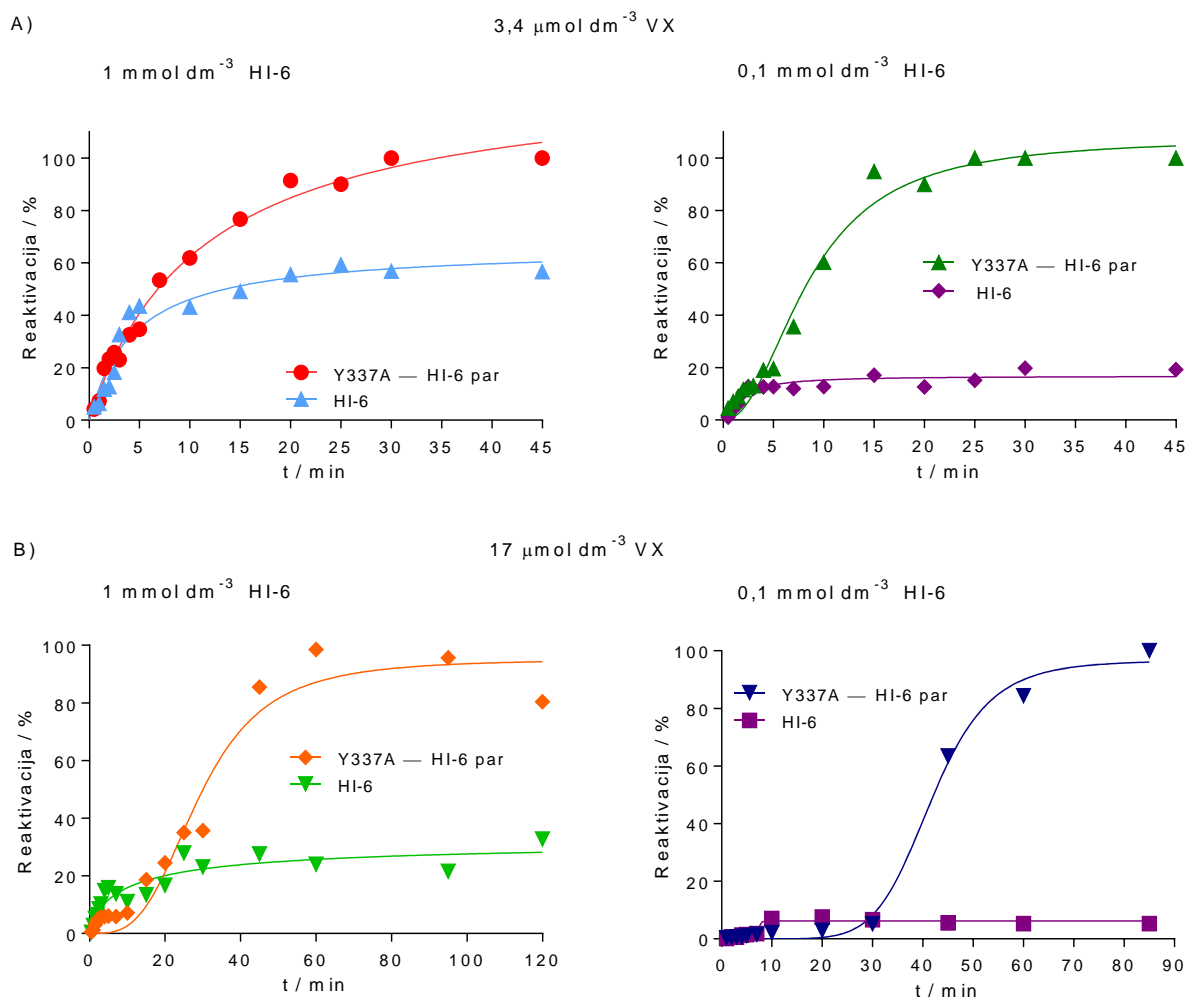
početni zastoj povrata aktivnosti, međutim nakon 60 do 80 min, ovisno o koncentraciji HI-6, reaktivirano je oko 90 % aktivnosti uzorka (**slika 4.15B**).



Slika 4.14. *Ex vivo* HI-6–Y337A/F338A potpomognuta razgradnja A) 5 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ i B) 25 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ VX-a (primjer jednog pokusa). Uzorak ljudske venske krvi obogaćen je 500 nmol dm^{-3} Y337A/F338A inačicom AChE u koji je nakon inkubacije s VX-om dodan HI-6 (1 ili 0,1 mmol dm^{-3}).

Učinkovitost HI-6 u reaktivaciji VX-om fosfonilirane AChE potvrđena je *in vitro* pokusima (**tablica 4.2**), što je u skladu i s ranijim istraživanjima.¹⁵¹⁻¹⁵⁵ Stoga se, budući da venska krv sadrži oko 80 % AChE, moglo pretpostaviti da će razgradnja VX-a biti moguća u venskoj krvi i bez dodatka inačica AChE. Učinak native AChE može se vidjeti na **slici 4.14A** i **slici 4.15A** u vidu povrata aktivnosti od oko 40 % za otprilike 20 min kada je uzorak venske krvi inkubiran s nižom koncentracijom VX-a i reaktiviran s 1 mmol dm^{-3} HI-6. Niži postotak reaktivacije postignut u *ex vivo* uvjetima od onog postignutog *in vitro* može se

objasniti time što VX fosfonilira i BChE (oko 20 % BChE u ljudskoj krvi) koja se ne reaktivira s HI-6. Naime, iz inicijalne pretrage poznato je da HI-6 nije učinkovit reaktivator VX-om inhibirane BChE (slika 4.5).

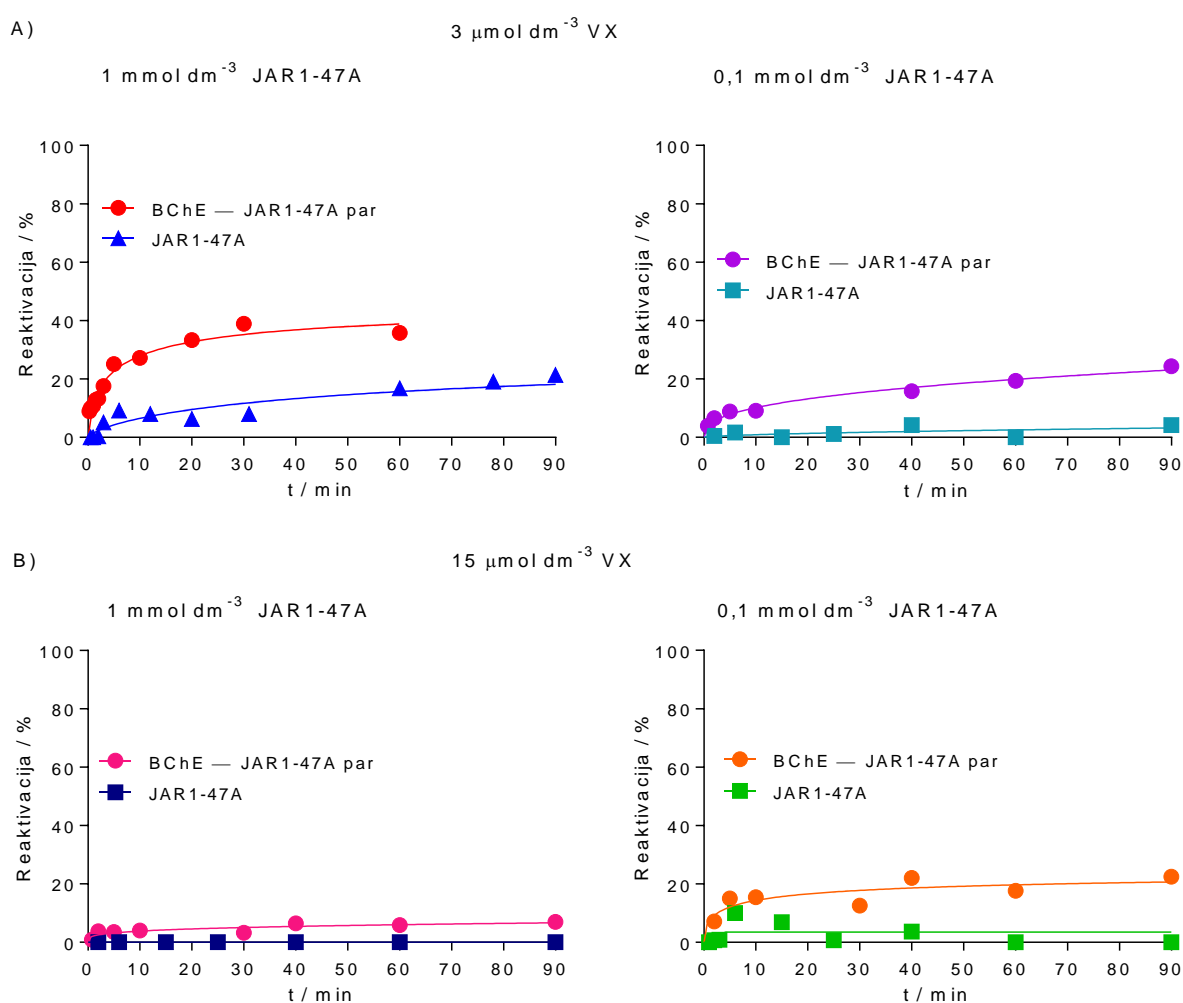


Slika 4.15. *Ex vivo* HI-6–Y337A potpomognuta razgradnja A) 3,4 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ i B) 17 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ VX-a (primjer jednog pokusa). Uzorak ljudske venske krvi obogaćen je 330 nmol dm^{-3} Y337A inačicom AChE u koji je nakon inkubacije s VX-om dodan HI-6 (1 ili 0,1 mmol dm^{-3}).

