

---

PREUČEVANJE ENCIMA  
BUTIRILHOLINESTERAZE V VZORCU  
ČLOVEŠKEGA SERUMA

---



Avtorici:  
Zala Božanić  
Jana Ušen  
I. gimnazija v Celju  
Kajuhova 2, Celje

Mentorica: mag. Mojca Alif

I. gimnazija v Celju

Somentor: prof. dr. Jure Stojan

Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani

Zala Božanić in Jana Ušen, avtorici raziskovalne naloge z naslovom *PREUČEVANJE ENCIMA BUTIRILHOLINESTERAZE V VZORCU ČLOVEŠKEGA SERUMA*, izjavljava, da sva nalogo izdelali samostojno.

Celje, 2020

---

ZAHVALA.....	4
POVZETEK .....	5
ABSTRACT .....	6
1 UVOD .....	7
1.1 NAMEN DELA, CILJI .....	7
1.2 HIPOTEZE .....	7
2 TEORETIČNI DEL.....	8
2.1 DELOVANJE ENCIMOV .....	8
2.1.1 Delovanje katalizatorjev .....	8
2.1.2 Poimenovanje encimov .....	9
2.1.3 Encimska kinetika .....	10
2.1.4 Vezava substrata in delovanje encimov .....	13
2.1.5 Inhibicija .....	14
2.2 BUTIRILHOLINESTERAZA .....	15
2.2.1 Zgradba in delovanje.....	15
2.2.2 Fiziološka funkcija butirilholinesteraze .....	17
2.2.3 Preverjanje delovanja butirilholinesteraze .....	18
2.3 SUKINILDIHOLIN .....	19
2.4 KRVNI SERUM .....	20
3 METODOLOGIJA .....	21
3.1 METODA DOLOČANJA ENCIMSKE AKTIVNOSTI .....	21
3.1.1 Ellmanova reakcija .....	21
3.2 SPEKTROFOTOMETRIJA .....	23
3.3 OBDELAVA PODATKOV .....	25
4 EKSPERIMENTALNI DEL .....	27
Uporabljene kemikalije .....	27
Instrumenti .....	27
4.1 ODVZEM KRVI IN PRIPRAVA VZORCA .....	28
4.2 EKSPERIMENTALNO DELO .....	29
4.2.1 Priprava kemikalij .....	29
4.2.2 Preverjanje encimske aktivnosti butirilholinesteraze in inhibicijskih lastnosti butiriltioholina .....	30
4.2.3 Preverjanje inhibicije hidrolize butiriltioholina s sukcinildiholinom .....	32

4.2.4 Preverjanje encimove katalitične sposobnosti za razgradnjo sukcinildiholina .....	33
5 REZULTATI.....	34
.....	34
6 DISKUSIJA.....	44
8 VIRI IN LITERATURA .....	46

## **Kazalo tabel**

<i>Tabela 1: Kinetični parametri butirilholinesteraze v serumih dijakov .....</i>	<i>42</i>
---	-----------

## **Kazalo slik**

Slika 1: Shema katalizirane reakcije med substratom in encimom, za katero velja Michaelis-Mentenova enačba.....	10
Slika 2: Graf reakcije, za katero velja Michaelis-Mentenova kinetika (2) .....	11
Slika 3: Primeri konstant različnih encimov. Med njimi je tudi acetilholinesteraza. (2).....	12
Slika 4: Aktivni mesti človeške acetil- (A) in butirilholinesteraze (B) .....	16
Slika 5: Zgradba sukcinildiholina (7) .....	19
Slika 6: Ellmanova reakcija .....	21
Slika 7: Reakcija hidrolize acetiltioholina z AchE.....	22
Slika 8: UV/VIS-spektrofotometer Lambda 45 (Vir: osebni arhiv) .....	24
Slika 9: UV/VIS-spektrofotometer Lambda 365 (Vir: osebni arhiv) .....	24
Slika 10: Program UV Express (Vir: osebni arhiv) .....	25
Slika 11: Program UV WinLab (Vir: osebni arhiv) .....	26
Slika 12: Analitska tehtnica METTLER (Vir: osebni arhiv).....	28
Slika 13: Priprava raztopin za delo (Vir: osebni arhiv).....	30
Slika 14: Shema razgradnje butiriltioholina, ki jo katalizira butirilholinesteraza s predpostavko produktne inhibicije .....	31
Slika 15: Shema reakcije hidrolize butiriltioholina s človeškim serumom, inhibirane s sukcinildiholinom in produkti.....	32
Slika 16: Shema reakcije hidrolize sukcinildiholina s človeškim serumom .....	33
Slika 17: Delovanje butirilholinesteraze .....	34
Slika 18: Vpliv sukcinildiholina na razgradnjo substrata .....	36
Slika 19: Reaktivacija encimske aktivnosti .....	38
Slika 20: Časovni potek hidrolize 0,1 mM koncentracije sukcinildiholina s 60-krat redčenim človeškim serumom .....	39

## ZAHVALA

Zahvaljujema se najini mentorici mag. Mojci Alif za strokovno vodstvo in podporo ter zunanjemu mentorju dr. Juretu Stojanu z Inštituta za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani za posredovano znanje in izkušnje. Raziskovalna naloga tudi ne bi bila možna brez pomoči laboratorija Zdravstvenega doma v Celju, ki je omogočil odvzem krvi in pripravo serumov za nadaljnje raziskave. Zahvaljujema se prijaznim prostovoljcem, ki so se strinjali, da jim odvzamemo nekaj malega življenjske tekočine.

Za lektoriranje naloge se zahvaljujema profesorici Juani Robida.

Seveda pa se zahvaljujema tudi vsem družinskim članom in prijateljem, da so nama med izdelavo naloge stali ob strani.

## POVZETEK

V naši raziskavi smo testirali 19 vzorcev krvnega seruma dijakov naše šole. Cilj naloge je bil izmeriti aktivnost teh serumov za razgradnjo sukcinildiholina, ki povzroča kratkotrajno paralizo in se uporablja v urgentni kirurški praksi. Načrtovali smo test, ki bo direktno pokazal sposobnost butirilholinesteraze iz redčenega seruma za hidrolizo sukcinildiholina. Zato smo izvedli tri vrste kinetičnih poskusov:

1. merjenje hidrolize butiriltioholina z različnimi količinami človeškega seruma skupaj s produktno inhibicijo,
2. merjenje inhibicije butirilholinesteraze iz človeškega seruma s sukcinildiholinom,
3. merjenje hidrolize butiriltioholina po različnih časih inkubacije seruma s sukcinildiholinom.

Vse eksperimentalne podatke smo analizirali s programom ENZO, spletno aplikacijo za hitro analizo reakcijskih mehanizmov in izračunom kinetičnih parametrov iz krivulj časovnega poteka izginevanja/nastajanja reaktantov/produktov. Statistična analiza izračunanih kinetičnih parametrov je s precejšnjo verjetnostjo pokazala prisotnost dveh skupin vzorcev med 19 preiskovanimi serumi, ki pa niso pokazali bistvene razlike za hidrolizo sukcinildiholina. V praksi to pomeni, da 60-krat redčen serum popolnoma razgradi 0,1 mM sukcinildiholin v štirih do petih urah in takrat kaže aktivnost neinhibiranega seruma.

Tako smo z našo metodo uspešno preverili aktivnost encima butirilholinesteraze direktno iz vzorca človeškega seruma in ne iz izoliranega encima, kot je bilo treba doslej.

Predlagali smo tudi uporabno vrednost naše metode v klinični praksi, kjer bi lahko preverjali delovanje encima butirilholinesteraze pred administracijo mišičnega relaksanta sukcinildiholina. Ta lahko namreč pri posameznikih z nedelujočim encimom povzroči podaljšano paralizo mišic.

## ABSTRACT

In our study, we tested 19 samples of blood serum of classmates in our school. Our aim was to measure the activity of these sera towards succinylcholine, a short-term paralysis agent during urgent surgery. We designed a test to show directly the hydrolytic capability of butyrylcholinesterase from diluted serum. To achieve this, we performed three types of kinetic experiments:

1. Measurement of the hydrolysis of butyrylthiocholine by different concentrations of serum along with the product inhibition,
2. Testing of the inhibition by succinylcholine of butyrylcholinesterase in human serum and,
3. From the measurements of butyrylthiocholine hydrolysis after different incubation times of serum with succinylcholine we obtained the time course of succinylcholine hydrolysis.

All experimental data was analysed by 'ENZO', a web application for rapid evaluation of reaction mechanisms and parameter estimation from progress curves. A statistical analysis of the determined kinetic parameters showed that the most of 19 tested sera can probably be divided into two groups, which both do not differentiate significantly in terms of succinylcholine hydrolysis. In practice, 60 times diluted serum completely converts 0.1 mM succinylcholine within four to five hours, thus restoring its activity to the level of uninhibited serum.

Using this method, we successfully tested the enzyme activity of butyrylthiocholinesterase directly from a sample of human serum, and not from a purified enzyme, which is traditionally necessary.

We also proposed an application of our method in clinical praxis. With its implementation, the activity of butyrylcholinesterase could be checked before the administration of the muscle relaxant succinylcholine. This medication can cause prolonged paralysis in patients with butyrylcholinesterase deficiency.

# 1 UVOD

## 1.1 NAMEN DELA, CILJI

Preučevanje encimske aktivnosti butirilholinesteraze je doslej v klinični praksi potekalo z uporabo izoliranega encima. Postopek izolacije encimov je precej zapleten in dolgotrajen, od nas zahteva zelo dobro poznavanje encimovih lastnosti. Zato je bil cilj naše naloge preučiti metodo, s katero bi lahko encimsko aktivnost preverjali neposredno iz človeškega seruma. To občutno skrajša in olajša postopek preverjanja encimske aktivnosti.

V ta namen smo preučevali aktivnost butirilholinesteraze za hidrolizo butiriltioholina v vzorcih krvnega seruma in eksperimentalno določili optimalne koncentracije seruma za nadaljnje poskuse. Nato smo ovrednotili produktno inhibicijo serumske butirilholinesteraze med meritvami hidrolize butiriltioholina. V nadaljevanju smo določali vpliv inhibitorja sukcinildiholina na delovanje encima, na koncu pa še hitrost hidrolize sukcinildiholina z redčenim človeškim serumom.

Vedoč, da se mišični relaksant sukcinildiholin uporablja v klinični praksi, smo želeli tudi ugotoviti, ali bi bilo smiselno praktično implementiranje naše metode. Pri uporabi sukcinildiholina pri urgentni intubaciji lahko pride do podaljšane paralize, če encim ne deluje pravilno. Za rizično skupino smo določili zlasti porodnice z nujnim carskim rezom, pri katerih uporabijo sukcinildiholin in pri katerih sta podaljšana paraliza ter umetno ventiliranje še zlasti nezaželeno.

## 1.2 HIPOTEZE

Z direktnimi meritvami časovnega poteka nižanja koncentracije mišičnega relaksanta sukcinildiholina zaradi hidrolize, katalizirane z encimom butirilholinesteraza, po različnih časih inkubacije obeh – relaksanta in encima – **lahko določimo aktivnost encima direktno iz človeškega seruma.**



## 2 TEORETIČNI DEL

### 2.1 DELOVANJE ENCIMOV

Encimi so katalizatorji biokemijskih reakcij v živih organizmih. Nekateri za pravilno delovanje poleg proteinskega dela potrebujejo še drugo komponento, ki jo imenujemo kofaktor. Kofaktor je lahko majhna organska molekula ali kovinski ion. Celoten aktivni encim (kofaktor in proteinski del) imenujemo holoencim, le proteinski del pa je apoencim.

#### 2.1.1 Delovanje katalizatorjev

Da se molekule reaktantov pretvorijo v molekule produktov, morajo doseči določeno energijsko raven, ki ustreza aktivacijski energiji.

Če želimo hitrost reakcije povečati, lahko povečamo povprečno energijo molekul reaktantov s segrevanjem. Ker pa povišanje temperature v živih sistemih ni mogoče, se hitrost njihovih reakcij poveča zaradi prisotnosti biokatalizatorjev, encimov. Ti namreč speljejo reakcijo po drugi poti z nižjo energijsko bariero. Za katalizator velja:

1. Poveča hitrost reakcije tako, da zniža energijsko bariero.
2. Med reakcijo se ne porabi in iz nje izstopi nespremenjen.
3. Ne vpliva na ravnotežje reakcije, ampak le na hitrost, s katero se ravnotežje doseže.
4. Običajno tvori z reaktanti začasni kompleks in tako stabilizira prehodno stanje. (1)

## 2.1.2 Poimenovanje encimov

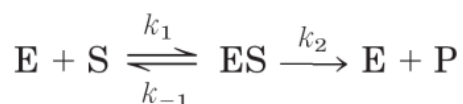
Encime lahko poimenujemo na tri različne načine:

1. stara imena, kot so katalaza, pepsin ipd., ki ne povedo ničesar o substratu ali o funkciji encima;
2. trivialna imena, ki definirajo substrat (reaktantu reakcije, ki jo encim katalizira, dodamo pripono -aza), ki ga encim katalizira;
3. sistematična imena, ki se nanašajo na reakcije, ki jih encimi katalizirajo. Poznamo 6 razredov encimov glede na reakcije, ki jih katalizirajo:
  - oksidoreduktaza,
  - transferaza,
  - **hidrolaza**,
  - liaza,
  - izomeraza,
  - ligaza.