Konstanta brzine nukleofilnog uklanjanja vezanog VX-a, k_{+2} , određena u *in vitro* pokusima reaktivacije s HI-6 čak je 13 puta veća za inhibiranu Y337A/F338A inačicu AChE u odnosu na Y337A inačicu (tablica 4.2). Ta razlika se očituje i u *ex vivo* pokusima gdje je potrebno duže vrijeme za povrat aktivnosti venske krvi obogaćene Y337A inačicom AChE pri inkubaciji s višom koncentracijom VX i/ili s nižom koncentracijom HI-6 (slika 4.15) nego s

Y337A/F338A inačicom AChE (slika 4.14). Stoga je Y337A/F338A inačica AChE u kombinaciji s HI-6 bolji izbor za razgradnju VX-a.

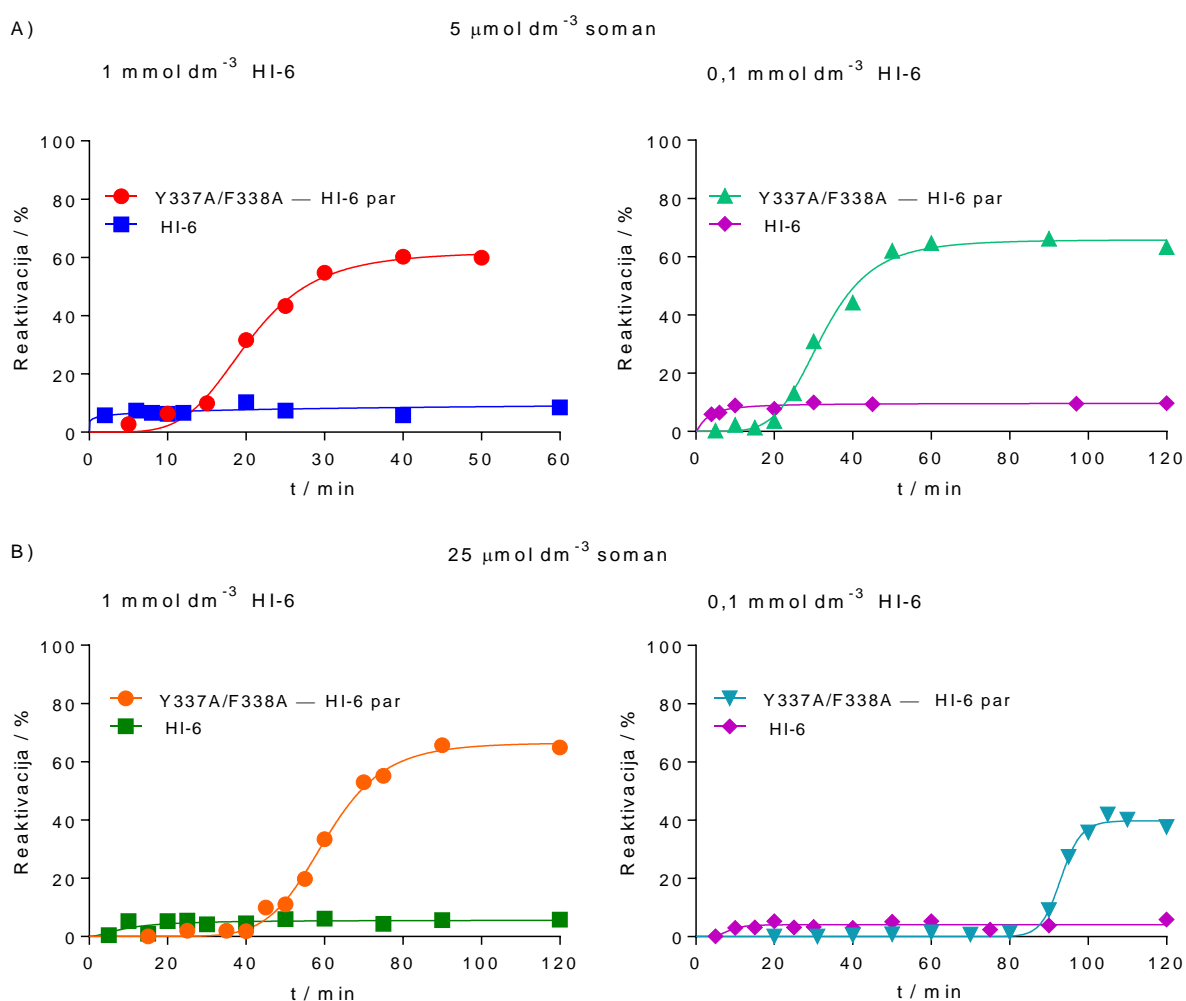
Na Slici 4.16 prikazana je *ex vivo* razgradnja VX-a pomoću BChE i njenog najučinkovitijeg reaktivatora JAR1-47A. Niski postotak reaktivacije BChE ovim oksimom (tablica 4.2) kao i neučinkovitost JAR1-47A u reaktivaciji AChE (vidljivo iz inicijalne pretrage, slika 4.5), umanjuje potencijal egzogene BChE da djeluje kao pseudokatalitičko čistilo u kombinaciji s oksimom JAR1-47A.



Slika 4.16. *Ex vivo* JAR1-47A–BChE potpomognuta razgradnja A) 3 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ i B) 15 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ VX-a (primjer jednog pokusa). Uzorak ljudske venske krvi obogaćen je 300 nmol dm^{-3} BChE u koji je nakon inkubacije s VX-om dodan JAR1-47A (1 ili 0,1 mmol dm^{-3}).

4.6.3. Soman

Razgradnja somana u *ex vivo* uvjetima praćena je uz dodatak Y337A/F338A inačice AChE usporenog starenja i njenog najučinkovitijeg reaktivatora kako bi se procjenila efikasnost ovog para kao pseudokatalitičkog čistila somana. Na **slici 4.17** prikazani su pokusi razgradnje somana u kojima je ljudska venska krv obogaćena Y337A/F338A inačicom AChE inkubirana s deseterostrukim, odnosno pedeseterostrukim suviškom somana nakon čega je dodan oksim HI-6.



Slika 4.17. *Ex vivo* HI-6–Y337A/F338A potpomognuta razgradnja A) 5 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ i B) 25 $\mu\text{mol dm}^{-3}$ somana (primjer jednog pokusa). Uzorak ljudske venske krvi obogaćen je 500 nmol dm^{-3} Y337A/F338A inačicom AChE u koji je nakon inkubacije sa somanom dodan HI-6 (1 ili 0,1 mmol dm^{-3}).

Nakon početne faze zastoja u povratu aktivnosti od 10 do 40 min, ovisno o koncentraciji somana i HI-6, reaktivacija doseže svoj maksimum od oko 60 % unutar 15 do 40 min. Ova faza zastoja nije bila očekivana s obzirom na vrijednosti k_r i k_i konstanti (**tablica 4.4 i 4.5**). Mogući razlog njene pojave je, osim starenja fosfonilirane inačice, prisustvo izomera somana ($P_{\pm}C_{\pm}$, tj. $P_{S/R}C_{S/R}$) koji pokazuju različitu kinetiku inhibicije i reaktivacije što rezultira razlikom u brzini njihovog uklanjanja iz smjese diastereomera racemičnog somana. Iz **slike 4.17** također se primjećuje da reaktivacija nativnih kolinesteraza s oksimom HI-6 nije zabilježena u uzorcima somanom inhibirane venske krvi. Razlog tome je brzo starenje somanom inhibiranih nativnih kolinesteraza. To znači da povrat aktivnosti u uzorcima inhibirane venske krvi obogaćene Y337A/F338A inačicom AChE potječe od reaktivacije aktivnosti inačice, a maksimalni postotak reaktivacije od oko 60 % u skladu je s *in vitro* rezultatima (**tablica 4.4**).

4.7. Smjernice za daljnja istraživanja pseudokatalitičkih čistila

Upotreba egzogenih enzima kao bioloških čistila predstavlja važan napredak u očuvanju aktivnosti sinaptičke AChE u slučaju izloženosti OP spojevima. Standardna terapija oksimom i atropinom nije dostatna, niti se može uvijek pravovremeno primjeniti, osobito u slučaju izloženosti somanu. Stoga razgradnja OP spojeva potpomognuta oksimom i enzimom ima značajan potencijal za primjenu u obliku profilakse i/ili kao terapija u slučaju trovanja OP spojevima. Razvojem takvih pseudokatalitičkih čistila učinio bi se značajan pomak u zaštiti poljoprivrednika, vojnika, medicinskog osoblja i radnika sličnih profesija za koje se može očekivati da budu izloženi OP spojevima.

Rezultati prikupljeni ovdje provedenim *in vitro* i *ex vivo* istraživanjem mogu se smatrati značajnim pomakom, odnosno doprinosom u pronalaženju uspješne terapije i dekontaminacije za tabun, soman i VX. Između testiranih novih i klasičnih reaktivatora inhibiranih kolinesteraza (BChE i Y337A te Y337A/F338A inačica AChE) izdvojeni su oksim-enzim parovi, tj. pseudokatalitička čistila koja su uspješno i u relativno kratkom roku razgradila ciljani živčani bojni otrov cikličkom inhibicijom enzima i njegovom reaktivacijom oksimom. Jedan od novih oksima, monopiridinijev oksim JAR288C, pokazao se učinkovitim reaktivatorom tabunom inhibirane Y337A inačice AChE i taj oksim-enzim par uspješno uklanja tabun u *ex vivo* uvjetima. Međutim, iako između novih oksima nisu pronađeni

učinkovitiji reaktivatori VX-om i somanom inhibiranih kolinesteraza od klasičnog bispiridinijevog oksima HI-6, njegovim kombiniranjem s Y337A/F338A inačicom AChE pokazan je izniman pseudokatalitički potencijal u *ex vivo* pokusima. Vrlo je važno naglasiti značajan pomak u istraživanju profilakse/terapije trovanja somanom. Naime, par sačinjen od oksima HI-6 i Y337A/F338A inačice AChE, za koju smo odredili da ima usporeno starenje, pokazao se učinkovitim u razgradnji somana.