Encim butirilholinesteraza, ki ga preučujemo, katalizira reakcijo hidrolize sukcinildiholina, zato spada v skupino hidrolaz. Sistematično ime encima je tako EC 3.1.1.8. (1)

### 2.1.3 Encimska kinetika

Encimska kinetika se ukvarja s preučevanjem hitrosti spreminjanja substratov (S) v produkt (P). Hitrost je podana s spremembo koncentracije substrata v časovni enoti. Ta podatek nam pove, kakšna je aktivnost encima. Med pomembnejšimi enačbami encimske kinetike je zagotovo Michaelis-Mentenova enačba. Imenuje se po Leonoru Michaelisu in Maud Menten, ki sta jo izpeljala leta 1912 (2), iz spodnje sheme:



Slika 1: Shema katalizirane reakcije med substratom in encimom, za katero velja Michaelis-Mentenova enačba

$$V_0 = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

Enačba 1: Michaelis-Mentenova enačba

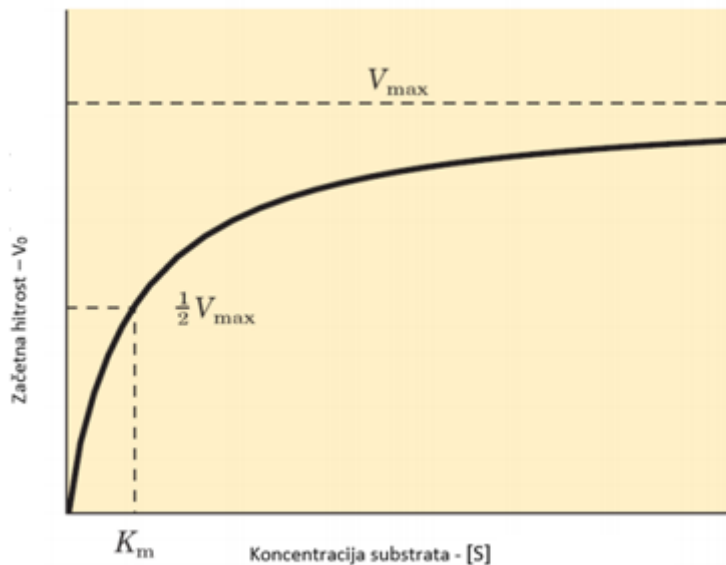
V tej enačbi je  $V_0$  začetna hitrost, to je hitrost v času  $t_0$ , karakteristična za reakcijo, ko je koncentracija substrata še tista dodana in mnogo večja od koncentracije encima. Takrat je tudi koncentracija nastajajočega produkta še zanemarljivo majhna.  $V_{max}$  je največja možna začetna hitrost reakcije pri dani koncentraciji encima, ki je tudi z nadaljnjim povečevanjem koncentracije substrata ne moremo več preseči. Maksimalna hitrost je običajna karakteristika večine encimov in jo pripišemo nasičenju s substratom.  $K_m$  je Michaelisova konstanta, ki nam pove koncentracijo substrata, pri kateri je hitrost reakcije enaka polovici maksimalne.

$$K_m = k_{-1} + k_2 / k_1$$

Enačba 2: Izračun  $K_m$

Pri nekaterih encimih nam lahko  $K_m$  izraža tudi afiniteto encima do substrata; večja kot je konstanta, slabša je afiniteta do substrata. Vendar to velja samo za reakcije, za katere velja, da je  $k_2 \ll k_{-1}$ .

Graf hiperbolične funkcije iz Enačbe 1 je prikazan na Sliki 2.



Slika 2: Graf reakcije, za katero velja Michaelis-Mentenova kinetika (2)

Pri opredeljevanju encimov je treba določiti pretvorbno število (*turnover number*) oziroma  $k_{\text{cat}}$  – katalitska konstanta. V najpreprostejši encimski reakciji, ki jo ponazarja Slika 1, je katalitska konstanta kar  $k_2$ . To je maksimalno število molekul substrata, ki se lahko na enem aktivnem mestu pretvorijo v produkt v določeni časovni enoti. Določimo ga z merjenjem maksimalne hitrosti, toda le, če poznamo koncentracijo aktivnih centrov.

$$k_{\text{cat}} = V_{\text{max}} / E_{\text{tot}}$$

Enačba 3: Izračun  $k_{\text{cat}}$

Pri čemer je  $E_{\text{tot}}$  koncentracija encimovih aktivnih mest v vzorcu.

Ker sta pri istem encimu  $K_m$  in  $k_{\text{cat}}$  substratno specifični, lahko z izračunom njunega kvocienta dobimo informacijo o encimski specifičnosti do testiranega substrata.

$$k_{\text{spec}} = k_{\text{cat}} / K_m$$

Enačba 4: Konstanta specifičnosti

Substrat z najvišjo vrednostjo je substrat, ki ga encim najučinkoviteje pretvarja. Vrednost  $k_{\text{spec}}$  doseže v vodnih medijih maksimalno vrednost med  $10^8$  in  $10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Pri človeški serumski butirilholinesterazi je ta vrednost  $1,1 \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  in zanjo pravimo, da je omejena le s hitrostjo difuzije butiriltioholina do aktivnega mesta.

**TABLE 6-8** Enzymes for Which  $k_{\text{cat}}/K_m$  Is Close to the Diffusion-Controlled Limit ( $10^8$  to  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )

Enzyme	Substrate	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_m$ (M)	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )
Acetylcholinesterase	Acetylcholine	$1.4 \times 10^4$	$9 \times 10^{-5}$	$1.6 \times 10^8$
Carbonic anhydrase	$\text{CO}_2$	$1.1 \times 10^6$	$1.2 \times 10^{-2}$	$8.3 \times 10^7$
	$\text{HCO}_3^-$	$1.4 \times 10^5$	$2.6 \times 10^{-2}$	$1.5 \times 10^7$
Catalase	$\text{H}_2\text{O}_2$	$1.4 \times 10^7$	$1.1 \times 10^0$	$4 \times 10^7$
Crotonase	Crotonyl-CoA	$5.7 \times 10^3$	$2 \times 10^{-5}$	$2.8 \times 10^8$
Fumarase	Fumarate	$1.8 \times 10^2$	$5 \times 10^{-6}$	$1.6 \times 10^8$
	Malate	$1.9 \times 10^2$	$2.5 \times 10^{-5}$	$3.6 \times 10^7$
$\beta$ -Lactamase	Benzylpenicillin	$2.0 \times 10^3$	$2 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^8$

Slika 3: Primeri konstant različnih encimov. Med njimi je tudi acetilholinesteraza. (2)

Na hitrost reakcije vplivajo:

1. **Količina substrata** sledi Michaelis-Mentenove enačbi, ki je matematično enačba hiperbole, preslikane po simetrali lihih kvadrantov (glej Sliko 2).
2. **Koncentracija encima** je več velikostnih razredov nižja od koncentracije substrata, zato vsakršno povečanje količine encima v teh razmerah linearno poveča začetno hitrost pretvorbe substrata.
3. **pH-vrednost**, tj. koncentracija protonov v reakcijski zmesi, vpliva na protonacijsko stanje disociabilnih aminokislinskih ostankov v encimu ali substratu, ki se jima pri spremembi pH spremeni ionizacija.
4. **Temperaturni interval**. Pri razmeroma nizkih temperaturah narašča začetna hitrost encimsko kataliziranih reakcij sorazmerno s temperaturo. Vendar pa se proteinska zgradba encimov tudi temperaturno denaturira. Zaradi velikega koeficienta nastopi razpletanje v zelo ozkem temperaturnem intervalu, kjer hitrost encimske reakcije hitro pade. (1)

## 2.1.4 Vezava substrata in delovanje encimov

Molekula substrata, ki je običajno manjša od molekule encima, se veže na posebno področje na encimski molekuli, ki se imenuje aktivno mesto. Gre za žep v tridimenzionalni strukturi encima, kjer poteka kataliza. Aktivno mesto ima naslednje značilnosti:

1. Je relativno majhno tridimenzionalno področje v strukturi encima. Encim ima omejeno število aktivnih mest.
2. Je specifično, kar pomeni, da izmed množice možnih substratov prepozna le nekatere. Specifičnost je lahko absolutna ali skupinska.

Proces katalize pri encimih običajno poteka takole:

1. Substrat s svojo vezavo inducira minimalne konformacijske spremembe v proteinski zgradbi encima.
2. Ko je substrat pravilno vezan, encim nanj deluje tako, da v vezeh, ki se bodo zaradi njegovega delovanja razcepile, ustvari napetost. Vez se destabilizira in substrat vstopi v prehodno stanje. V tej točki, ki se imenuje tudi aktivacijski kompleks, je največ proste energije in cepljenje starih ter nastajanje novih vezi sta v ravnovesju. Ko reakcija poteče, substrat, spremenjen v produkt, zapusti aktivno mesto.

Mehanizmi katalitičnega delovanja encimov:

- a) **Kislinsko-bazična kataliza.** V aktivnem mestu encima so bazične in kislinske funkcionalne skupine, ki pomagajo pri prenosu protonov in s tem olajšajo razcep vezi v substratu. Substrat je tako ob donorjih in akceptorjih protonov.
- b) **Kovalentna kataliza.** Nukleofilna funkcionalna skupina na encimu se kovalentno poveže s substratom. Pri tem nastane reaktiven intermediat, ki hitro razpade. Tovrstna kataliza poteka v dveh stopnjah – nastanek in razpad intermediata. To je značilen mehanizem serinskih hidrolaz, med katere spada tudi butirilholinesteraza.
- c) **Kataliza s pomočjo kovinskega iona.** Ta lahko poteka na več načinov:
  - s koordinacijskimi vezmi držijo substrat pravilno usmerjen, da se lahko zelo natančno veže na aktivno mesto;
  - reakcijo pospešijo s polarizacijo vezi, ki se bo razcepila, ali pa s stabilizacijo negativno nabitega intermediata;
  - sodelujejo pri bioloških oksidoredukcijskih reakcijah z reverzibilnim prenosom elektronov med kovinskimi ioni in substratom. Običajno potrebujejo encimi točno določene ione za pravilno delovanje. (1)

### 2.1.5 Inhibicija

Po načinu delovanja inhibitorje ločimo na ireverzibilne in reverzibilne.

- a) **Ireverzibilni inhibitor** permanentno deaktivira encim, saj se s kovalentnimi ali zelo močnimi medmolekulskimi vezmi veže na funkcionalno skupino ključne katalitične aminokislina. Na tak način delujejo živčni bojni strupi na holinesteraze.
- b) **Reverzibilni inhibitorji** delujejo na encim samo v času, ko so v mediju v zadostnih koncentracijah, saj naj se vežejo s šibkimi medmolekulskimi vezmi. Obstajajo tri vrste takih inhibitorjev: kompetitivni, nekompetitivni in akompetitivni.
- c) **Zelo slabi substrati** se z encimom povežejo s šibkimi interakcijami, a z razmeroma dobro afiniteto (nizka  $K_m$ ). Po drugi strani pa je pretvorbena število zelo slabo ( $k_{cat} \ll 1$ ). Sukcinnildiholin je zelo dober primer takega »kvazi« substrata serumske butirilholinesteraze.

## 2.2 BUTIRILHOLINESTERAZA

### 2.2.1 Zgradba in delovanje

Butirilholinesteraza (EC 3.1.1.8), skrajšano BTChE, je poleg eritrocitne acetilholinesteraze (AChE, EC 3.1.1.7) ena od dveh plazemskih holinesteraz, ki sta v telesu odgovorni za hidrolizo holinskih estrov. Po stari nomenklaturi se je za butirilholinesterazo uporabljal kar izraz holinesteraza ali psevdoholinesteraza (»lažna«), AChE pa so rekli »prava« holinesteraza. Vendar je novejšo poimenovanje veliko bolj nedvoumno.

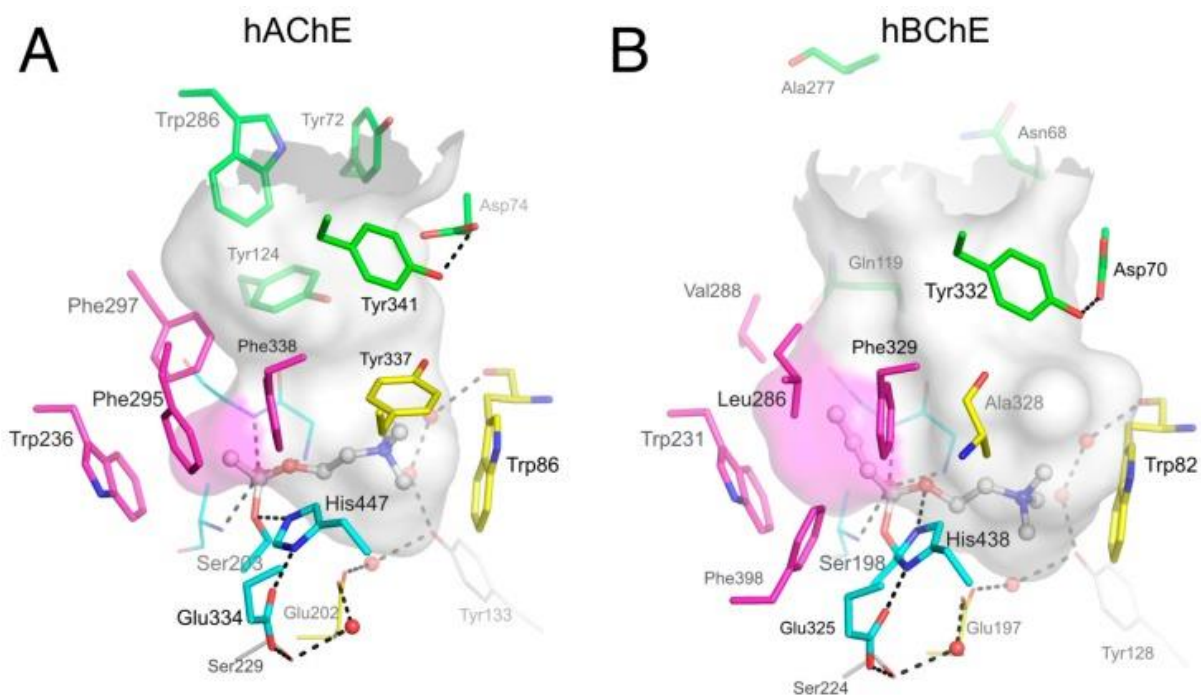
Holinesteraze so del naddružine alfa-beta hidrolaz. Zanje je značilna katalitična triada aminokislin, Ser-His-Glu, ki se je evolucijsko razvila do zelo učinkovitega katalitičnega delovanja.

Funkcija holinesteraz je hidrolitični razcep nevrottransmitterja acetilholina (ACh) na holin in očetno kislino. Ta reakcija je nujna za prekinitve živčnega impulza. Sproščanje acetilholina v sinapsi povzroči njegovo vezavo na motorično ploščico mišične celice in s tem njeno kontrakcijo. Ko ga AChE razgradi, kontrakcija popusti. Če bi ACh ostal na receptorjih, bi mišica ostala v zakrčenem stanju, kar se zgodi pri zastrupitvi z živčnimi strupi.

AChE je v sinapsah in na membranah rdečih krvničk. Pojavlja se v različnih molekulskih strukturah; v možganih sesalcev je najpogosteje v tetramerični obliki, majhen delež pa so monomeri.

Butirilholinesterazo izdelujejo jetrne celice sesalcev in jo nato izločijo v kri. Njena fiziološka funkcija še ni jasna. Zdi se, da organizem ščiti pred inhibitorji acetilholinesteraze. Številne raziskave skušajo ugotoviti, ali bi jo lahko uporabljali kot antidot za živčne strupe. Mnogi menijo, da butirilholinesteraza ščiti AChE pred toksini, ki se tudi naravno pojavljajo v telesu. V človeškem telesu je približno desetkrat več butirilholinesteraze kot acetilholinesteraze. (3) (4)





Slika 4: Aktivni mesti človeške acetil- (A) in butirilholinesteraze (B)

Katalitična triada je prikazana z modro, acil-vezavni žep z vijolično, holin-vezavni žep. Z rumeno so prikazani aromatični ostanki t. i. periferne strani pri vrhu aktivnega mesta. (4)

Strukturno se humana AChE in butirilholinesteraza ujemata v 65 % zaporedja aminokislin. Na vходу v aktivno mesto je t. i. periferno anionsko mesto, brez katerega se afiniteta do substrata močno poslabša. Na dnu približno 2 nm globokega lijaka je katalitsko mesto, ki je iz dveh delov: anionskega mesta, kamor se veže pozitivno nabita holinska glava substrata, in esterazno mesto, kjer poteka kovalentna kataliza. Zaradi različnih aminokislinskih ostankov v steni aktivnih centrov je njegov volumen skoraj dvakrat večji pri butirilholinesterazi kot pri AChE. Zato lahko butirilholinesteraza sprejme večje substrate in inhibitorje, kot je na primer sukcinildiholin. (4)

## 2.2.2 Fiziološka funkcija butirilholinesteraze

Butirilholinesteraza je udeležena pri metabolizmu le nekaterih klinično pomembnih snovi, kot so sukcinilholin, mivakurij, prokain, heroin in kokain. Zato je to »tiho« klinično stanje, ki se zazna samo ob izpostavljanju tem substancam.

Najpomembnejša od teh snovi je sukcinildiholin, mišični relaksant, ki se uporablja pri urgentnih kirurških posegih.

Butirilholinesteraza v krvni plazmi hidrolizira leptosukcine (oziroma suksametonij, sukcinildiholin) na sukcinilmonoholin in holin, zelo malo in počasi pa na še eno molekulo holina in sukcinilno kislino. Pri pacientih z normalno vrednostjo normalnega (divjega tipa) encima se približno 90 % sukcinildiholina že hidrolizira in deaktivira, preden pride do motorične ploščice. Preostalih 10 % sukcinilholina deluje kot agonist na receptorjih v živčno mišičnem stiku, kar povzroči podaljšano depolarizacijo. Membranski potencial na miocitah se ne spreminja in mišice so paralizirane. Pri normalnih posameznikih skeletne mišice začnejo znova funkcionirati približno pet minut potem, ko se pacientu injicira sukcinildiholin. Pri pomanjkanju butirilholinesteraze oziroma pri nepravilno delujočem encimu pa lahko paralitični učinek traja tudi do 8 ur. To se pri pacientu opazi, ko zaradi paralize respiratornih mišic po končanem posegu ne more samostojno zadihati, potrebna je mehanska ventilacija, kar imenujemo sukcinilholinska apneja.

Krvna plazma povprečnega odraslega posameznika vsebuje  $3,3 \times 10^{-6}$  gramov butirilholinesteraze na mililiter. Možni vzroki za nepravilno delovanje ali pomanjkanje tega encima so številni: podhranjenost, bolezen jeter, rak v metastazah, hude infekcije, obsevalna terapija, nekatera zdravila in pesticidi, pozna nosečnost ... Raziskave sukcinildiholina in njegovega podaljšanega delovanja pa so pripeljale do odkritja, da se holinesteraze pojavljajo v mnogo genskih variantah. Torej je razlog za nezadostno delovanje teh encimov lahko tudi mutirani gen. (3)

Zapis za plazemsko butirilholinesterazo določata dva lokusa  $E_1$  in  $E_2$  na kromosomu 3 v regiji 3q21–25. Najbolj preučevani aleli za lokus  $E_1$  so  $E_1^u$ ,  $E_1^a$ ,  $E_1^f$  in  $E_1^s$ . Ob prisotnosti gena  $E_1^u$  (*usual* ali *wild type*) nastane najpogostejša oblika butirilholinesteraze, »običajni« encim.  $E_1^a$  (atypical) producira atipičen encim, encim  $E_1^f$ , odporen na inhibicijo s fluoridom, pri katerem je prišlo do zamenjave negativno nabite asparaginske kisline z nevtralinim glicinom na perifernem anionskem mestu, ki zdaj to ni več (D70G). Pri  $E_1^s$  (*silent*) pa nastane »tihi« encim, kar večina literature opredeli kot pravzaprav popolno pomanjkanje encima ali pa majhen delež normalno delujočega encima. (4)

### 2.2.3 Preverjanje delovanja butirilholinesteraze

Delovanje lahko preverjamo z različnimi testi, med katerimi bi bilo smiselno izpostaviti:

#### 1. TEST Z DIBUKAINOM

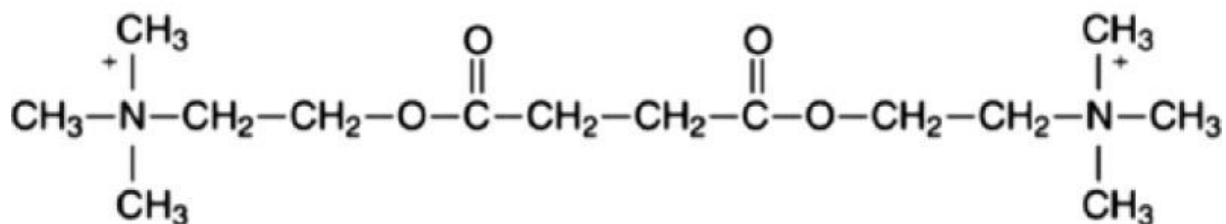
Dibukain je amidni lokalni anestetik, hkrati pa učinkovit inhibitor serumske butirilholinesteraze. Glede na količino preostalega nerazgrajenega butirilholina lahko določimo posameznike z mutirano butirilholinesterazo. Dibukainsko število je odstotek inhibiranega encima v prisotnosti 0,1 mM dibukaina in 5 mM sukcinildiholina. Vrednost od 80 naprej naj bi pomenila normalen (*wild type*) encim. Uporaba te metode za preverjanje aktivnosti butirilholinesteraze je bila opisana že leta 1957. (5)

#### 2. ELLMANOVA METODA

Metodo za ugotavljanje števila oziroma koncentracije tiolnih skupin v nekem vzorcu z uporabo Ellmanovega reagenta je razvil George L. Ellman in objavil leta 1959. Ellmanov reagent ali DTNB (5,5`-ditio-bis-2-nitrobenzojska kislina) je danes na voljo v specializirani prodaji. Ellmanova metoda deluje tako, da pride do zamenjave polovice DTNB s tiolno skupino v vzorcu. Preostala polovica, TNB, ki ionizira, je rumene barve. Število teh ionov lahko določimo z merjenjem absorpcije v spektrofotometru. (6)

Ellmanova metoda je danes najbolj razširjena metoda za določanje koncentracije spojin s tiolnimi skupinami.

## 2.3 SUKGINILDIHOLIN



Slika 5: Zgradba sukcinildiholina (7)

Učinkovina med anestezijo, ki povzroči kratkotrajno paralizo mišic, je sukcinildiholin, znan tudi kot suksametonij, suksametonijev klorid ali Leptosukcin<sup>R</sup>. Uporablja se zlasti v urgentni medicini, kjer je potrebno, da zdravilo učinkuje čim prej. Uporabljal se je začel v petdesetih letih prejšnjega stoletja in bil sprva široko sprejet med anesteziologi zaradi svojega hitrega delovanja in učinkovitega preprečevanja laringospazmov. Primeren je bil za uporabo, če pacientom ni primanjkovalo delujoče butirilholinesteraze. (12)

Uporaba sukcinildiholina v današnji medicini je sicer vse redkejša, saj so bile zdravilu pripisane številne kontraindikacije, pojavljali so se srčni zastoji pri otrocih z nediagnosticiranimi miopatijami, kot je Duchennova mišična distrofija. (13)

Še pogostejša komplikacija pa se je pojavljala pri prebujanju iz narkoze, torej neželena podaljšana paraliza. Prevalenca pomanjkanja normalno delujoče butirilholinesteraze je namreč dosti večja kot prevalenca nediagnosticiranih mišičnih bolezni. Pri 1 na samo 3000 administracij sukcinilholina naj bi prišlo do podaljšane apneje in paralize. (14)

Sicer podaljšana paraliza mišic nima usodnih posledic, če se prepozna dovolj zgodaj in zdravniki nadaljujejo z ventiliranjem pacienta ter ga ne ekstubirajo.

## 2.4 KRVNI SERUM

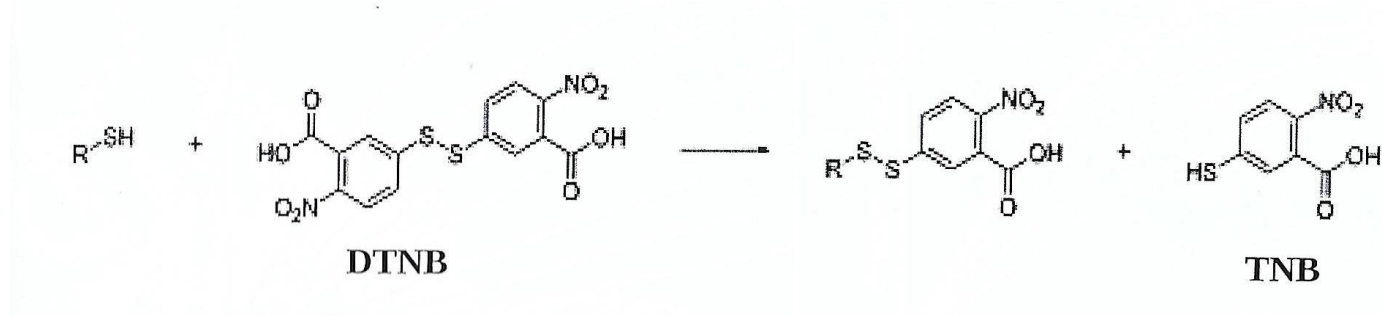
Krvni serum je tekoča sestavina krvi, ki jo dobimo, ko odstranimo krvne celice (eritrocite, levkocite in trombocite) ter faktor za strjevanje krvi (fibrinogen). Po odvzemu krvi pustimo, da se ta strdi. Vzorec se nato centrifugira, pri čemer se ločijo krvne celice in strdek, supernatant, ki ostane, pa je krvni serum. Tega sestavlja približno 90 % vode, 7 % beljakovin (albumini in globulini) in 3 % drugih snovi – elektrolitov, hormonov, drugih lipidov (holesterol). Krvni serum je uporaben za analize pri številnih diagnostičnih testih, saj vsebuje mnoge biomarkerje.