Daljnji nastavak ovog istraživanja usmjerit će se na ispitivanje profilaktičkog djelovanja ovdje definiranih pseudokatalitičkih čistila u *in vivo* pokusima. U našem nedavnom istraživanju potvrdili smo da *in vivo* primjena Y337A/F338A i HI-6 u obliku predtretmana ili kao terapije nakon izloženosti miševa somanu značajno umanjuje simptome trovanja (tremor, grčevi i sl.) i produžuje preživljavanje u odnosu na netretirane miševe.¹⁶⁶ Nadalje, slično je primjećeno i u preliminarnim *in vivo* istraživanjima s JAR288C i Y337A parom na miševima izloženim tabunu. S druge strane, za oksim JAR288C se ispostavilo da je relativno toksičan spoj, za razliku od HI-6, što ograničava daljnje ispitivanje *in vivo* učinka JAR288C i Y337A para.

U svrhu poboljšanja djelovanja pseudokatalitičkog čistila trebalo bi razvijati niskotoksične oksime, ali i optimizirati oksim/enzim doze te omogućiti produljenje vremena cirkulacije enzima i oksima u krvotoku. Takve odlike oksim-enzim parova povećale bi učinkovitost profilaktika i mogućnost uklanjanja, odnosno razgradnje OP spoja prije nego se distribuira u organizmu. Na umu treba imati i postojanje izomera OP spojeva, osobito u slučaju somana gdje je brzina inhibicije, toksičnost, starenje i postotak reaktivacije različit s obzirom na izomer kojim je enzim inhibiran te bi se problemu reaktivacije takvih konjugata trebalo detaljnije posvetiti. Također, sinteza novih oksima s ciljem povećanja uspješnosti reaktivacije inhibiranih kolinesteraza te ispitivanje utjecaja različitih mutacija aktivnog mjesta AChE pa i BChE na brzinu inhibicije i reaktivacije od iznimne je važnosti za pronalaženje učinkovitih pseudokatalitičkih čistila za razgradnju OP spojeva.

Iako je od *in vitro* istraživanja do kliničke upotrebe dug put i nadasve problematičan zbog nemogućnosti provođenja kliničkih ispitivanja na ljudima te niza drugih pitanja etičke i financijske prirode, ovakva istraživanja su od velike važnosti zbog sve veće svakodnevne prijetnje koju predstavlja terorizam.

§ 5. *ZAKLJUČCI*

§ 5. ZAKLJUČCI

- Ispitivana je oksimom potpomognuta reaktivacija kolinesteraza (AChE, njenih inačica Y337A i Y337A/F338A te BChE) inhibiranih živčanim bojnim otrovima (tabunom, VX-om, somanom) uz 15 novih monopiridinijevih, imidazolijevih te piridinio-imidazolijevih JAR oksima i dva klasična piridinijeva oksima (HI-6 i 2-PAM). Najučinkovitiji reaktivatori su bili:
 - za tabunom inhibiranu Y337A inačicu AChE monopiridinijev oksim JAR288C;
 - za VX-om inhibirane AChE i njene obje inačice bispiridinijev oksim HI-6;
 - za somanom inhibiranu Y337A/F338A inačicu AChE HI-6.
- Iako nije pronađen oksim koji bi bio djelotvoran u reaktivaciji kolinesteraza fosfiliranih sa sva tri živčana bojna otrova, HI-6 se približio "univerzalnom reaktivatoru" kao najučinkovitiji za VX-om inhibirane AChE i njene inačice te za Y337A/F338A inačicu inhibiranu somanom.
- Dvostruka mutacija u mjestu vezanja kolina AChE kojom su aromatske aminokiseline (tirozin 337 i fenilalanin 338) zamijenjene alifatskim (alaninima) omogućila je optimiziranje reaktivacije, inhibicije i starenja:
 - ostvaren je veći broj povoljnih interakcija za pozicioniranje i orijentaciju HI-6 prema VX-om fosfoniliranom katalitičkom serinu što je dovelo do ubrzanja reaktivacije inačice za 5 puta u odnosu na divlji tip AChE,
 - olakšano je pozicioniranje tabuna u blizinu katalitičkog serina Y337A/F338A inačice što je pridonijelo deveterostrukom ubrzanju inhibicije tabunom,
 - usporeno je starenje konjugata Y337A/F338A i somana za 35 puta u odnosu na nativnu AChE (25°C, pH 7,4).
- Koncept pseudokatalitičkog čistila dokazan je u *ex vivo* uvjetima uz deseterostruki i/ili pedeseterostruki suvišak sva tri ispitivana živčana bojna otrova u odnosu na koncentraciju enzima. U kratkom vremenu, 15 do 30 min, vidljiva je razgradnja tabuna s Y337A inačicom AChE potpomognuta JAR288C oksimom te razgradnja VX-a i somana parom Y337A/F338A i HI-6.

- Nužni kriteriji za učinkovitu oksim-enzim potpomognutu razgradnju živčanih bojnih otrova su sljedeći:
- visok postotak reaktivacije aktivnosti inhibiranog enzima oksimom,
 - konstanta brzine reaktivacije, k_{+2} , veća od $0,2 \text{ min}^{-1}$,
 - konstanta disocijacije kompleksa fosfiliranog enzima i oksima, K_{OX} , oko $0,1 \text{ mmol dm}^{-3} \text{ te}$
 - konstanta brzine inhibicije OP spojem, k_i , bar reda veličine one za nativnu AChE.

**§ 6. *POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I
SIMBOLÂ***

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

| | |
|------------------|---|
| A | alanin |
| AChE | acetilkolinesteraza |
| AMPP | citosolna aminopeptidaza |
| ATCh | acetiltiokolin |
| BChE | butirilkolinesteraza |
| CaE1 | jetrena karboksilesteraza |
| ChE | kolinesteraze |
| D | asparaginska kiselina |
| DMSO | dimetil-sulfoksid |
| DTNB | 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina |
| E | glutaminska kiselina |
| F | fenilalanin |
| FDA | <i>Food and drug administration</i> , Američka agencija za hranu i lijekove |
| G | glicin |
| HDL | lipoprotein visoke gustoće |
| L | leucin |
| LD ₅₀ | doza OP spoja pri kojoj je 50 % pokusnih životinja uginulo |
| N | asparagin |
| OP spoj | organofosforni spoj |
| PON1 | paraoksonaza 1 |
| PRiMA | <i>proline rich membrane anchor</i> |
| PTE | fosfotriesteraze |
| SMP-30 | jetreni marker starenja |
| TCh | tiokolin |
| TNB ⁻ | anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline |
| V | valin |
| W | triptofan |
| Y | tirozin |

§ 7. *LITERATURNI IZVORI*

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. J. Bajgar, Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis and treatment. *Adv. Clin. Chem.* **38** (2004) 151–216.
2. A. Bosak, Organofosforni spojevi, klasifikacija i reakcije s enzimima. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **57** (2006) 445-457.
3. J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo californica: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* **253** (1991) 872-879.
4. P. Taylor, Z. Radić, The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **33** (1994) 281-320.
5. W. N. Aldridge, E. Reiner, Enzyme inhibitors as substrates: interaction of esterases with esters of organophosphorus and carbamatic acids, North-Holland, Amstrdam, 1972.
6. F. Hobbiger, Reactivation of phosphorylated acetylcholinesterase, u: G. B. Koelle (ur.), Cholinesterases and anticholinesterase agents, Springer-Verlag, Berlin, 1963, str. 921–988.
7. A. P. Gray, Design and structure-activity relationships of antidote to organophosphorus anticholinesterase agents. *Drug. Metab. Rev.* **15** (1984) 557–589.
8. D. E. Lorke, H. Kalasz, G. A. Petroianu, K. Tekes, Entry of oximes into the brain: a review. *Curr. Med. Chem.* **15** (2008) 743-753.
9. R. M. Dawson, Review of oximes available for the treatment of nerve agent poisoning. *J. Appl. Toxicol.* **14** (1994) 317-331.
10. M. Jokanović, Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides. *Toxicol. Lett.* **190** (2009) 107-115.
11. M. Eto, Organic and biological chemistry, u: G. Zweig (ur.), The Organophosphorus Pesticides, CRC Press Inc, Cleveland, 1976, str. 142.
12. A. P. L. De Jong, Z. G. Wolring, Stereospecific reactivation by some Hagedorn-oximes of acetylcholinesterases from various species including man, inhibited by soman. *Biochem. Pharmac.* **33** (1984) 1119-1125.
13. E. Reiner, Inhibition of acetylcholinesterase by 4,4'-bipyridine and its effect upon phosphorylation of the enzyme. *Croat. Chem. Acta* **59** (1986) 925-931.
14. Y. Aracava, R. F. E. Pereira, M. Akkerman, M. Adler, X. E. Albuquerque, Effectiveness of donepezil, rivastigmine, and (±) huprezine A in counteracting the acute toxicity of organophosphorus nerve agents: comparition with galantamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **331** (2009) 1014-1024.

15. M. P. H. Van Helden, A. J. M. Joosen, C. H. I. Philippens, Non-enzymatic pretreatment of nerve agent (soman) poisoning: a brief state-of-the art review. *Toxicol. Lett.* **206** (2011) 35-40.
16. S. Eckert, P. Eyer, H. Mückter, F. Worek, Kinetic analysis of the protection afforded by reversible inhibitors against irreversible inhibition of acetylcholinesterase by highly toxic organophosphorus compounds. *Biochem. Pharmacol.* **72** (2006) 334–357.
17. R. T. Delfino, T. S. Ribeiro, J. D. Figueroa-Villar, Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. *Braz. Chem. Soc.* **20** (2009) 407-428.
18. P. Masson, D. Rochu, Catalytic bioscavengers against toxic esters, an alternative approach for prophylaxis and treatments of poisonings. *Acta Naturae* **1** (2009) 68-79.
19. S. Darvesh, D. A. Hopkins, C. Geula, Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* **4** (2003) 131-138.
20. A. Chatonnet, O. Lockridge, Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* **260** (1989) 625-633.
21. D. E. Lenz, D. Yeung, J. R. Smith, R. E. Sweeney, L. A. Lumley, D. M. Cerasoli, Stoichiometric and catalytic scavengers as protection against nerve agent toxicity: a mini review. *Toxicology* **233** (2007) 31-39.
22. Y. J. Huang, Y. Huang, H. Baldassarre, B. Wang, A. Lazaris, M. Leduc, A. S. Bilodeau, A. Bellemare, M. Côté, P. Herskovits, M. Touati, C. Turcotte, L. Valeanu, N. Lemée, H. Wilgus, I. Bégin, B. Bhatia, K. Rao, N. Neveu, E. Brochu, J. Pierson, D. K. Hockley, D. M. Cerasoli, D. E. Lenz, C. N. Karatzas, S. Langermann, Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **104** (2007) 13603–13608.
23. B. C. Geyer, L. Kannan, P. E. Garnaoud, C. A. Broomfield, C. L. Cadieux, I. Cherni, S. M. Hodgins, S. A. Kasten, K. Kelley, J. Kilbourne, Z. P. Oliver, T. C. Otto, I. Puffenberger, T. E. Reeves, N. Robbins 2nd, R. R. Woods, H. Soreq, D. E. Lenz, D. M. Cerasoli, T. S. Mor, Plant-derived human butyrylcholinesterase, but not an organophosphorous-compound hydrolyzing variant thereof, protects rodents against nerve agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107** (2010) 20251–20256.
24. S. Li, D. T. Ip, H. Q. Lin, J. M. Liu, Y. G. Miao, L. J. Ke, D. C. Wan, High-level expression of functional recombinant human butyrylcholinesterase in silkworm larvae by Bac-to-Bac system. *Chem.-Biol. Interact.* **187** (2010) 101–105.
25. Y. Ashani, S. Pistinner, Estimation of the upper limit of human butyrylcholinesterase dose required for protection against organophosphates toxicity: a mathematically based toxicokinetic model. *Toxicol. Sci.* **77** (2004) 358–367.
26. F. Nachon, X. Brazzolotto, M. Trovaslet, P. Masson, Progress in the development of enzyme-based nerve agent bioscavengers. *Chem.-Biol. Interact.* **206** (2013) 536-544.
27. O. Mazor, O. Cohen, C. Kronman, L. Raveh, D. Stein, A. Ordentlich, A. Shafferman, Aging-resistant organophosphate bioscavenger based on polyethylene glycol-conjugated F338A human acetylcholinesterase. *Mol. Pharmacol.* **74** (2008) 755-763.

28. R. Cochran, J. Kalisiak, T. Kucukkilinc, Z. Radic, E. Garcia, L. Zhang, K. Y. Ho, G. Amitai, Z. Kovarik, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, P. Taylor, Oxime-assisted acetylcholinesterase catalytic scavengers of organophosphates that resist aging. *J. Biol. Chem.* **286** (2011) 29718–29724.
29. Z. Kovarik, Z. Radić, P. Taylor, Site-directed mutagenesis of acetylcholinesterase - a tool for studying structure/function relationship. *Period. Biol.* **106** (2004) 289-294.
30. Z. Kovarik, Z. Radic, H. A. Berman, P. Taylor. Mutation of acetylcholinesterase to enhance oxime-assisted catalytic turnover of methylphosphonates. *Toxicology* **233** (2007) 79–84.
31. Z. Kovarik, N. Maček, R. K. Sit, Z. Radić, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, P. Taylor, Centrally acting oximes in reactivation of tabun-phosphoramidated AChE. *Chem.-Biol. Interact.* **203** (2013) 77-80.
32. E. Stedman, E. Stedman, L. H. Easson, Choline-esterase. An enzyme present in the blood serum of the horse. *Biochem. J.* **26** (1932) 2056–2066.
33. V. P. Whittaker, How the cholinesterases got their modern names. *Chem.-Biol. Interact.* **187** (2010) 23–26.
34. G. A. Alles, R. C. Hawes, Cholinesterases in the blood of man. *J. Biol. Chem.* **133** (1940) 375–390.
35. D. H. Adams, V. P. Whittaker, The specificity of the human erythrocyte cholinesterase *Biochem. J.* **43** (1948) xiv–xv.
36. G. Kryger, M. Harel, K. Giles, L. Toker, B. Velan, A. Lazar, C. Kronman, D. Barak, N. Ariel, A. Shafferman, I. Silman, J. L. Sussman, Structures of recombinant native and E202Q mutant human acetylcholinesterase complexed with the snake-venom toxin fasciculin-II. *Acta Crystallogr.* **56** (2000) 1385-1394.
37. Y. Nicolet, O. Lockridge, P. Masson, J.C. Fontecellia-Camps, F. Nachon, Crystal structure of human butyrylcholinesterase and of its complexes with substrate and products. *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 41141-41147.
38. Enzyme Nomenclature (1992) Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Academic Press Inc., San Diego.
39. M. Dunitz, Cholinesterases and cholinesterase inhibitors, u: I. Silman, J. Sussman (ur.), Structural studies on acetylcholinesterase, The Livery House Ltd, London, 2000, str. 9-25.
40. O. Lockridge, C. F. Bartels, T. A. Vaughan, C. K. Wong, S. E. Norton, L. L. Johnson, Complete amino acid sequene of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* **262** (1987) 549-57.
41. T. L. Rosenberry, Catalysis by acetylcholinesterase: evidence that the rate-limitng step for acylation with certain substrates general acid-base catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72** (1975) 3833-3838.
42. P. Masson, F. Nachon, C. F. Bartels, M. T. Froment, F. Ribes, C. Matthews, O. Lockridge, High activity of human butyrylcholinesterase at low pH in the presence of excess butyrylthiocholine. *Eur. J. Biochem.* **270** (2003) 315-324.

43. M. Adler, M. G. Filbert, Role of butyrylcholinesterase in canine tracheal smooth muscle function. *FEBS Lett.* **267** (1990) 107-110.
44. A. Mikalsen, R. A. Andersen, J. Alexander, Use of ethopropazine and BW 284C51 as selective inhibitors for cholinesterases from various species. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **83** (1986) 447-449.
45. A. Saxena, A. M. G. Redman, X. Jiang, O. Lockridge, P. Doctor, Differences in active site gorge dimension of cholinesterases revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. *Biochemistry* **36** (1997) 14642-14651.
46. A. N. Çokuğras, Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turk. J. Biochem.* **28** (2003) 54-61.
47. Y. Bourne, P. Taylor, P. B. Bougis, P. Marchot, Crystal structure of mouse acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **274** (1999) 2963-2970.
48. N. H. Greig, T. Utsuki, Q.-S. Yu, X. Zhu, H. W. Holloway, T. A. Perry, B. Lee, D. K. Ingram, D. K. Lahiri, A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Curr. Med. Res. Opin.* **17** (2001) 159-165.
49. P. T. Francis, A. Nordberg, S. E. Arnold, A preclinical view of cholinesterase inhibitors in neuroprotection: do they provide more than symptomatic benefits in Alzheimer's disease? *Trends Pharmacol. Sci.* **26** (2005) 104-111.
50. C. Geula, M. M. Mesulam, Cholinesterases and pathology of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **9** (1995) 23-28.
51. R. Schliebs, T. Arendt, The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm.* **113** (2006) 1625-1644.
52. D. Grisaru, M. Sternfeld, A. Eldor, D. Glick, H. Soreq, Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur. J. Biochem.* **264** (1999) 672-686.
53. E. Meshorer, H. Soreq, Virtues and woes of AChE alternative splicing in stress-related neuropathologies. *Trends Neurosc.* **29** (2006) 216-224.
54. D. M. Quin, Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transitions states. *Chem. Rev.* **78** (1987) 955-979.
55. D. Kaplan, A. Ordentlich, D. Barak, N. Ariel, C. Kronman, B. Velan, A. Shafferman, Does "butyrylization" of acetylcholinesterase through substitution of the six divergent aromatic amino acids in the active centre gorge generate an enzyme mimic of butyrylcholinesterase? *Biochemistry* **40** (2001) 7433-7445.
56. L. Stryer, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 1991.
57. E. Meshorer, D. Toiber, D. Zurel, I. Sahly, A. Dori, E. Cagnano, L. Schreiber, D. Grisaru, F. Tronche, H. Soreq, Combinatorial complexity of 5' alternative acetylcholinesterase transcripts and protein products. *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 29740-29751.
58. L. M. Bronicki, B. J. Jasmin, Trans-acting factors governing acetylcholinesterase mRNA metabolism in neurons. *Front. Mol. Neurosci.* **5** (2012) 36.