Pri odvzemu krvi je pomembno, kako vzorec skladiščimo oziroma v kakšno epruveto kri dovajamo ob odvzemu. Skoraj vsaka vrsta epruvete za krvne vzorce vsebuje določene aditive, namenjene različnim preiskavam. Če na primer želimo preveriti število krvnih celic, mora biti v epruveti prisotno antikoagulantno sredstvo, ki prepreči strjevanje krvi. Različni tipi epruвет z različnimi aditivi se med sabo ločijo po barvi pokrovčka. V naši raziskavi smo potrebovali krvni serum, zato so bile pri odvzemu krvi uporabljene epruvete z rdečimi pokrovčki. Te vsebujejo sredstvo za strjevanje, da se kri čim hitreje strdi in se lahko centrifugira za pridobitev seruma. (8)

## 3 METODOLOGIJA

### 3.1 METODA DOLOČANJA ENCIMSKE AKTIVNOSTI

#### 3.1.1 Ellmanova reakcija



Slika 6: Ellmanova reakcija

Tiolna skupina reagira z Ellmanovim reagentom, DTNB, pri čemer nastane  $TNB^{2-}$ .

Ellmanov reagent, po IUPACU 5,5-ditiol-2-nitrobenzojska kislina (DTNB), je kemikalija, ki se uporablja za določanje količine tiolnih skupin v vzorcu. Reakcija, ki nam omogoča ugotavljanje števila tiolnih skupin, se po predlagatelju imenuje Ellmanova reakcija.

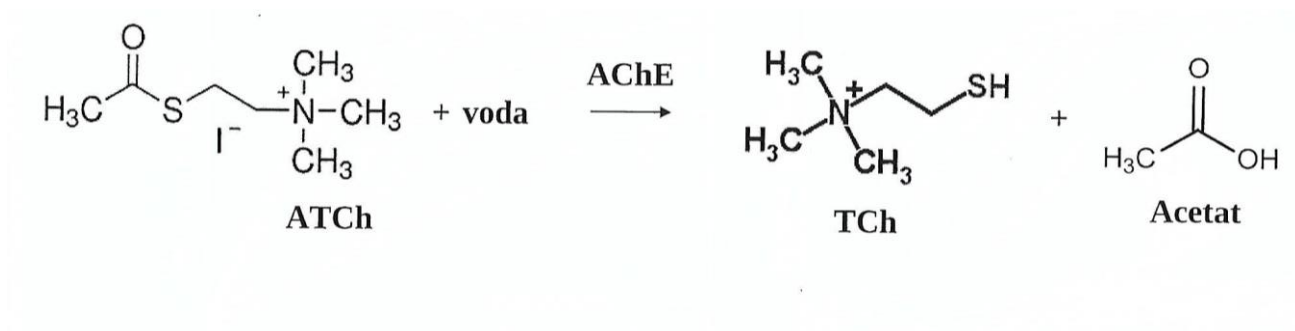
Ko DTNB reagira s tiolno skupino v vzorcu, pride do substitucije, pri kateri nastane produkt, kjer je vzorčna molekula disulfidno vezana z 2-nitro-5-tiobenzoatom (TNB) in še ena molekula prostega TNB, ki v nevtralnem ali bazičnem ionizira. Ta ion ( $TNB^{2-}$ ) je rumene barve, zato absorbira svetlobo valovne dolžine 412 nm.

Število nastalih ionov je enako številu prisotnih tiolnih skupin, zato je z merjenjem absorpcije svetlobe v vzorcu možno določati število molekul s tiolnimi skupinami.

Absorpcijo merimo s spektrofotometrom. Glede na preiskovan vzorec določimo valovno dolžino absorbirane svetlobe in molarni absorpcijski koeficient. (9)

Ellmanova metoda se običajno uporablja za zasledovanje reakcij s holinesterazami. Zato namesto acetilholina ali butirilholina uporabimo tioanaloga, acetiltioholin in butiriltioholin. Tako pri encimsko katalizirani hidrolizi poleg očetne kisline nastane še tioholin, ki v detekcijski reakciji reagira z DTNB (Slika 6).

Število nastalih ionov  $TNB^{2-}$  je enako številu zreagiranih tiolnih skupin, zato je prek absorpcije svetlobe v vzorcu možno ugotavljanje števila molekul s tiolnimi skupinami, ki so pri reakciji zreagirale.



Slika 7: Reakcija hidrolize acetiltioholina z AchE

## 3.2 SPEKTROFOTOMETRIJA

Spektrofotometrija spada v metode molekularne spektrometrije, ki temelji na absorpciji svetlobe v ultravijoličnem in vidnem delu sevanja. Uporabljajo se za identifikacijo različnih snovi in določanje njihove koncentracije v vzorcih.

Pri našem delu smo uporabljali tako imenovano UV/VIS-spektrofotometrijo. Specifičnost absorpcijskega spektra nam pomaga ločiti posamezne spojine v preučevani snovi. Del absorbirane svetlobe lahko kvantitativno povežemo s koncentracijo preučevanega vzorca, in sicer z uporabo Beer-Lambertovega ali absorpcijskega zakona. Ta opisuje absorpcijo svetlobe pri prehodu skozi obarvano raztopino:

$$A = c \times l \times \varepsilon$$

*Enačba 5: Absorpcijski zakon*

Pri čemer je:

A – absorbanca

c – koncentracija snovi

l – pot svetlobe skozi vzorec v kiveti

$\varepsilon$  – molarni ekstinkcijski oziroma absorpcijski koeficient (10)

Pri našem eksperimentalnem delu smo uporabljali dva konvencionalna UV/VIS-spektrofotometra – Lambda 45 in Lambda 365 proizvajalca PerkinElmer, pri nastavljeni valovni dolžini 412 nm. Pri izračunu koncentracije produkta oziroma dodanega substrata smo uporabili absorpcijski koeficient v vrednosti  $13.800 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Vsebinsko steklene kivete s stranico  $l = 0,5 \text{ cm}$  smo vedno po dodatku vseh sestavin premešali, vstavili v fotometer in po pribl. 10 sekundah začeli z meritvijo.





Slika 8: UV/VIS-spektrofotometer Lambda 45 (Vir: osebni arhiv)



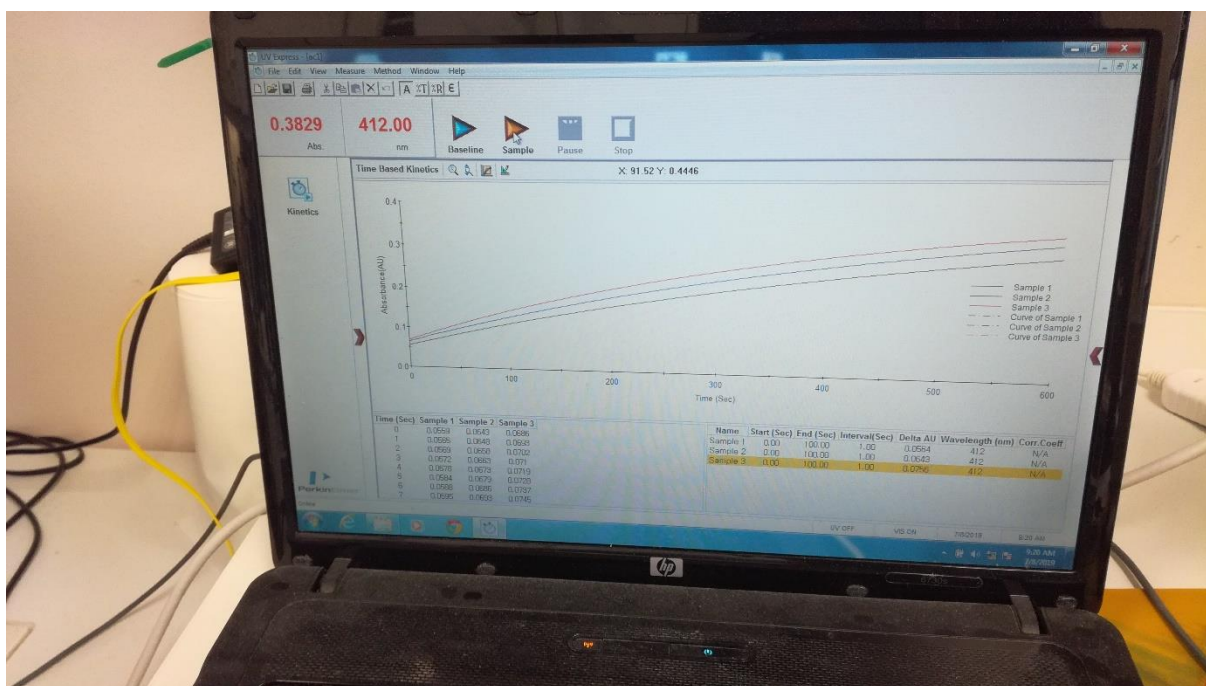
Slika 9: UV/VIS-spektrofotometer Lamba 365 (Vir: osebni arhiv)

### 3.3 OBDELAVA PODATKOV

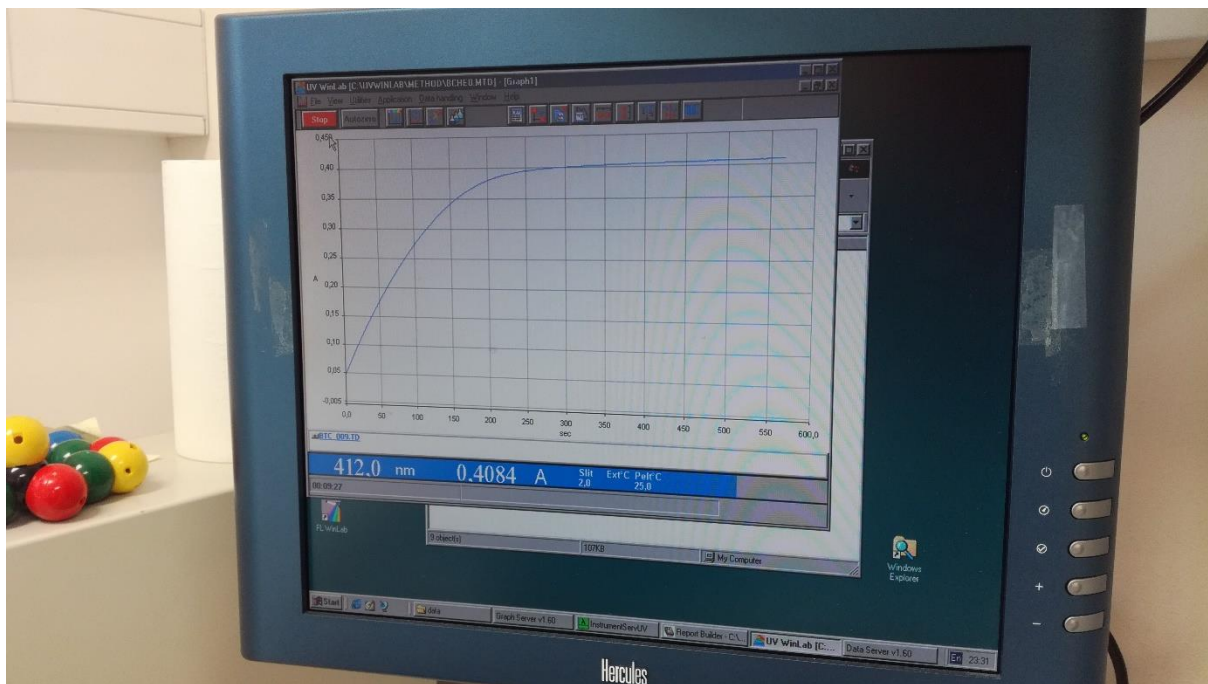
Za pridobivanje in shranjevanje podatkov, ki jih je zbral spektrofotometer, smo uporabili programski opremljeni UV WinLab in UV Express proizvajalca PerkinElmer. Vsako meritev smo izvajali 600 sekund, program pa je zanjo narisal graf spreminjanja absorbance v odvisnosti od časa.

Matematično analizo nastalih krivulj smo izvedli s spletno aplikacijo ENZO, ki je zasnovana tako, da iz vnesenih shem reakcij generira diferencialne enačbe. Nato z metodo najmanjših kvadratov poskuša izračunati koeficiente diferencialnih enačb tako, da je ujemanje med teoretičnimi in eksperimentalnimi krivuljami najboljše. Diferencialne enačbe rešuje program z numerično integracijo, saj eksplisitivnih enačb zaradi kompleksnosti analize ni mogoče izpeljati.

Vrednosti tako dobljenih kinetičnih parametrov smo nato še statistično ovrednotili z uporabo klusterske analize v programu R. Uporabili smo tako imenovano klustersko analizo K-means, ki združuje podatke v gruče glede na njihovo podobnost. Dobljena statistika za serume dijakov je v Tabeli 1.