59. J. Massoulié, S. Bon, The molecular form of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annu. Rev. Neurosci.* **5** (1982) 57-106.
60. B. S. Sailaja, D. Cohen-Carmon, G. Zimmerman, H. Soreq, E. Meshorer, Stress-induced epigenetic transcriptional memory of acetylcholinesterase by HDAC4. *PNAS* **109** (2012) 3687-3695.
61. J. Massoulié, Molecular forms and anchoring of acetylcholinesterase, u: E. Giacobini (ur.), Cholinesterase and cholinesterase inhibitors, Martin Dunitz Ltd, London, 2000, str. 81-101.
62. H. Soreq, S. Seidman, Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* **2** (2001) 294-302.
63. B. Velan, C. Kronman, A. Ordentlich, Y. Flashner, M. Leitner, S. Cohen, A. Shafferman, N-glycosylation of human acetylcholinesterase: effects on activity, stability and biosynthesis. *Biochem. J.* **296** (1993) 649-656.
64. A. Saxena, Y. Ashani, L. Raveh, D. Stevenson, T. Patel, B. P. Doctor, Role of oligosaccharides in the pharmacokinetics of tissue-derived and genetically engineered cholinesterases. *Mol. Pharmacol.* **53** (1998) 112–122.
65. I. Silman, J. L. Sussman, Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* **5** (2005) 293-302.
66. P. Masson, O. Lockridge, Butyrylcholinesterase for protection from organophosphorus poisons: catalytic complexities and hysteretic behavior. *Arch. Biochem. Biophys.* **494** (2010) 107-120.
67. W. Xie, J. A. Stribley, A. Chatonnet, P. J. Wilder, A. Rizzino, R. D. McComb, P. Taylor, S. H. Hinrichs, O. Lockridge, Postnatal developmental delay and supersensitivity to organophosphate in gene-targeted mice lacking acetylcholinesterase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **293** (2000) 896-902.
68. F. K. Soliday, Y. P. Conley, R. Henker, Pseudocholinesterase deficiency: a comprehensive review of genetic, acquired, and drug influences. *AANA J.* **78** (2010) 313-320.
69. B. N. La Du, C. F. Bartels, C. P. Nogueira, A. Hajra, H. Lightstone, A. Van der Spek, O. Lockridge, Phenotypic and molecular biological analysis of human butyrylcholinesterase variants. *Clin. Biochem.* **5** (1990) 423-431.
70. D. Glick, L. Ben-Moyal, H. Soreq, Genetic variation in butyrylcholinesterase and the physiological consequence for acetylcholinesterase function, u: E. Giacobini (ur), Butyrylcholinesterase: its function and inhibitors, Martin Dunitz Ltd, London, 2003, str. 55-67.
71. A. Silver, The biology of cholinesterases, Elsevier, Amsterdam, 1974.
72. M. M. Mesulam, A. Guillozet, P. Shaw, A. Levey, E. G. Duysen, O. Lockridge, Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience* **110** (2002) 627-639.
73. F. Nachon, Y. Nicolet, N. Viguiera, P. Masson, J. C. Fontecilla-Camps, O. Lockridge, Engineering of a monomeric and low-glycosylated form of human

- butyrylcholinesterase: expression, purification, characterization and crystallization. *Eur. J. Biochem.* **269** (2002) 630-637.
74. D. Kolarich, A. Weber, M. Pabst, J. Stadlmann, W. Teschner, H. Ehrlich, H.-P. Schwarz, F. Altmann, Glycoproteomic characterization of butyrylcholinesterase from human plasma. *Proteomics* **8** (2008) 254-263.
75. B. P. Doctor, Butyrylcholinesterase: its use in prophylaxis of organophosphate exposure, u: E. Giacobini (ur.), Butyrylcholinesterase: its function and inhibitors, Martin Dunitz Ltd, London, 2003, str. 163-177.
76. Z. Kovarik, M. Katalinić, G. Šinko, J. Binder, O. Holas, Y. S. Jung, L. Musilova, D. Jun, K. Kuča, Pseudo-catalytic scavenging: searching for a suitable reactivator of phosphorylated butyrylcholinesterase. *Chem.-Biol. Interact.* **187** (2010) 167-171.
77. L. Szinicz, History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology* **214** (2005) 167-181.
78. F. Worek, M. Koller, H. Thiermann, L. Szinicz, Diagnostic aspects of organophosphate poisoning. *Toxicology* **214** (2005) 182-189.
79. M. Jokanović, Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* **166** (2001) 139-160.
80. S. W. Wiener, R. S. Hoffman, Nerve agents: a comprehensive review. *J. Intensive Care Med.* **19** (2004) 22-37.
81. M. Jokanović, M. P. Stojiljković, Current understanding of the application of pyridinium oximes as cholinesterase reactivators in treatment of organophosphate poisoning. *Eur. J. Pharmacol.* **533** (2006) 10-17.
82. N. Munro, Toxicity of the organophosphate chemical warfare agents GA, GB, and VX: implications for public protection. *Environ Health Perspect.* **102** (1994) 18-38.
83. G. Bucht, G. Puu, Aging and reactivatability of plaice cholinesterase inhibited by soman and its stereoisomers. *Biochem. Pharmac.* **33** (1984) 3573-3577.
84. H. P. Benschop, L. P. A. De Jong, Nerve agent stereoisomers: analysis isolation and toxicology. *Acc. Chem. Res.* **21** (1988) 368-374.
85. E. Reiner, Z. Radić, Mechanism of action of cholinesterase inhibitor, u: E. Giacobini (ur.), Cholinesterases and cholinesterase inhibitors, Martin Dunitz Ltd, London, 2000, str. 103-119.
86. A. Bosak, M. Katalinić, Z. Kovarik, Cholinesterases: structure, role, and inhibition. *Arh Hig Rada Toksikol.* **62** (2011) 175-190.
87. H. P. Benschop, C. A. G. Konings, J. van Genderen, L. P. A. De Jong, Isolation, anticholinesterase properties, and acute toxicity in mice of four stereo-isomers of the nerve agent soman. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **72** (1984) 61-74.
88. B. Holmstedt, Cholinesterase inhibitors: an introduction, u: E. Giacobini (ur.), Cholinesterases and cholinesterase inhibitors, Martin Dunitz Ltd, London, 2000, str. 1-8.

89. M. Brufani, L. Filocamo, Rational design of cholinesterase inhibitors, u: E. Giacobini (ur.), Cholinesterases and cholinesterase inhibitors, Martin Dunitz Ltd, London, 2000, str. 27-46.
90. C. B. Millard, G. Koellner, A. Ordentlich, A. Shafferman, I. Silman, J. L. Sussman, Reaction products of acetylcholinesterase and VX reveal a mobile histidine in the catalytic triad. *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 9883-9884.
91. G. Mercey, T. Verdelet, J. Renou, M. Kliachyna, R. Baati, F. Nachon, L. Jean, P.-Y. Renard, Reactivators of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents. *Acc. Chem. Res.* **45** (2012) 756-766.
92. E. Carletti, H. Li, B. Li, F. Ekström, Y. Nicolet, M. Loiodice, E. Gillon, M. T. Froment, O. Lockridge, L. M. Schopfer, P. Masson, F. Nachon, Aging of cholinesterases phosphorylated by tabun proceeds through O-dealkylation. *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008) 16011-16020.
93. D. Barak, A. Ordentlich, D. Kaplan, R. Barak, D. Mizrahi, C. Kronman, Y. Segall, B. Velan, A. Shafferman, Evidence for P-N bond scission in phosphoroamidate nerve agent adducts of human acetylcholinesterase. *Biochemistry* **39** (2000) 1156-1161.
94. F. Ekström, C. Akfur, A. K. Tunemalm, S. Lundberg, Structural changes of phenylalanine 338 and histidine 447 revealed by the crystal structures of tabun-inhibited murine acetylcholinesterase. *Biochemistry* **45** (2006) 74-81.
95. P. Masson, F. Nachon, O. Lockridge, Structural approach to the aging of phosphorylated cholinesterases. *Chem.-Biol. Interact.* **187** (2010) 157-162.
96. N. B. Chandar, B. A. Ganguly, First principles investigation of aging processes in soman conjugated AChE. *Chem.-Biol. Interact.* **204** (2013) 185-190.
97. A. Shafferman, A. Ordentlich, D. Barak, D. Stein, N. Aiel, B. Velan, Aging of phosphorylated human acetylcholinesterase: catalytic processes mediated by aromatic and polar residues of the active centre. *Biochem. J.* **318** (1996) 833-840.
98. M. Nagao, T. Takatori, Y. Matsuda, M. Nakajima, H. Iwase, K. Iwadate, Definitive evidence for the acute sarin poisoning diagnosis in the tokyo subway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **144** (1997) 198-203.
99. A. F. Childs, D. R. Davies, A. L. Green, J. P. Rutland, The reactivation by oximes and hydroxamic acids of cholinesterase inhibited by organo-phosphorus compounds. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **10** (1955) 462-465.
100. G. E. Garcia, A. J. Campbell, J. Olson, D. Moorad-Doctor, V. I. Morthole, Novel oximes as blood-brain barrier penetrating cholinesterase reactivators. *Chem.-Biol. Interact.* **187** (2010) 199-206.
101. R. K. Sit, Z. Radić, V. Gerardi, L. Zhang, E. Garcia, M. Katalinić, G. Amitai, Z. Kovarik, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, P. Taylor, New structural scaffolds for centrally acting oxime reactivators of phosphorylated cholinesterases. *J. Biol. Chem.* **286** (2011) 19422-19430.
102. Z. Radić, R. K. Sit, Z. Kovarik, S. Berend, E. Garcia, L. Zhang, G. Amitai, C. Green, B. Radić, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, P. Taylor, Refinement of structural leads for centrally acting oxime reactivators of phosphorylated cholinesterases. *J. Biol. Chem.* **287** (2012) 11798-11809.