Slika 10: Program UV Express (Vir: osebni arhiv)



Slika 11: Program UV WinLab (Vir: osebni arhiv)

## 4 EKSPERIMENTALNI DEL

### Uporabljene kemikalije

- destilirana in deionizirana voda analitske čistoče
- natrijev dihidrogenfosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), Sigma Aldrich, ZDA
- dinatrijev hidrogenfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), Sigma Aldrich, ZDA
- Ellmanov reagent (DTNB), Sigma Aldrich, ZDA
- sintetiziran substrat butiriltioholin, Sigma Aldrich, ZDA
- sukcinildiholin, Sigma Aldrich, ZDA

### Instrumenti

- pH-meter, Mettler, Nemčija
- UV/VIS-spektrofotometra Lambda 45 in Lambda 365 proizvajalca PerkinElmer
- analitična tehtnica Mettler, Nemčija
- druga osnovna oprema laboratorija (vibromiks magnetno mešalo, čaše, erlenmajerice, pipete, siringe, epruvete)



Slika 12: Analitska tehtnica METTLER (Vir: osebni arhiv)

#### **4.1 ODVZEM KRVNI IN PRIPRAVA VZORCA**

V naših poskusih smo uporabili krvne serume, ki smo jih pridobili od 19 prostovoljcev. Odvzem krvi je potekal v laboratorijih Zdravstvenega doma Celje. Vsakemu prostovoljcu so odvzeli po 3 mL krvi in jo shranili v posebne epruvete z rdečimi pokrovčki. Te epruvete so vsebovale sredstva za strjevanje, zaradi katerih se je kri hitro strdila, da so jo lahko centrifugirali in tako ločili krvne celice. Supernatant, ki je ostal pri centrifugiranju in so ga odlili, je bil krvni serum. Serume prostovoljcev so iz zdravstvenega doma takoj prepeljali v Ljubljano, kjer smo jih nato hranili v hladilniku (pri 4 °C) in uporabljali za preučevanje encima butirilholinesteraze.

## 4.2 EKSPERIMENTALNO DELO

### 4.2.1 Priprava kemikalij

#### PRIPRAVA PUFRA

Najprej smo pripravili prvo raztopino, tako da smo v 0,5 L destilirane in ionizirane vode dodali 1,95 g natančno zatehtanega natrijevega dihidrogenfosfata in tako dobili raztopino s koncentracijo 32,49 mM. Drugo raztopino pa smo pripravili tako, da smo v 0,5 L vode dodali 2,23 g dinatrijevega hidrogenfosfata in dobili raztopino s koncentracijo 15,7 mM. Potem smo 0,4 L prve raztopine dali v čašo z magnetnim mešalnikom in v čašo potopili elektrodo pH-metra. Prvi raztopini smo počasi dodajali drugo raztopino in sproti spremljali pH-vrednost, dokler ni ta dosegla vrednosti 7,0.

#### PRIPRAVA ELLMANOVEGA REAGENTA

Zatehtali smo 39,6 mg DTNB ( $C_{14}H_8N_2O_8S_2$ ) in ga previdno stresli v epruveto, v kateri je bilo 10 mL fosfatnega pufra (pH 7,0), ter pomešali na vibromiksu. Tako smo dobili raztopino z 10 mM koncentracijo.

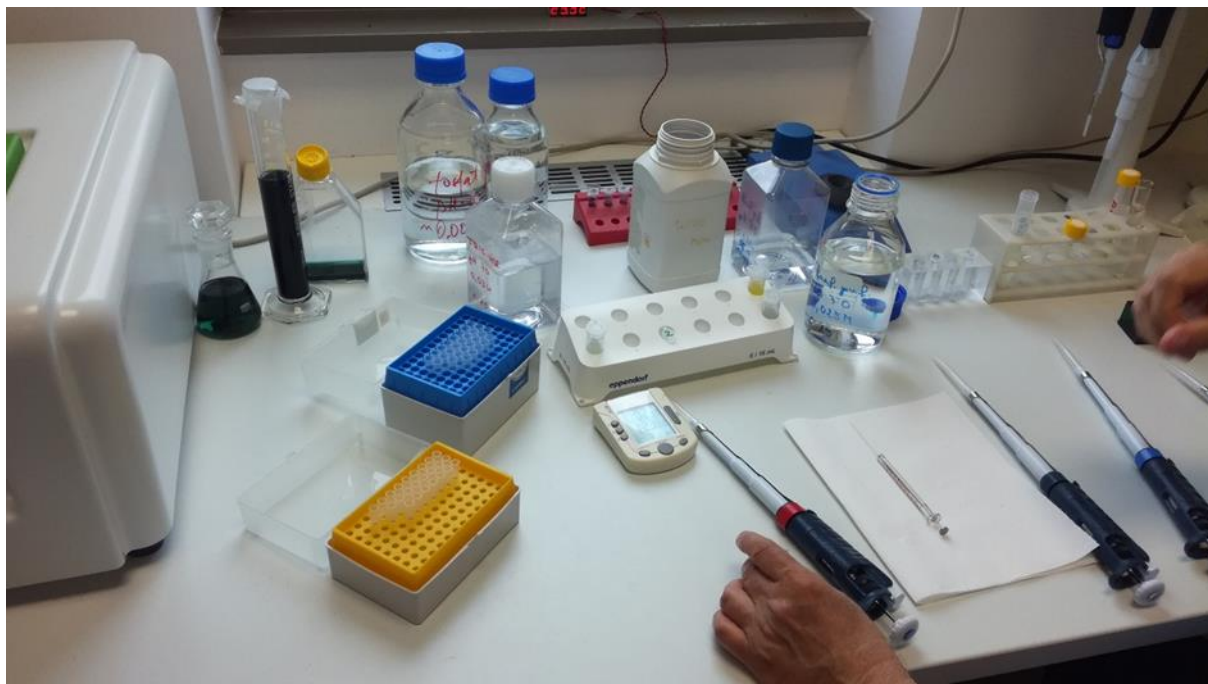
#### PRIPRAVA SUBSTRATA

23,89 mg butiriltioholina ( $C_9H_{20}NO_2^+$ ) smo zatehtali na analitični tehtnici, stresli v epruveto Eppendorf z 1 mL fosfatnega pufra (pH 7,0) in pomešali na vibromiksu. Dobili smo pufersko raztopino substrata s koncentracijo 75 mM.



#### 4.2.2 Preverjanje encimske aktivnosti butirilholinesteraze in inhibicijskih lastnosti butiriltioholina

Pripravljene raztopine smo zmešali po naslednji recepturi: 3594  $\mu\text{L}$  pufra, 900  $\mu\text{L}$  raztopine DTNB, 6  $\mu\text{L}$  raztopine butiriltioholina. Tako smo dobili raztopino A, s katero izvajamo poskus.



Slika 13: Priprava raztopin za delo (Vir: osebni arhiv)

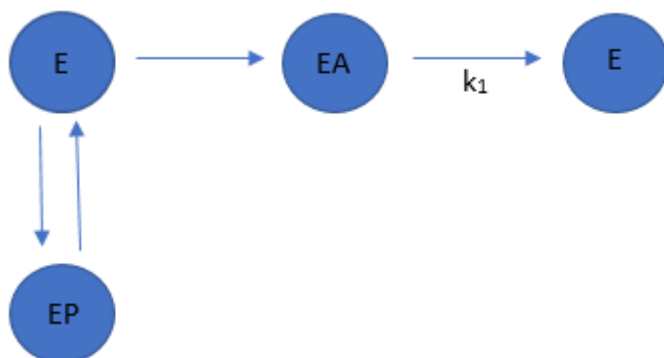
V kiveto smo odpipetirali 300  $\mu\text{L}$  raztopine A, ki smo ji dodali fosfatni pufer in vzorec seruma do končnega volumna 600  $\mu\text{L}$ . Serum smo dodajali v štirih količinah: 2,5  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$ , 7,5  $\mu\text{L}$  in 10  $\mu\text{L}$ . Tako smo pri dodatku 2,5  $\mu\text{L}$  seruma morali dodati še 297,5  $\mu\text{L}$  pufra, pri dodatku 5  $\mu\text{L}$  seruma še 295  $\mu\text{L}$  pufra in tako naprej. Pri serumih, kjer se je pokazala nižja aktivnost – krivulje v programu so rasle počasneje, imele manj strm naklon –, smo izmerili še peto meritev z dodatkom 15  $\mu\text{L}$  seruma. Kiveto smo nato pokrili s parafilmom, jo nekajkrat obrnili, da se je vsebina premešala, in jo vstavili v spektrofotometer. Vsaka meritev je trajala 10 minut. Krivulja, ki jo je v tem času izrisal program, povezan s spektrofotometrom, kaže časovni potek nastajanja produkta.

Pri tem poskusu in vseh naslednjih smo morali paziti na več stvari, ki bi lahko zmanjšale natančnost meritev. Delali smo v paru – ko je nekdo kiveto napolnil, jo pokril, premešal in vstavil v spektrofotometer, je drugi bil pripravljen pri spektrofotometru, zaprl pokrov in takoj zagnal meritev v programu. Tako smo zmanjšali čas med dodatkom seruma, ko je reakcija začela potekati, in začetkom meritve. Pred izvedbo vsake ponovne meritve smo morali kiveto dobro sprati z destilirano in deionizirano vodo.

V tem poskusu smo pri krivuljah, ki prikazujejo absorpcijo svetlobe v odvisnosti od časa, videli, da se hitrost nastajanja produkta rumene barve s časom upočasnjuje in popolnoma ustavi, ko doseže plato. To se zgodi, ko se ves dodani substrat pretvori v produkta. Seveda pa je vzrok za

upočasnjevanje poteka reakcije lahko tudi nenehno kopičenje produkta. To smo preverili tako, da smo po končani 10-minutni meritvi v reakcijsko zmes še 3-krat dodali zanemarljivo ( $0,4 \mu\text{L}$ ) količino koncentriranega butiriltioholina ( $75 \text{ mM}$ ) in vsakokrat nadaljevali 10-minutno meritev. S tem smo dosegli kopičenje produktov in z analizo krivulj ocenili njihov vpliv na hidrolizo butiriltioholina.

Dobljene eksperimentalne krivulje smo analizirali z uporabo spletne aplikacije ENZO v skladu z reakcijsko shemo na Sliki 14.



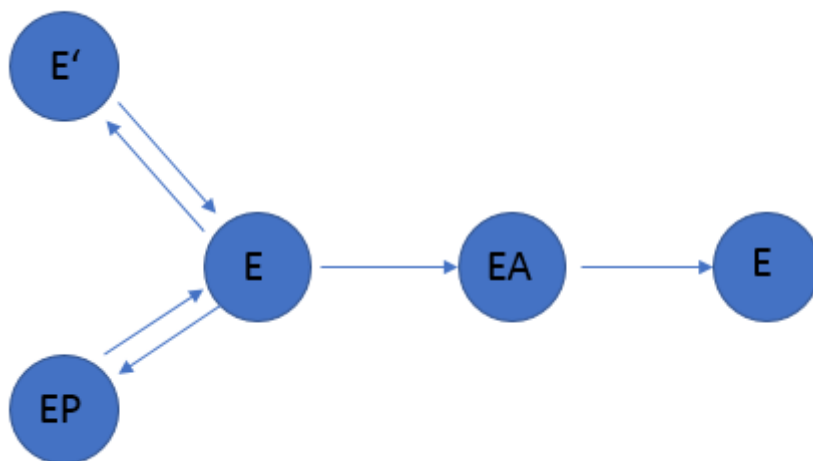
Slika 14: Shema razgradnje butiriltioholina, ki jo katalizira butirilholinesteraza s predpostavko produktne inhibicije



### 4.2.3 Preverjanje inhibicije hidrolize butiriltioholina s sukcinildiholinom

Inhibicijo hidrolize butiriltioholina v prisotnosti človeškega seruma smo preverjali z dodajanjem različnih koncentracij sukcinildiholina v pufersko raztopino DTNB, butiriltioholina in serumske butirilholinesteraze po prej opisani recepturi. Koncentracije sukcinildiholina v končni raztopini so bile 20  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  in 1 mM. To pomeni, da smo najprej dodali 4  $\mu\text{L}$  sukcinildiholina, nato 8  $\mu\text{L}$ , 16, 40, 160 in 300  $\mu\text{L}$  sukcinildiholina. Vsako posamezno meritev smo zopet izvajali 10 minut v spektrofotometru.

Dobljene eksperimentalne krivulje smo analizirali z uporabo spletne aplikacije ENZO v skladu z reakcijsko shemo na Sliki 15.