103. F. Worek, H. Thiermann, L. Szinicz, P. Eyer, Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem. Pharmacol.* **68** (2004) 2237-2248.
104. F. Ekström, Y. P. Pang, M. Boman, E. Artursson, C. Akfur, S. Börjegen, Crystal structures of acetylcholinesterase in complex with HI-6, *Ortho-7* and obidoxime: structural basis for differences in the ability to reactivate tabun conjugates. *Biochem. Pharmacol.* **72** (2006) 597-607.
105. B. Bošković, The treatment of soman poisoning and its perspectives. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1** (1981) 203-213.
106. J. Bajgar, Complex view on poisoning with nerve agents and organophosphates. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **48** (2005) 3-21.
107. J. R. Keeler, C. G. Hurst, M. A. Dunn, Pyridostigmine used as a nerve agent pretreatment under wartime conditions. *JAMA* **266** (1991) 693-695.
108. J. Kassa, Therapeutic and neuroprotective efficacy of pharmacological pretreatment and antidotal treatment of acute tabun or soman poisoning with the emphasis on pretreatment drug PANPAL. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **57** (2006) 427-233.
109. J. Bajgar, J. Fusek, J. Kassa, K. Kuca, D. Jun, Chemical aspects of pharmacological prophylaxis against nerve agent poisoning. *Curr. Med. Chem.* **16** (2009) 2977-2986.
110. P. Masson, Evolution of and perspectives on therapeutic approaches to nerve agent poisoning. *Toxicol. Lett.* **206** (2011) 5-13.
111. X. E. Albuquerque, R. F. E. Pereira, Y. Aracava, P. W. Fawcett, M. Oliveira, R. W. Randall, A. T. Hamilton, K. R. Kan, A. J. Romano, M. Adler, Effective countermeasure against poisoning by organophosphorus insecticides and nerve agents. *PNAS* **103** (2006) 13220-13225.
112. R. F. E. Pereira, Y. Aracava, Molecular and cellular actions of galantamine: clinical implications for treatment of organophosphorus poisoning. *J. Mol. Neurosci.* **40** (2010) 196-203.
113. E. A. Alexandrova, Y. Aracava, E. F. Pereira, E. X. Albuquerque, Pretreatment of Guinea pigs with galantamine prevents immediate and delayed effects of soman on inhibitory synaptic transmission in the hippocampus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **333** (2010) 1051-1058.
114. A. Lucić Vrdoljak, M. Čalić, B. Radić, S. Berend, D. Jun, K. Kuča, Z. Kovarik, Pretreatment with pyridinium oximes improves antidotal therapy against tabun poisoning. *Toxicology* **228** (2006) 41-50.
115. B. P. Doctor, A. Saxena, Bioscavengers for the protection of humans against organophosphate toxicity. *Chem.-Biol. Interact.* **157-158** (2005) 167-171
116. A. Saxena, W. Sun, J. M. Fedorko, I. Koplovitz, B. P. Doctor, Prophylaxis with human serum butyrylcholinesterase protects guinea pigs exposed to multiple lethal doses of soman or VX. *Biochem. Pharmacol.* **81** (2011) 164-169.
117. D. G. Ilyushin, O. M. Haertley, T. V. Bobik, O. G. Shamborant, E. A. Surina, V. D. Knorre, P. Masson, I. V. Smirnov, A. G. Gabibov, N. A. Ponomarenko,

- Recombinant human butyrylcholinesterase as a new-age bioscavenger drug: development of the expression system. *Acta Naturae* **5** (2013) 73-84.
118. X. Brazzolotto, M. Wandhammer, C. Ronco, M. Trovaslet, L. Jean, O. Lockridge, P. Y. Renard, F. Nachon, Human butyrylcholinesterase produced in insect cells: huPrine-based affinity purification and crystal structure. *FEBS J.* **279** (2012) 2905–2916.
119. S. B. Bird, A. Dawson, D. Ollis, Enzymes and bioscavengers for prophylaxis and treatment of organophosphate poisoning. *Front. Biosci.* **S2** (2010) 209-220.
120. O. Cohen, C. Kronman, L. Raveh, O. Mazor, A. Ordentlich, A. Shafferman, Comparison of polyethylene glycol-conjugated recombinant human acetylcholinesterase and serum human butyrylcholinesterase as bioscavengers of organophosphate compounds. *Mol. Pharmacol.* **70** (2006) 1121–1131.
121. P. Masson, F. Nachon, C. A. Broomfield, D. E. Lenz, L. Verdier, L. M. Schopfer, O. Lockridge, A collaborative endeavor to design cholinesterase-based catalytic scavengers against toxic organophosphorus esters. *Chem.-Biol. Interact.* **175** (2008) 273-80.
122. D. Rochu, E. Chabrière, P. Masson, Human paraoxonase: a promising approach for pre-treatment and therapy of organophosphorus poisoning. *Toxicology* **233** (2007) 47–59.
123. D. T. Yeung, J. R. Smith, R. E. Sweeney, D. E. Lenz, D. M. Cerasoli, A gas chromatographic–mass spectrometric approach to examining stereoselective interaction of human plasma proteins with soman. *J. Anal. Toxicol.* **32** (2008) 86–91.
124. M. Valiyaveetil, Y. Alamneh, L. Biggemann, I. Soojhawon, B. P. Doctor, M. P. Nambiar, Efficient hydrolysis of the chemical warfare nerve agent tabun by recombinant and purified human and rabbit serum paraoxonase 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **403** (2010) 97–102.
125. F. Renault, T. Carus, C. Barraud, M. Elias, E. Chabriere, P. Masson, D. Rochu, Integrative analytical approach by capillary electrophoresis under high pressure optimized for deciphering intrinsic and extrinsic cofactors that modulate activity and stability of paraoxonase. *J. Chromatogr. B.* **878** (2010) 1336–1355.
126. R. C. Stevens, S. M. Suzuki, T. B. Cole, S. S. Oark, R. J. Richter, C. E. Furlong, Engineered recombinant human paraoxonase 1 (rHuPON1) purified from *Escherichia coli* protects against organophosphate poisoning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105** (2008) 12780–12784.
127. R. C. diTargiani, L. Chandrasekaran, T. Belinskaya, A. Saxena, In search of a catalytic bioscavenger for the prophylaxis of nerve agent toxicity. *Chem.-Biol. Interact.* **187** (2010) 339-354.
128. E. Ghanem, F. M. Raushel, Detoxification of organophosphate nerve agents by bacterial phosphotriesterase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **207** (2005) 459–470.
129. J. Järv, Insight into the putative mechanism of esterase acting simultaneously on carboxyl and phosphoryl compounds, E. Reiner, W. N. Aldridge, F. C. G. Hoskin (ur.), Enzymes hydrolyzing organophosphorus compounds, Ellis Horwood Ltd Pub, Chichester, 1989, str. 221–225.

130. N. Aurbek, H. Thiermann, F. Eyer, P. Eyer, F. Worek, Suitability of human butyrylcholinesterase as therapeutic marker and pseudo catalytic scavenger in organophosphate poisoning: a kinetic analysis. *Toxicology* **259** (2009) 133–139.
131. Z. Radic, T. Dale, Z. Kovarik, S. Berend, E. Garcia, L. Zhang, G. Amitai, C. Green, B. Radic, B. M. Duggan, D. Ajami, J. Rebek, P. Taylor, Catalytic detoxification of nerve agent and pesticide organophosphates by butyrylcholinesterase assisted with non-pyridinium oximes. *Biochem. J.* **450** (2013) 231–242.
132. R. K. Sit, V. V. Fokin, G. Amitai, K. B. Sharpless, P. Taylor, Z. Radić, Imidazole aldoximes effective in assisting butyrylcholinesterase catalysis of organophosphate detoxification. *J. Med. Chem.* **57** (2014) 1378-1389.
133. Z. Kovarik, Amino acid residues conferring specificity of cholinesterases. *Period. Biol.* **101** (1999) 7-15.
134. G. Gibney, S. Camp, M. Dionne, K. MacPhee-Quigley, P. Taylor, Mutagenesis of essential functional residues in acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87** (1990) 7546-7550.
135. Z. Radić, G. Gibney, S. Kawamoto, K. MacPhee-Quigley, C. Bongiorno, P. Taylor, Expression of recombinant acetylcholinesterase in a baculovirus system: kinetic properties of glutamate 199 mutants. *Biochemistry* **31** (1992) 9760-9767.
136. A. Ordentlich, D. Barak, C. Kronman, N. Ariel, Y. Segall, B. Velan, A. Shafferman, The architecture of human acetylcholinesterase active center probed by interactions with selected organophosphate inhibitors. *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 11953-11962.
137. E. Artursson, C. Akfur, A. Hörnberg, F. Worek, F. Ekström, Reactivation of tabun-hAChE investigated by structurally analogous oximes and mutagenesis. *Toxicology* **265** (2009) 108-114.
138. Z. Kovarik, Z. Radić, H. A. Berman, V. Simeon-Rudolf, E. Reiner, P. Taylor, Acetylcholinesterase active centre and gorge conformations analysed by combinatorial mutations and enantiomeric phosphonates. *Biochem. J.* **373** (2003) 33-40.
139. C. Kronman, O. Cohen, O. Mazor, A. Ordentlich, L. Raveh, B. Velan, A. Shafferman, Next generation OP-bioscavengers: a circulatory long-lived 4-PEG hypolysine mutant of F338A-HuAChE with optimal pharmacokinetics and pseudo-catalytic characteristics. *Chem.-Biol. Interact.* **187** (2010) 253–258.
140. G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Jr. Andres, R. M. Featherstone, New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7** (1961) 88-95.
141. K. B. Sharpless, R. Manetsch, In situ click chemistry: a powerful means for lead discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **1** (2006) 525-538.
142. H. C. Kolb, K. B. Sharpless, The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discov. Today* **8** (2003) 1128-1137.
143. P. Sapkale, M. Sahu, M. Chaudhari, P. R. Patil, Trends of click synthesis: a review. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **6** (2014) 99-103.