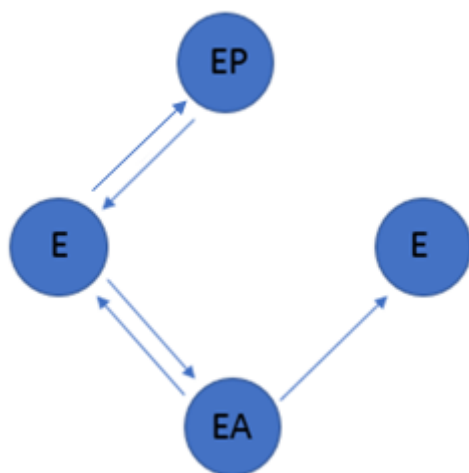
Slika 15: Shema reakcije hidrolize butiriltioholina s človeškim serumom, inhibirane s sukcinildiholinom in produkti

#### 4.2.4 Preverjanje encimove katalitične sposobnosti za razgradnjo sukcinildiholina

Pri tem poskusu je opazovana spremenljivka aktivnost encima, ki je zmanjšana zaradi zmanjšane količine sukcinildiholina. Hitrost razgradnje butiriltioholina (ki ga dodamo le za detekcijo encimske aktivnosti po različnih časih inkubacije seruma s sukcinildiholina) je odvisna od tega, kako hitro serum v času inkubacije hidrolizira sukcinildiholin.

V puferski raztopini smo pripravili raztopino 60-krat redčenega seruma skupaj s sukcinildiholinom, in sicer takole: 4144  $\mu\text{L}$  fosfatnega pufra, 480  $\mu\text{L}$  DTNB, 64  $\mu\text{L}$  7,5 mM sukcinildiholina in 80  $\mu\text{L}$  plazme, kar pomeni, da je končna koncentracija sukcinildiholina 1 mM. V različnih časih po dodatku plazme smo 596  $\mu\text{L}$  te raztopine dodali 4  $\mu\text{L}$  raztopine s koncentracijo 7,5 mM butiriltioholina in 10 minut merili spreminjanje absorbance pri 412 nm. Meritve smo izvajali po 35 sekundah, 30 minutah, 60 minutah, 90 minutah, 150 minutah, 210 minutah in 300 minutah inkubacije.

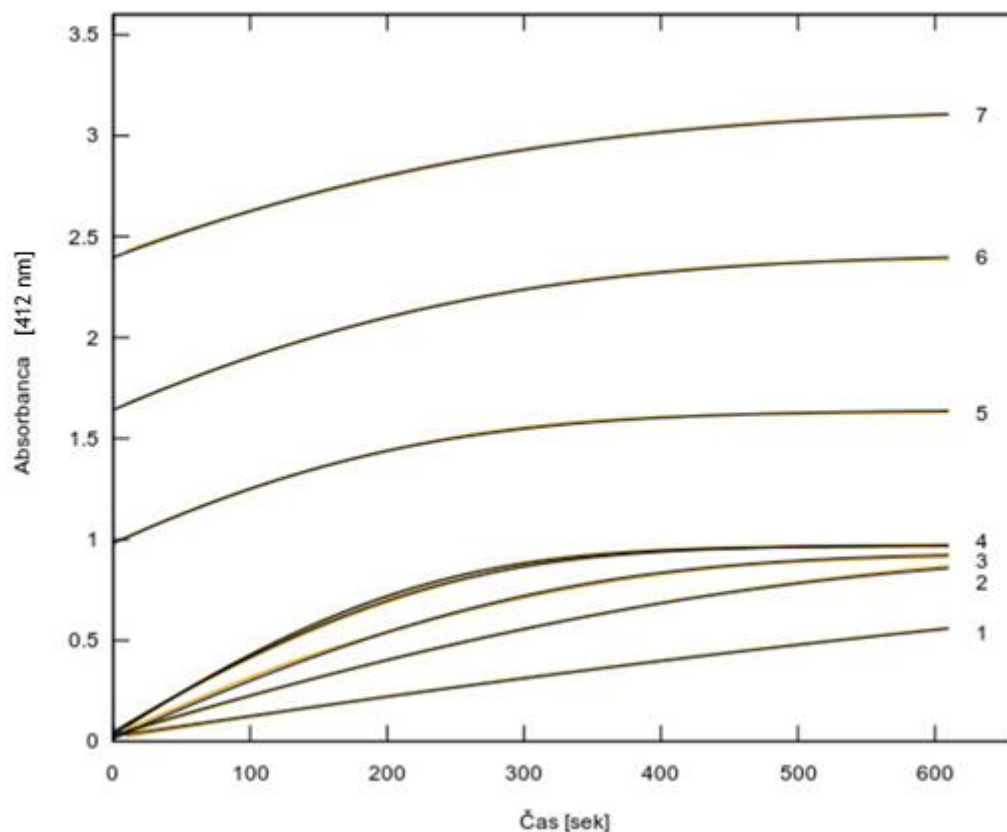
Dobljene eksperimentalne krivulje smo analizirali z uporabo spletne aplikacije ENZO v skladu z reakcijsko shemo na sliki 16.



Slika 16: Shema reakcije hidrolize sukcinildiholina s človeškim serumom

## 5 REZULTATI

### 5.1 PREVERJANJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI VZORCA SERUMA IN PRODUKTNE INHIBICIJE



Slika 17: Delovanje butirilholinesteraze

Na Sliki 17 so rezultati eksperimentalnega dela, v katerem smo preučevali aktivnost encima enega od vzetih serumov. Prikazuje spreminjanje absorbance v odvisnosti od časa. Količina absorbirane svetlobe se večja z nastajanjem produkta reakcije med serumsko butirilholinesterazo in njegovim substratom butiriltioholinom, kot je opisano v metodologiji.

Legenda:

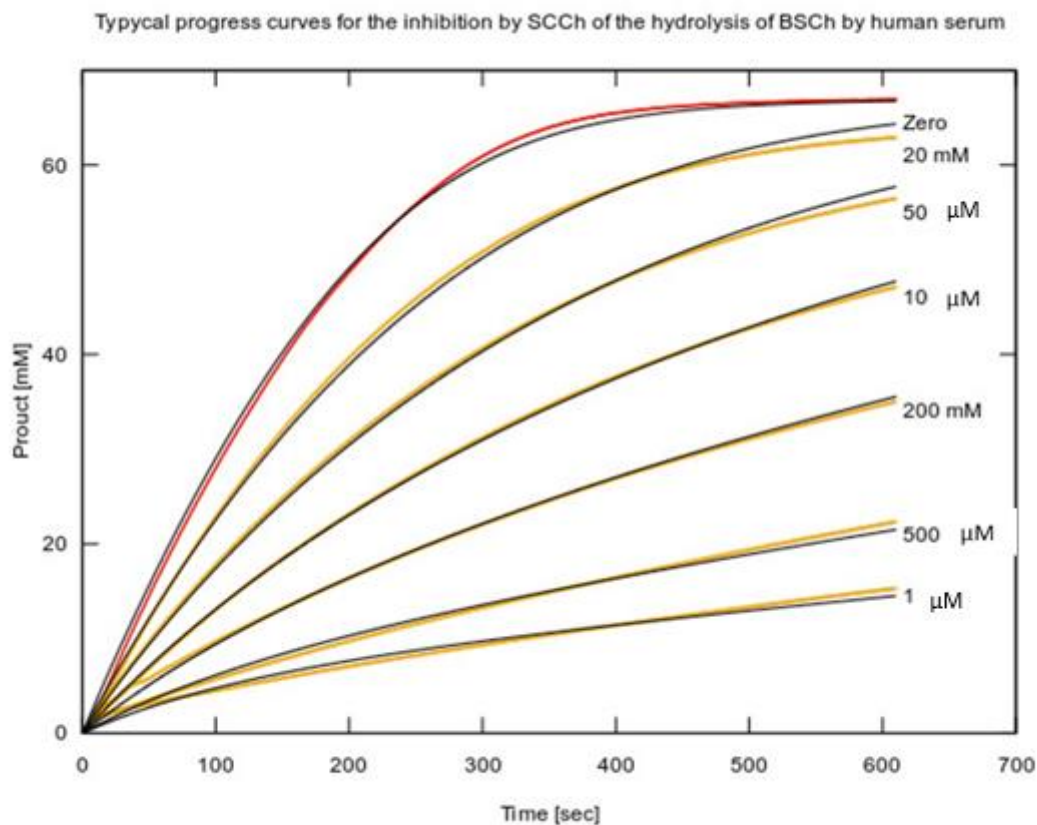
- krivulja 1 – dodatek 2,5  $\mu\text{L}$  seruma s človeško butirilholinesterazo
- krivulja 2 – dodatek 5  $\mu\text{L}$  seruma
- krivulja 3 – dodatek 7,5  $\mu\text{L}$  seruma
- krivulja 4 – dodatek 10  $\mu\text{L}$  seruma
- krivulja 5 – dodatek 10,4  $\mu\text{L}$  seruma
- krivulja 6 – dodatek 10,8  $\mu\text{L}$  seruma
- krivulja 7 – dodatek 11,2  $\mu\text{L}$  seruma

Z grafa na Sliki 17 je razvidno, da se le pri krivulji 4 (2-krat ponovljena, zato vidimo minimalno razliko) doseže plato in s tem popolna pretvorba butirilholinesteraze v tioholin in masleno kislino. Zato smo tej meritvi še 3-krat dodali približno enako količino butirilholinesteraze kot na začetku (po 0,4  $\mu$ L); te meritve orisujejo krivulje 5, 6 in 7. S ponovnim dodatkom substrata smo tako res opazili plato v 10 minutah, kolikor trajajo meritve.

Že ob hitrem pogledu grafa vidimo, da pri meritvah od 1 do 4 produkt nastaja vedno hitreje, saj vsakič dodamo večjo količino substrata. Račun pa pokaže, da se odvisnost hitrosti od količine seruma linearno spreminja. Taka odvisnost je pričakovana in potrjuje, da poteka hidroliza butiriltioholina zgolj zaradi prisotnosti serumske butirilholinesteraze. Po drugi strani pa lahko jasno vidimo, da se plato v krivuljah od 5 do 7 doseže vedno kasneje. Ker je edina razlika pri teh krivuljah akumulacija produkta, lahko iz tega sklepamo, da ta torej inhibira encim.

Sočasna analiza vseh krivulj na Sliki 17 z uporabo spletne aplikacije ENZO in reakcijske sheme na Sliki 14 pokaže izredno ujemanje teoretičnih z eksperimentalnimi krivuljami. Vrednosti ustreznih kinetičnih parametrov so napisane v Tabeli 1.

## 5.2 PREVERJANJE INHIBICIJE HIDROLIZE BUTIRILTIOHOLINA S SUKGINILDIHOLINOM



Slika 18: Vpliv sukcinildiholina na razgradnjo substrata

V drugem delu raziskave smo opazovali inhibicijo encima s sukcinildiholinom. Izbrani koncentraciji vzorca seruma (60-krat redčen) smo dodajali naslednje količine sukcinildiholina:

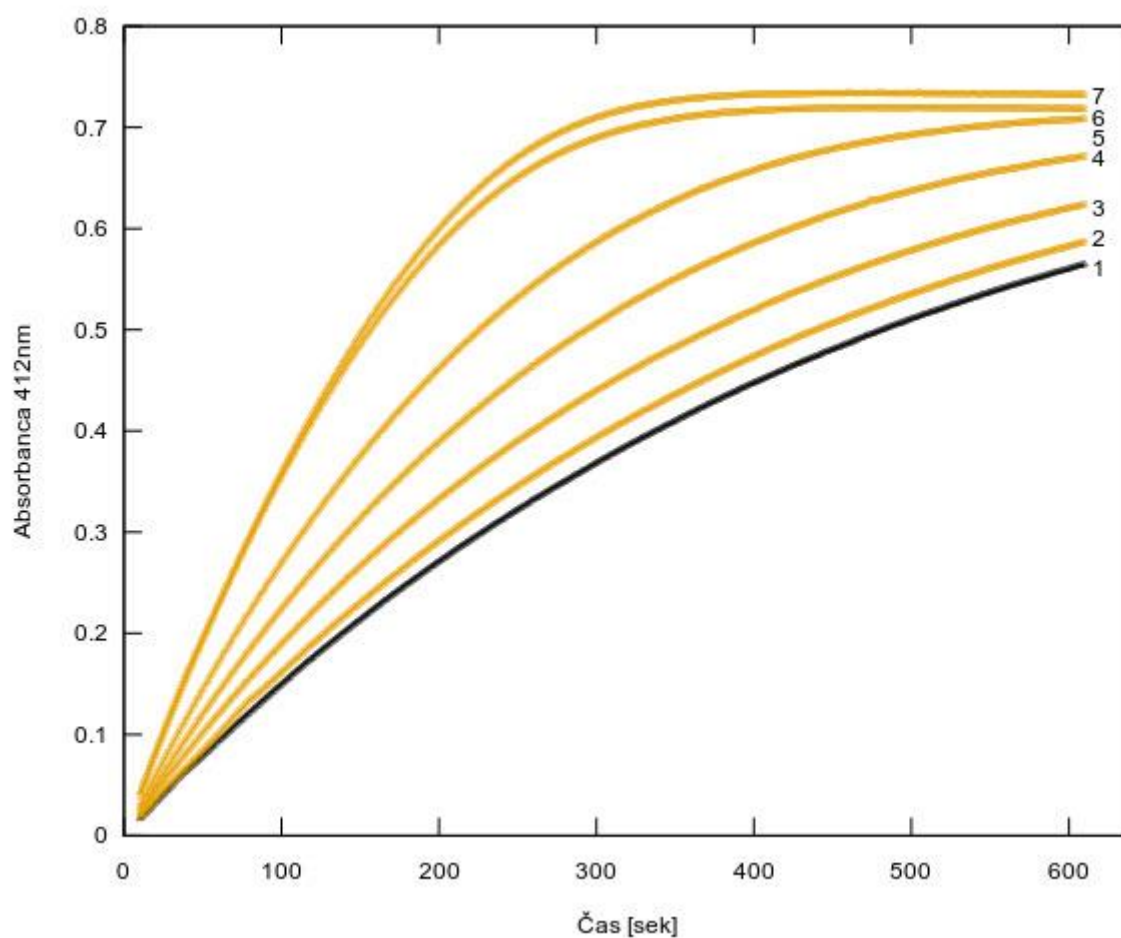
- krivulja 1 – ni dodanega sukcinildiholina, koncentracija 0,
- krivulja 2 – dodatek 4  $\mu\text{L}$  SSCh, končna koncentracija 20  $\mu\text{M}$ ,
- krivulja 2 – dodatek 8  $\mu\text{L}$  SSCh, končna koncentracija 50  $\mu\text{M}$ ,
- krivulja 3 – dodatek 16  $\mu\text{L}$  SSCh, končna koncentracija 100  $\mu\text{M}$ ,
- krivulja 4 – dodatek 40  $\mu\text{L}$  SSCh, končna koncentracija 200  $\mu\text{M}$ ,
- krivulja 5 – dodatek 160  $\mu\text{L}$  SSCh, končna koncentracija 500  $\mu\text{M}$ ,
- krivulja 6 – dodatek 300  $\mu\text{L}$  SSCh, končna koncentracija 1 mM.

Potek krivulj je odvisen od aktivnosti encima, ki ga v tem poskusu inhibira sukcinildiholin. Ob istem času je zato naklon krivulje z večjo koncentracijo inhibitorja manjši, kar je razvidno iz grafa. Plato tako ni dosežen pri meritvah z največjo koncentracijo sukcinildiholina.

Sočasna analiza vseh krivulj na Sliki 18 z uporabo spletne aplikacije ENZO in reakcijske sheme na Sliki 15 pokaže izredno ujemanje teoretičnih z eksperimentalnimi krivuljami. Vrednosti ustreznih kinetičnih parametrov so napisane v Tabeli 1.

### 5.3 PREVERJANJE KATALITIČNE SPOSOBNOSTI SERUMA ZA RAZGRADNJO SUKCINILDIHOLINA

Zadnji eksperiment te raziskovalne naloge je merjenje hitrosti hidrolize sukcinildiholina s 60-krat redčenim vzorcem človeškega seruma. Pripravili smo večjo količino puferske raztopine 0,1 mM sukcinildiholina, ki smo ji dodali serum. Takoj in po različnih inkubacijskih časih (od 35 sekund do 5 ur) smo alikvotom dodali majhno količino koncentriranega substrata in zasledovali časovni potek nastajanja produkta v 10-minutni meritvi.



Slika 19: Reaktivacija encimske aktivnosti

Krivulja 1: encimska aktivnost po 35 sekundah inkubacije

Krivulja 2: aktivnost po 30 minutah inkubacije

Krivulja 3: 60 minut inkubacije

Krivulja 4: 120 minut inkubacije

Krivulja 5: 180 minut inkubacije

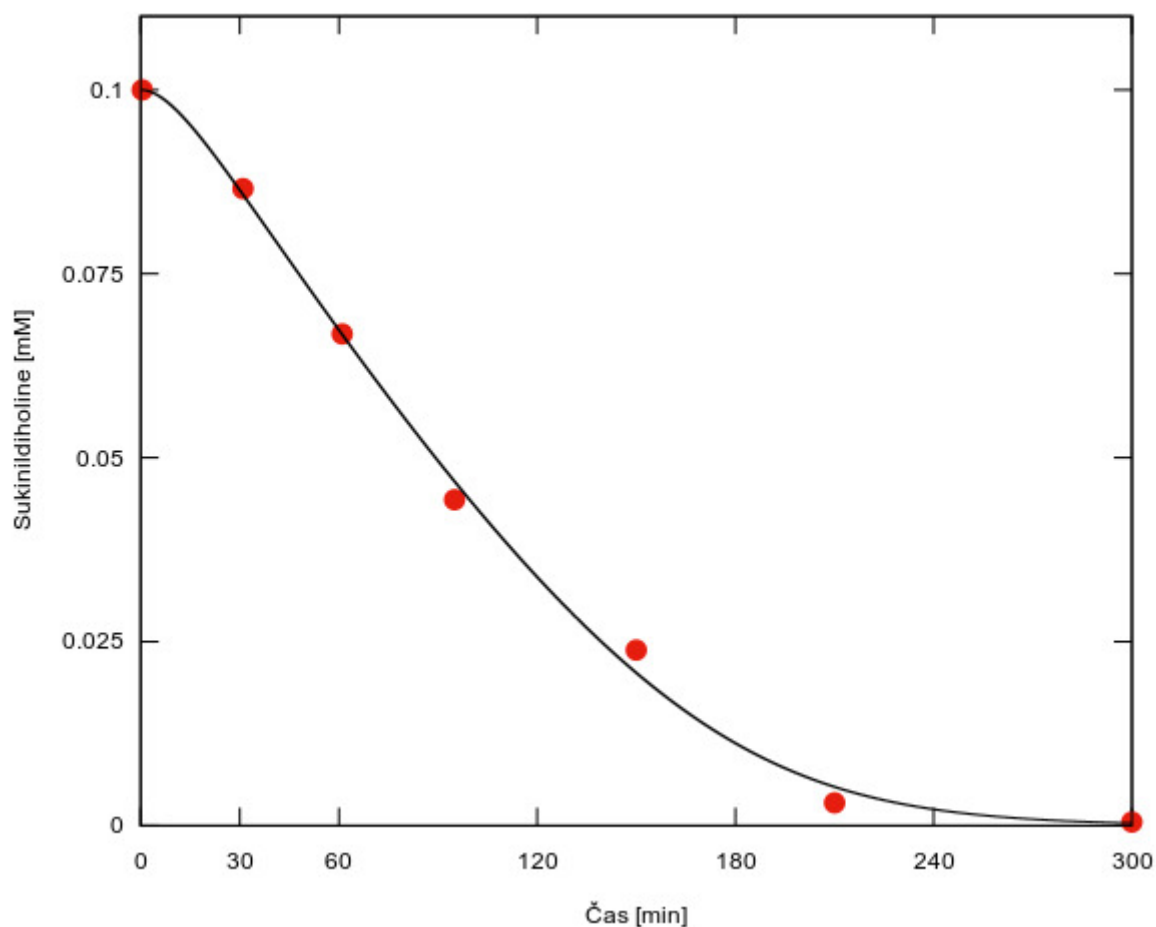
Krivulja 6: 240 minut inkubacije

Krivulja 7: 300 minut inkubacije

Slika 19 prikazuje sedem takih meritev, pri katerih se jasno vidi, da se z daljšanjem časa inkubacije povečuje encimska aktivnost vzorca. Ker je edina razlika med meritvami le podaljšanje inkubacijskega časa delovanja serumske butirilholinesteraze na sukcinildiholin v kumulativnem vzorcu, je edina razlaga zmanjšanje koncentracije sukcinildiholina in posledično vedno manjše zaviranje encima.

Sočasna analiza vseh krivulj na Sliki 19, z uporabo spletne aplikacije ENZO in reakcijske sheme na Sliki 16, pokaže tudi v tem primeru izredno ujemanje teoretičnih z eksperimentalnimi krivuljami. Na prvi pogled zgleda analiza podatkov na Slikah 18 in 19 enaka. Uporabljen je bil namreč isti reakcijski mehanizem. Vendar pa je v analizah bistvena razlika: pri poskusu inhibicije encima s sukcinildiholinom smo določali kinetične parametre v reakcijski shemi, saj smo uporabili znane koncentracije sukcinildiholina; v poskusu hidrolize sukcinildiholina s serumsko butirilholinesterazo pa smo poznali le koncentracijo sukcinildiholina pri meritvi krivulje 1 na Sliki 19. Zato smo v analizi krivulj s Slike 19 dejansko določali preostalo koncentracijo sukcinildiholina v krivuljah 2–7.

Rezultati te analize so prikazani na Sliki 20.



Slika 20: Časovni potek hidrolize 0,1 mM koncentracije sukcinildiholina s 60-krat redčenim človeškim serumom



Iz krivulje, ki kaže časovni potek hidrolize začetne raztopine s koncentracijo 0,1 mM sukcinildiholina s 60-krat redčenim vzorcem človeškega seruma, je mogoče določiti oba kinetična parametra,  $K_m$  in  $k_{cat}$ , za pretvorbo sukcinildiholina. Tudi to analizo smo izvedli s pomočjo spletne aplikacije ENZO, tokrat z implementacijo reakcijske sheme na Sliki 13. Oba kinetična parametra sta napisana v Tabeli 1.

## **5.4 ANALIZA GRUPIRANJA KINETIČNIH PARAMETROV VZORCEV ČLOVEŠKIH SERUMOV**

Ker smo želeli ugotoviti razlike v preiskovanih lastnostih serumske butirilholinesteraze najinih sošolcev, smo izvedli analizo grupiranja vzorcev s statističnim programom R. Rezultati so napisani v zadnji vrsti Tabele 1. Ti kažejo dve skupini za vrednosti v kolonah koncentracije encima v serumu, konstante specifičnosti encima za sukcinildiholin in Michaelisove konstante za butirilholinesterazo. V kolonah inhibicijske in katalitske konstante za sukcinildiholin pa so vrednosti pri vseh vzorcih serumov sošolcev podobne. Izpostaviti je treba še vzorec prostovoljke (X8), ki kaže slabšo afiniteto za sukcinildiholin in tudi najnižjo koncentracijo butirilholinesteraze.

Tabela 1: Kinetični parametri butirilholinesteraze v serumih dijakov

Dijaki, ki jim je bila odvzeta kri	Konc. encima x 0,1 nM	$K_m$ BTChE x 0,01 mM	$K_i$ SSCh x 0,01 mM	$k_{cat}$ SSCh s <sup>-1</sup>	$K_{spec}$ x 10 <sup>7</sup> M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup>
X <sub>1</sub>	6,92	7,96	7,57	41	10,2
X <sub>2</sub>	3,51	10,6	12,4	37	7,68
X <sub>3</sub>	4,83	9,13	9,01	22	8,91
X <sub>4</sub>	2,82	8,19	9,77	26	9,94
X <sub>5</sub>	4,49	9,59	10,4	32	8,48
X <sub>6</sub>	3,05	9,07	9,68	44	8,97
X <sub>7</sub>	3,89	7,79	7,87	31	10,4
X <sub>8</sub>	2,46	16,2	40	50	5,02
X <sub>9</sub>	2,89	5,19	7,06	38	15,7
X <sub>10</sub>	3,26	9,15	12,3	32	8,9
X <sub>11</sub>	3,29	8,27	10,7	35	9,84
X <sub>12</sub>	2,5	8,13	9,85	37	10
X <sub>13</sub>	4	6,24	8,21	28	13,1
X <sub>14</sub>	3,46	9,03	12,5	47	9,01
X <sub>15</sub>	2,99	9,73	11,9	44	8,37
X <sub>16</sub>	3,76	10,9	8,72	29	7,5
Y <sub>1</sub>	4,02	10,4	8,96	21	7,82
Y <sub>2</sub>	4,14	8,59	9,58	42	9,47
Y <sub>3</sub>	4,01	6,11	8,9	32	13,3
	2 skupini	3 skupine	2 skupini	1 skupina	2 skupini
Klasterska analiza s programom R	3,1; 4,5	5,8; 9,1; 16,2	9,7; 40,0	35,2	8,8; 14,0

Legenda: X – dijakinja  
Y – dijak

$K_m$  – Michaelisova konstanta, ki izraža količino substrata, pri kateri je dosežena polovica maksimalne hitrosti poteka reakcije

$K_i$  – inhibicijska konstanta, ki izraža koncentracijo inhibitorja, ki je potrebna za dosego polovice maksimalne inhibicije

$k_{cat}$  – pretvorbno število, ki predstavlja maksimalno število molekul substrata, ki se lahko v določeni časovni enoti pretvori v produkt

$K_{spec}$  – razmerje med  $k_{cat}$  in  $K_m$ , iz katerega lahko ugotavljamo učinkovitost encima

## 6 DISKUSIJA

V raziskovalni nalogi smo testirali 19 vzorcev človeških serumov prostovoljcev. Ključno vprašanje, ki smo si ga postavili, je bilo, kako hitro encim butirilholinesteraza v njihovi krvi hidrolizira sukcinildiholin, mišični relaksant, ki se uporablja pri urgentnih kirurških posegih. Da bi dobili odgovor na osnovno vprašanje, smo izvedli tri vrste kinetičnih poskusov in ustrezno analizo – kinetično in statistično.