144. F. Worek, R. Widmann, O. Knopff, L. Szinicz, Reactivating potency of obidoxime, pralidoxime, HI 6 and HLö 7 in human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by highly toxic organophosphorus compounds. *Arch. Toxicol.* **72** (1998) 237-243.
145. J. Cabal, K. Kuca, J. Kassa, Specification of the structure of oximes able to reactivate tabun-inhibited acetylcholinesterase. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **95** (2004) 81-86.
146. Čalić, A. Bosak, K. Kuča, Z. Kovarik, Interactions of butane, but-2-ene or xylene-like linked bispyridinium para-aldoximes with native and tabun-inhibited human cholinesterases. *Chem.-Biol. Interact.* **175** (2008) 305-308.
147. E. Carletti, N. Aurbek, E. Gillon, M. Loiodice, Y. Nicolet, J. C. Fontecilla-Camps, P. Masson, H. Thiermann, F. Nachon, F. Worek, Structure-activity analysis of aging and reactivation of human butyrylcholinesterase inhibited by analogues of tabun. *Biochem J.* **421** (2009) 97-106.
148. H. Leader, A. Vincze, B. Manisterski, N. Rothschild, C. Dosoretz, Y. Ashani, Characterization of O,O-diethylphosphoryl oximes as inhibitors of cholinesterases and substrates of phosphotriesterases. *Biochem. Pharmacol.* **58** (1999) 503-515.
149. Y. Ashani, A. K. Bhattacharjee, H. Leader, A. Saxena, B. P. Doctor, Inhibition of cholinesterases with cationic phosphonyl oximes highlights distinctive properties of the charged pyridine groups of quaternary oxime reactivators. *Biochem. Pharmacol.* **66** (2003) 191-202.
150. P. Taylor, Z. Radic, N. A. Hosea, S. Camp, P. Marchot, H. A. Berman, Structural bases for the specificity of cholinesterase catalysis and inhibition. *Toxicol. Lett.* **82-83** (1995) 453-458.
151. A. Saxena, A. M. G. Redman, X. Jiang, O. Lockridge, B. P. Doctor, Differences in active-site gorge dimensions of cholinesterase revealed by binding of inhibitors to human butyrylcholinesterase. *Chem.-Biol. Interact.* **119-120** (1999) 61-69.
152. F. Worek, N. Aurbek, T. Wille, P. Eyer, H. Thiermann, Kinetic prerequisites of oximes as effective reactivators of organophosphate-inhibited acetylcholinesterase: a theoretical approach. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **26** (2011) 303-308.
153. F. R. Sidell, W. A. Grof, The reactivability of cholinesterase inhibited by VX and sarin in man. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **27** (1974) 241-252.
154. G. Puu, E. Artursson, G. Bucht, Reactivation of nerve agent inhibited human acetylcholinesterases by HI-6 and obidoxime. *Biochem. Pharmacol.* **35** (1986) 1505-1510.
155. M. C. Sun, F. Z. Li, T. C. Chou, Reactivation of sarin- or soman phosphonylated human acetylcholinesterase by bis-pyridinium mono-oximes. *Biochem. Pharmacol.* **35** (1986) 337-339.
156. J. Kassa, Review of oximes in the antidotal treatment of poisoning by organophosphorus nerve agents. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **40** (2002) 803-816.
157. K. Kuca, D. Jun, J. Cabal, M. Hrabínova, L. Bartosova, V. Opletalova, Russian VX: inhibition and reactivation of acetylcholinesterase compared with VX agent. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **98** (2006) 389-394.

158. P. Wins, I. B. Wilson, The inhibition of acetylcholinesterase by organophosphorus compounds containing a P-Cl bond. *BBA – Enzymology* **333** (1974) 137-145.
159. A. Saxena, B. P. Doctor, D. M. Maxwell, D. E. Lenz, Z. Radic, P. Taylor, The role of glutamate-199 in the aging of cholinesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197** (1993) 333-339.
160. I. M. Kovach, Stereochemistry and secondary reactions in the irreversible inhibition of serine hydrolases by organophosphorus compounds. *J. Phys. Org. Chem.* **17** (2004) 602–614.
161. P. Masson, P. L. Fortier, C. Albaret, M. T. Froment, C. F. Bartels, O. Lockridge, Aging of di-isopropyl-phosphorylated human butyrylcholinesterase. *Biochem. J.* **327** (1997) 601-607.
162. F. Nachon, O. A. Asojo, G. E. Borgstahl, P. Masson, O. Lockridge, Role of water in aging of human butyrylcholinesterase inhibited by echothiophate: the crystal structure suggests two alternative mechanisms of aging. *Biochemistry* **44** (2005) 1154-1162.
163. B. Sanson, F. Nachon, J. P. Colletier, M. T. Froment, L. Toker, H. M. Greenblatt, J. L. Sussman, Y. Ashani, P. Masson, I. Silman, M. Weik, Crystallographic snapshots of nonaged and aged conjugates of soman with acetylcholinesterase, and of a ternary complex of the aged conjugate with pralidoxime. *J. Med. Chem.* **52** (2009) 7593-7603.
164. Z. Kovarik, Z. Radić, H. A. Berman, V. Simeon-Rudolf, E. Reiner, P. Taylor, Mutant cholinesterases possessing enhanced capacity for reactivation of their phosphonylated conjugates. *Biochemistry* **43** (2004) 3222–3229.
165. A. Ordentlich, D. Barak, C. Kronman, H. P. Benschop, L. P. De Jong, N. Ariel, R. Barak, Y. Segall, B. Velan, A. Shafferman, Exploring the active center of human acetylcholinesterase with stereomers of an organophosphorus inhibitor with two chiral centers. *Biochemistry* **38** (1999) 3055-3066.
166. Z. Kovarik, N. Maček Hrvat, M. Katalinić, R. K. Sit, A. Paradise, S. Žunec, K. Musilek, V. V. Fokin, P. Taylor, Z. Radić, Catalytic soman scavenging by Y337A/F338A acetylcholinesterase mutant assisted with novel site-directed aldoximes. Prihvaćeno za objavljivanje u *Chem. Res. Toxicol.*

§ 8. ŽIVOTOPIS

§ 8. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

| | |
|------------------------|---|
| Prezime / ime | Maček Hrvat / Nikolina |
| Adresa | Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada Ksaverska cesta 2, p.p. 291, HR-10001 Zagreb, Hrvatska |
| Telefon | +385 1 4682 562 |
| Fax | +385 1 4673 303 |
| E-mail | nmacek@imi.hr |
| Državljanstvo | Hrvatsko |
| Datum / mjesto rođenja | 5. 5. 1983., Zagreb, Hrvatska |

RADNO ISKUSTVO

| | |
|-----------------------|--|
| Datum (od - do) | 1. 12. 2010. → |
| Ustanova zaposlenja | Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada |
| Odjel | Jedinica za biokemiju i organsku analitičku kemiju |
| Radno mjesto | Znanstveni novak, asistent |
| Područje istraživanja | Istraživanje interakcija kolinesteraza s antidotima i inhibitorima; reaktivacija kolinestaraza inhibiranih organofosforim spojevima pomoću strukturno različitih oksima. |

| | |
|---------------------|---|
| Datum (od - do) | 1. 9. 2009. → 21. 11. 2010. |
| Ustanova zaposlenja | Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada |
| Odjel | Jedinica za biokemiju i organsku analitičku kemiju |
| Radno mjesto | Tehnička suradnica |

| | |
|---------------------|--|
| Datum (od - do) | 1. 6. 2009. → 1. 9. 2009. |
| Ustanova zaposlenja | Institut Ruđer Bošković |
| Odjel | Laboratorij za celularnu biokemiju; Zavod za organsku kemiju i biokemiju |
| Radno mjesto | Volonter |

ŠKOLOVANJE

| | |
|----------|---|
| Datum | 2010. → |
| Ustanova | Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska |
| Studij | Poslijediplomski doktorski studij kemije, smjer biokemija |

| | |
|------------------------|---|
| Datum | 2001. – 2008. |
| Ustanova | Prehrambeno biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska |
| Studij | Biotehnologije, smjer biokemijsko inženjerstvo |
| Naslov diplomskog rada | "Aktivnost kolinesteraza u plazmi tabunom otrovanog štakora nakon terapije oksimom" |

Zvanje dipl. ing. biotehnologije (magistra inženjerka bioprocenog inženjerstva)

USAVRŠAVANJE

Datum / mjesto 7. 4. – 9. 4. 2014., Zagreb, Hrvatska
 Naziv škole “*InnoMol Proteomic Workshop*”
 Organizator Institut Ruđer Bošković i InnoMol

Datum / mjesto 30. 9. – 9. 10. 2012., Primošten, Hrvatska
 Naziv škole “*Eleventh International School on Biophysics Biomolecular complexes and assemblies*”
 Organizator Hrvatsko društvo za biofiziku i Institut Ruđer Bošković

Datum / mjesto 27. 6 – 1. 7. 2011., Beograd, Srbija
 Naziv škole “*EUROTOX Basic Toxicology Course*”
 Organizator Srbsko toksikološko društvo i Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, pod pokroviteljstvom *EUROTOXA*

OSOBNJE VJEŠTINE

Materinji jezik Hrvatski

Drugi jezici Engleski (aktivno)

TEHNIČKE VJEŠTINE I KOMPETICIJE Korištenje *MS Office*, *GraphPad Prism Software* i *Chembiodraw Software* paketa

OSTALE VJEŠTINE I KOMPETICIJEStipendije:

- *FEBS Society Fellowship* za sudjelovanje na *FEBS Congress “Mechanisms in Biology”*, St. Petersburg, Rusija, 6. 7. – 11. 7. 2013.
- Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju, za sudjelovanje na *FEBS3+ Meeting “From Molecules to Life and Back”*, Opatija, Hrvatska, 13. 6. – 16. 6. 2012.