V prvem setu poskusov smo ugotavljali koncentracijo butirilholinesteraze v vzorcih in oba njena osnovna kinetična parametra: produktivno afiniteto ( $K_m$ ) in pretvorbno število ( $k_{cat}$ ) do njenega optimalnega substrata, butiriltioholina. Poleg tega smo določili tudi inhibicijsko konstanto nastalega produkta. Znano je, da oba produkta hidrolize kisikovega analoga butirilholina (BCh), holin in maslena kislina, nimata inhibitornega učinka na butirilholinesterazo. Iz tega bi lahko zaključili, da to velja tudi za butiriltioholin, substratni analog, ki ima na mestu kisika žveplo. Vendar pa se zaradi detekcijske Ellmanove reakcije med meritvijo časovnega poteka hidrolize butiriltioholina ne kopiči tioholin, ampak njegov konjugat, ki nastane po reakciji z DTNB. To smo dokazali z merjenjem krivulj 5–7 na Sliki 17.

V naslednji fazi smo preučevali inhibitorni učinek sukcinildiholina na hidrolizo butirilholina. Iz meritev encimske aktivnosti pri šestih različnih koncentracijah sukcinildiholina smo izračunali disociacijsko konstanto za vezavo sukcinildiholina na butirilholinesterazo. Smiselno se je vprašati, kako je mogoče dobiti podatke o inhibiciji s sukcinildiholinom, če pa je sukcinildiholin substrat butirilholinesteraze in bi ga morala ta pretvarjati. Odgovor je, da je sukcinildiholin slab substrat človeške butirilholinesteraze. Na encim se sicer dobro veže, a ga ta le počasi pretvarja. Vrednost katalitske konstante encima za sukcinildiholin je nizka in zato Michaelisova konstanta predstavlja afiniteto butirilholinesteraze do sukcinildiholina. To se v 10-minutnih meritvah vidi kot inhibicija z zanemarljivim katalitskim prispevkom.

S temi podatki smo v tretjem setu kinetičnih poskusov zasledovali hidrolitično razgradnjo dodane raztopine z 0,1 mM koncentracijo sukcinildiholina s 60-krat redčenim vzorcem seruma. Vse do zdaj določene kinetične konstante smo uporabili za izračun vsakokratne koncentracije sukcinildiholina v krivuljah 2–7 na Sliki 20. Posebej je treba poudariti, da so bili podatki pri teh meritvah pridobljeni v intervalu petih ur, kar je bistveno daljše od 10-minutnih meritev inhibitornega učinka. Zato smo natančno izbrali začetno koncentracijo sukcinildiholina (0,1 mM) pri količini seruma, ki smo jo uporabljali tudi pri določanju inhibitornega učinka. Seveda bi večja začetna koncentracija sukcinildiholina podaljšala čas hidrolize, večja količina seruma pa bi ga skrajšala.

V zadnji stopnji raziskovalne naloge smo kinetične parametre za vse preiskovance primerjali tako, da smo poiskali morebitne razlike. Tri konstante so se grupirale v dva razreda, dve pa sta bili pri vseh preiskovancih zelo podobni (Tabela 1). To je mogoče razložiti s predpostavko, da je v vzorcih z večjo koncentracijo encima in nižjo Michaelisovo konstanto za butirilholinesterazo normalna homozigotna varianta encima, v preostalih pa je verjetno heterozigotna. To je tudi v skladu z rezultati, ki niso vključeni v to študijo; vzorci serumov z večjo koncentracijo encima in nižjo  $K_m$  kažejo enake kinetične lastnosti kot serum, ki je bil

genotipiziran kot heterozigoten za normalno varianto, drugi pa so podobni heterozigotom med normalno in atipično varianto. Da bi lahko vzorec X8 natančneje opredelili bi morali narediti še nekaj dodatnih testiranj in verjetno tudi genotipizacijo.

Na koncu naj omenimo še eno podrobnost: ko serumska butirilholinesteraza hidrolizira sukcinildiholin, iz njega nastaneta holin in sukcinilmonoholin. Zdi se, da bi slednji lahko interaktiral z encimom, pa tudi s holinergičnim receptorjem, na enak način kot prvi. To se seveda ne zgodi, ker je za interakcije pomemben pozitiven naboj: sukcinildiholin ima dva, sukcinilmonoholin pa je nevtralen. Ne glede na to smo v znanih podatkih preverili afiniteto med sukcinilmonoholinom in butirilholinesterazo, ki je tri velikostne razrede slabša kot v primeru sukcinildiholina. Iz tega sledi, da v vseh naših poskusih, v katerih je sodeloval sukcinildiholin, njegova razgradnja produkta nima pomembnega učinka.

Naj zaključimo ta del diskusije s poudarkom, da je to prva in originalna predstavitev hidrolitične razgradnje mišičnega relaksanta sukcinildiholina, izvedena neposredno s serumski preiskovancev. Tako lahko našo hipotezo potrdimo.

Za enega od ciljev naše naloge pa smo si zadali tudi to, da ugotovimo, ali bi bilo našo metodo preverjanja encimske aktivnosti butirilholinesteraze smiselno uvesti v klinično prakso. Zato smo šli v našo lokalno bolnišnico in od anesteziologa izvedeli, da se delovanje tega encima preverja zelo redko. Nevarnost nedelujočega encima se namreč pokaže le pri administraciji sukcinildiholina, ki pa se dandanes uporablja le še za urgentne intubacije pri nujnih carskih rezih ali kroničnih bolnikih z nevarnimi stanji, kot je ileus. V teh primerih ne vemo, ali so pacienti tešči, in v interesu kirurga je, da je operacija opravljena čim prej. Zato je zaželeno, da anestetik ne deluje dolgo in da ga lahko odmerjamo po potrebi. Za sukcinildiholin pa je značilno ravno kratkotrajno delovanje, ki ga lahko anesteziolog odmerja in ponovno dodaja glede na potek operacije. V bolnišnici kljub možnim zapletom zaradi nedelovanja butirilholinesteraze encimske aktivnosti ne preverjajo. Ko smo izvedeli, da zmožnosti bolnišničnih laboratorijev ne omogočajo hitrega preizkušanja encima, se nam je zdelo, da bi bila optimizacija procesa dobrodošla pridobitev. S tem se je strinjala tudi ginekologinja, s katero smo se posvetovali. Trend kaže na porast carskih rezov širom sveta, verjetno tudi zaradi dejstva, da ženske rojevajo vedno pozneje. Poročilo Europeristata za leto 2015 navaja, da se je delež carskih rezov v nekaterih državah dvignil že prek 40 %. (11) V skladu s to statistiko in z namero zagotavljanja varnosti pacientk se nam je porodil predlog, da bi delovanje butirilholinesteraze preverjali pri vseh nosečnicah ob standardnem pregledu v prvem trimesečju. Za uporabo naše metode laboratorij potrebuje namreč le krvni serum pacientke, Ellmanov reagent in običajno opremo vsakega biokemičnega laboratorija. Tudi časovno je metoda zelo ugodna. Toda upoštevajoč prevalenco atipičnega encima (1 na 15.000), delež nosečnic z urgentnimi carskimi rezi, ki sicer narašča, in zaposlenost povprečnega bolnišničnega laboratorija, smo sklenili, da za zdaj obstajajo pomisleki glede dejanske implementacije našega predloga.

## 8 VIRI IN LITERATURA

1. *Temelji biokemije*. Boyer, Rodney. Študentska založba, 2005.
2. *Encimska kinetika*. [Elektronski vir, pridobljeno januar 2020] <http://ibk.mf.uni-lj.si/teaching/biokemija1/predavanja/predavanje35Z12.pdf>.
3. *The plasma cholinesterases: a new perspective*. S. S. Brown, W. Kalow, W. Pilz, M. Whittaker, C. L. Woronick. Academic Press. Inc., 1981.
4. *Acetylcholinesterase*. TL, Rosenberry. Izvod Adv Enzymol Relat Areas Mol., 1975
5. *Comparison of the Binding of Reversible Inhibitors to Human Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase: A Crystallographic, Kinetic and Calorimetric Study*. T. L. Rosenberry, X. Brazzotto, I. R. Macdonald, M. Wandhammer, M. Trovaslet-Leroy, S. Darvesh, F. Nachon. *Molecules*, 2017.
6. *A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase. Determination of dibucaine numbers*. W. Kalow, K. Genest. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 1957.
7. *Characterization of Butyrylcholinesterase from Porcine Milk*. A. Saxena, T. Belinskaya, L. M. Schopfer, O. Lockridge. *Arch Biochem Biophys*, 2018.
8. *Is There Still a Role for Succinylcholine in Contemporary Clinical Practice?* C. Bohringer, H. Moua, H. Liu. *Translational Perioperative and Pain Medicine* (ISSN: 2330-4871). [Elektronski vir, pridobljeno november 2019] <http://www.transpomed.org/articles/tpm/tpm-2019-6-100.php>.
9. *Blood Collection Tubes*. [Elektronski vir, pridobljeno januar 2020] [https://www.calgarylabservices.com/files/HealthcareProfessionals/Specimen\\_Collection/BloodCollectionTubes.pdf](https://www.calgarylabservices.com/files/HealthcareProfessionals/Specimen_Collection/BloodCollectionTubes.pdf).
10. *Določanje števila cisteinov v proteinu*. [Elektronski vir, pridobljeno december 2020] [https://studentski.net/gradivo/ulj\\_fkt\\_bi1\\_bpr\\_vaj\\_dolocanje\\_stevila\\_cisteinov\\_v\\_proteinu\\_01\\_\\_porocilo](https://studentski.net/gradivo/ulj_fkt_bi1_bpr_vaj_dolocanje_stevila_cisteinov_v_proteinu_01__porocilo).
11. *Biokemija in molekularna biologija*. K. Repnik, U. Potočnik. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. [Elektronski vir, pridobljeno november 2019] [https://www.fkkt.um.si/egradiva/fajli/Biokemija\\_in\\_Molekularna\\_biologija\\_2014.pdf](https://www.fkkt.um.si/egradiva/fajli/Biokemija_in_Molekularna_biologija_2014.pdf).
12. *Better Statistics for Better Health for Pregnant Women and Babies in Europe in 2015*. [Elektronski vir, pridobljeno februar 2020] [https://www.europeristat.com/images/2018\\_11\\_26\\_PR\\_PerinatHealthFrEU2015\\_V2.pdf](https://www.europeristat.com/images/2018_11_26_PR_PerinatHealthFrEU2015_V2.pdf).
13. *Vrednotenje 1,3-substituiranih piperidinov kot potencialnih učinkovin z multiplim delovanjem na zdravljenje Alzheimerjeve bolezni*. Pirnat Andreja. Magistrske naloge UL FFA. [Elektronski vir, pridobljeno december 2019] [http://www.ffa.uni-lj.si/docs/default-source/knjiznica-doc/magistrske/pirnat\\_andreja\\_mag\\_nal\\_2016.pdf?sfvrsn=2](http://www.ffa.uni-lj.si/docs/default-source/knjiznica-doc/magistrske/pirnat_andreja_mag_nal_2016.pdf?sfvrsn=2).

14. *The cholinesterases: From genes to proteins*. Z. Radić, P. Taylor. Annual reviews. [Elektronski vir, pridobljeno november 2019] <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pa.34.040194.001433>.
15. *Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase*. A. Chatonnet, O. Lockridge. National Library of Medicine, 1989. [Elektronski vir, pridobljeno november 2019] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1138724/?page=6>.
16. *Intractable cardiac arrests in children given scoline*. H. Rosenberg, G. A. Gronert. Izvod. Anesthesiology 1992; 77: 1054–6.
17. *Frequencies of atypical pseudocholinesterase in a mixed population of northeastern Brazil*. E.A. Chautard-Freire-Maia, R.D. Carvalho, M.C. Da Silva, M.G. Souza, ES. Azevedo. Izvod Hum Hered 1984; 34(6): 364–70.
18. *A medical health report on individuals with silent butyrylcholinesterase in the Vysya community of India*. I. Manoharana, R. Boopathya, S. Darvesh, O. Lockridge. Clinica Chimica Acta, 2007.
19. *Synergistic Inhibition of Butyrylcholinesterase by Galantamine and Citalopram*. R. Walsh, K. Rockwood, E. Martin, S. Darvesh. Biochim Biophys Acta, 2011.
20. *Single-Molecule Enzymology: Fluorescence-Based and High-Throughput Methods*. R. Chadda, J. L. Robertson. Methods in Enzymology, 2016.
21. *Thiol*. [Elektronski vir, pridobljeno december 2019] <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/thiol>.
22. *Encimska kinetika - povzetek*. [Elektronski vir, pridobljeno december 2019] <http://ibk.mf.uni-lj.si/teaching/biokemija1/predavanja/predavanje36.pdf>.
23. *Turnover Number*. R. Roskoski [Elektronski vir, pridobljeno december 2019] <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/turnover-number>.
24. *Alpha/Beta-hydrolase fold enzymes: structures, functions and mechanisms*. M. Holmquist [Elektronski vir, pridobljeno januar 2020] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12369917>.
25. *The mechanism and benefit of human butyrylcholinesterase activation by what would otherwise be inhibitors*. J. Stojan. Ljubljana: Chemico-Biological Interactions, 2019.
26. *ENZO: a Web Tool for Derivation and Evaluation of Kinetic Models of Enzyme Catalyzed Reactions*. [Elektronski vir, pridobljeno januar 2020] <http://enzo.cmm.ki.si>.