Članstvo:

- Hrvatsko društvo za biokemiju i molekularnu biologiju
- Hrvatsko toksikološko društvo
- Hrvatsko kemijsko društvo

Nagrada:

- Hrvatskog društva za medicinsku i biološku tehniku za posebno istaknuti diplomski rad u interdisciplinarnom području biomedicinskog inženjerstva u akademskoj godini 2007./2008.

PUBLIKACIJE

- Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima (2)
- Kongresna priopćenja (sažeci) u CC časopisu (5)
- Kongresna priopćenja (sažeci) u ostalim časopisima (1)
- Sažeci u zbornicima skupova (14)

POPIS PUBLIKACIJAIzvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima

1. Kovarik, Zrinka; **Maček, Nikolina**; Sit, Rakesh K.; Radić, Zoran; Fokin, Valery V.; Sharpless, K. Barry; Taylor, Palmer (2013) Centrally acting oximes in reactivation of tabun-phosphoramidated AChE. *Chemico-biological interactions* 203 (1), 77-80.
2. Kovarik, Zrinka; **Maček Hrvat, Nikolina**; Katalinić, Maja; Sit, Rakesh K.; Paradise, Alexander; Žunec, Suzana; Musilek, Kamil; Fokin, Valery V. Taylor, Palmer, Radić, Zoran (2015) Catalytic soman scavenging by Y337A/F338A acetylcholinesterase mutant assisted with novel site-directed aldoximes. Prihvaćeno za objavljivanje u *Chem. Res. Toxicol.*

Kongresna priopćenja (sažeci) u CC časopisu

1. Katalinić, Maja; **Maček Hrvat, Nikolina**; Miličević, Ante; Jelić, Dubravko; Primožič, Ines; Tomić, Srđanka; Kovarik, Zrinka. Profiling imidazolium and benzimidazolium oximes as antidotes in organophosphorus compound poisoning. *The FEBS Journal* 281 (2014) 280-281.
2. Kovarik, Zrinka; Katalinić, Maja; **Maček, Nikolina**; Radić, Zoran; Taylor, Palmer. Efficient oxime reactivation of cholinesterases enables the catalytic turnover of organophosphorus compounds. *The FEBS Journal* 280;1 (2013) 166.
3. **Maček, Nikolina**; Radić, Zoran; Taylor, Palmer; Kovarik, Zrinka. *Ex vivo* experiments support Y337A/F338A human AChE as a potential pseudo-catalytic bioscavenger in the event of soman poisoning. Abstracts of the 38th FEBS Congress: "Mechanisms in Biology". *The FEBS Journal* 280;1 (2013) 168.
4. Kovarik, Zrinka; Katalinić, Maja; **Maček, Nikolina**; Radić, Zoran; Fokin, Valery V.; Taylor, Palmer; Sharpless, Barry K. Probing reactivation of tabun phosphorylated cholinesterases by mutagenesis and new oximes. Abstracts of the 47th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX). *Toxicology Letters* 205S (2011) S115.
5. Kovarik, Zrinka; Čalić, Maja; **Maček, Nikolina**; Berend, Suzana; Bosak, Anita; Lucić Vrdoljak, Ana; Radić, Božica. Cholinesterases activity and oxidative stress in rats upon tabun poisoning and oxime therapy. Abstracts XIII International Symposium on Cholinergic Mechanisms. *Journal of Molecular Neuroscience* 40 (2010) 245-246.

Kongresna priopćenja (sažeci) u ostalim časopisima

1. Kovarik, Zrinka; Kalisiak, Jaroslaw; **Maček, Nikolina**; Katalinić, Maja; Berend, Suzana; Radić, Zoran; Fokin, Valery V.; Sharpless, Barry K.; Taylor, Palmer. New scaffolds of oxime-assisted acetylcholinesterase reactivators for treatment in tabun exposure. 4th Croatian Congress of Toxicology (CROTOX 2012), Primošten, Hrvatska, 2012. Abstracts, Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 63; S2, p. 26.

Sažeci u zbornicima skupova

1. **Maček Hrvat, Nikolina**; Radić, Zoran; Taylor, Palmer; Kovarik, Zrinka. Choline binding site mutations improve HI-6 assisted reactivation of the VX-acetylcholinesterase conjugate. Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology "The Interplay of Biomolecules", HDBMB₂₀₁₄, Zadar, Hrvatska, 2014. Book of Abstracts, p.109.
2. Radić, Zoran; Sit, Rakesh K.; Žunec, Suzana; **Maček Hrvat, Nikolina**; Kovarik, Zrinka; Fokin, Valery V.; Taylor, Palmer. Novel (bio)molecules for new organophosphate intoxication treatments. Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology "The Interplay of Biomolecules", HDBMB 2014, Zadar, Hrvatska, 2014. Book of Abstracts, p. 46.
3. Kovarik, Zrinka; **Maček, Nikolina**; Katalinić, Maja; Radić, Zoran; Taylor, Palmer. Catalytic hydrolysis of tabun and soman utilizing cholinesterases and oximes. Abstracts of International Conference Biocatalysis-2013: Fundamentals & Applications, Moskva, Rusija, 2013. p. 40.
4. **Maček, Nikolina**; Radić, Zoran; Taylor, Palmer; Kuča, Kamil; Kovarik, Zrinka. Structural analogs of the HI-6 oxime are the most potent reactivators of the soman-inhibited AChE mutant that resists ageing. 14th Medical Chemical Defence Conference 2013: Translation of experimental research for improved treatment of chemical warfare agent poisoning, Munchen, Njemačka, 2013. Abstracts, p. 60.
5. **Maček, Nikolina**; Kovarik, Zrinka; Sit, Rakesh K.; Radić, Zoran; Fokin, Valery V.; Sharpless, K. Barry; Taylor, Palmer. Centrally acting oximes in reactivation of tabun-phosphoramidated human acetylcholinesterase. The 11th Greta Pifat Mrzljak International School of Biophysics. Biomolecular complexes and assemblies, Primošten, Hrvatska, 2012. Book of Abstracts, p. 92.
6. Kovarik, Zrinka; Kalisiak, Jarosław; **Maček, Nikolina**; Katalinić, Maja; Berend, Suzana; Radić, Zoran; Fokin, Valery V.; Sharpless, Barry K.; Taylor, Palmer. Mutagenesis and new oximes enable reactivation of tabun-inhibited acetylcholinesterases. FEBS3+ Meeting "From molecules to life and back", Opatija, Hrvatska, 2012. Book of Abstracts, p. 57.
7. Katalinić, Maja; **Maček, Nikolina**; Šinko, Goran; Kovarik, Zrinka. Efficiency of oximes in reactivation of phosphorylated AChE is limited by their interactions with the AChE peripheral allosteric site. FEBS3+ Meeting "From molecules to life and back", Opatija, Hrvatska, 2012. Book of Abstracts, p. 245.
8. **Maček, Nikolina**; Radić, Zoran; Taylor, Palmer; Kuča, Kamil; Kovarik, Zrinka. Mutagenesis of acetylcholinesterase enables oxime- assisted reactivation of soman-enzyme conjugate that resist aging. of the FEBS3+ Meeting "From molecules to life and back", Opatija, Hrvatska 2012. Book of Abstracts, p. 250.
9. Kovarik, Zrinka; Kalisiak, Jarosław; **Maček, Nikolina**; Katalinić, Maja; Berend, Suzana; Radić, Zoran; Fokin, Valery V.; Sharpless, Barry K.; Taylor, Palmer. Reactivation of tabun-phosphylated cholinesterases probed by mutagenesis and new oximes. 11th International Meeting on Cholinesterases, Kazan, Rusija, 2012. Book of Abstracts, p. 53.

10. Katalinić, Maja; **Maček, Nikolina**; Šinko, Goran; Kovarik, Zrinka. Interactions of pyridinium oximes with the peripheral allosteric site limit their efficiency in reactivation of phosphorylated AChE. 11th International Meeting on Cholinesterases, Kazan, Rusija, 2012. Book of Abstracts, p.154.
11. Katalinić, Maja; **Maček, Nikolina**; Šinko, Goran; Kovarik, Zrinka. Enhancement in oxime-assisted reactivation of tabun-inhibited AChE achieved by a mutation of the peripheral site. 13th Medical Chemical Defence Conference 2011: Current status of therapeutic approaches to nerve agent poisoning, Munchen, Njemačka, 2011. Programm, p. 41.
12. Kovarik, Zrinka; Katalinić, Maja; **Maček, Nikolina**; Sit, Rakesh; Cochran, Rory; Radić, Zoran; Fokin, Valery; Sharpless, K. Barry; Taylor, Palmer. New centrally acting oxime reactivators of cholinesterases phosphorylated by tabun. 13th Medical Chemical Defence Conference 2011: Current status of therapeutic approaches to nerve agent poisoning, Munchen, Njemačka, 2011. Programm, p. 42.
13. **Maček, Nikolina**; Katalinić, Maja; Kovarik, Zrinka. Restoring cholinesterase activity by K048 oxime therapy in tabun poisoned rats. 10th Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology with international participation "The secret life of biomolecules", HDBMB₂₀₁₀, Opatija, Hrvatska, 2010. Book of Abstracts, p. 124.
14. **Maček, Nikolina**; Čalić, Maja; Berend, Suzana; Lucić Vrdoljak, Ana; Radić, Božica; Kovarik, Zrinka. Effect of oxime K048 on AChE and BChE activity upon tabun poisoning in rats. 10th International Meeting on Cholinesterases, Šibenik, Hrvatska, 2009. Programme and Abstracts, p. 115.

