

P R I K A Z I

Reviews Обозрения

Arh. hig. rada, 17 (1966) 324.

OPĆENITO O ESTERAZAMA S NAROČITIM OSVRTOM NA ENZIMATSKU HIDROLIZU ORGANOFOSFORNIH SPOJEVA

MIRA ŠKRINJARIĆ-ŠPOLJAR

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

(Primljeno 29. IV 1966)

Iznesen je prikaz literature o klasifikaciji esteraza, mehanizmu djelovanja hidrolitskih enzima općenito, kao i o enzimatskoj hidrolizi organofosfornih spojeva. Načinjen je i pregled radova s područja istraživanja distribucije, specifičnosti i karakteristika A-esteraza.

Nagli razvoj enzimologije i porast broja poznatih enzima, osobito posljednjih godina, uzrokovali su mnoge teškoće u pogledu nomenklature, naročito ako se uzmu u obzir neslaganja koja proizlaze iz nekontroliranog nadijevanja imena pojedinim enzimima od individualnih istraživača. Kako je svrha enzimologije da razmatra ne samo kemijsko djelovanje enzima već i njihovu biološku ulogu, to bi imena pojedinim enzimima trebalo odvoditi od njihovih prirodnih supstrata, a ne od sintetskih spojeva koji služe za izučavanje njihovih svojstava. Taj je zahtjev danas još teško zadovoljiti, jer je u potpunosti istražen tek malen broj poznatih enzima. Do sada je ukupno opisano približno 700 enzima, no broj tipova reakcija koje enzimi kataliziraju malen je u usporedbi s tim brojem. Uzrok je tome izrazita specifičnost enzima, koja se očituje ne samo na onom dijelu molekule na kojem se odvija reakcija, već i prema drugim dijelovima molekule supstrata.

Mehanizam djelovanja enzima također je jedan od osnovnih problema kojim se već godinama bave mnogi istraživači. Postavljene su brojne teorije, kojih je zajednička karakteristika ideja o aktivaciji supstratne molekule, bilo da se tumači polarizacijom, prenosom protona ili elektrona, ili na koji drugi način. Uprkos brojnim radovima na području hidrolize fosfatnih estera, mehanizam enzimatske hidrolize još uvijek nije riješen. Pretpostavlja se da se enzimatska hidroliza organo-

fosfornih spojeva odvija reakcionim mehanizmom sličnim neenzimatskoj hidrolizi fosfornih estera kataliziranoj bazom.

Podaci iz literature o klasifikaciji esteraza, mehanizmu djelovanja hidrolitskih enzima općenito, kao i o enzimatskoj hidrolizi organofosfor-
nih spojeva, izneseni u ovom prikazu, podijeljeni su u ova poglavlja:

Klasifikacija i nomenklatura esteraza
Klasifikacija hidrolaza
A-esteraze
Distribucija A-esteraza
A-esteraze seruma
A-esteraze tkiva
Zajedničke karakteristike A-esteraza
Mehanizam djelovanja

KLASIFIKACIJA I NOMENKLATURA ESTERAZA

Ima nekoliko mogućih baza za klasifikaciju enzima, no nisu sve jednako prikladne. Tako podjela prema kemijskoj prirodi enzima ili njegove prostetske grupe nije prikladna, jer neki enzimi nemaju prostetsku grupu, a kod nekih koji je imaju još je nije moguće identificirati. Isto je tako neprikladna podjela prema kemijskoj prirodi supstrata (da li razgrađuju nukleotide, proteine, ugljikohidrate ili koju drugu grupu spojeva), budući da većina enzima djeluje na nekoliko različitih supstrata, i obratno, da na jedan supstrat djeluje više enzima. Tako, na primjer, i razlike u specifičnosti hidrolaza nisu oštre. Utvrđeno je da neki proteolitski enzimi hidroliziraju karboksilne estere istim mehanizmom kao i same esteraze (1). Zatim, neke esteraze mogu hidrolizirati i derivate amida (2), kiselinske anhidride (3) ili čak fosfatne triestere (4, 5).

Stoga je za današnji stupanj enzimologije najracionalnija baza za klasifikaciju i nomenklaturu enzima vrsta katalizirane kemijske reakcije, kao specifično svojstvo po kojem se enzimi među sobom razlikuju.

Na toj bazi načinili su klasifikaciju *Dixon* i *Webb* (6), podijelivši enzime u 3 glavne grupe: hidrolaze, transferaze i grupu enzima neodređenog karaktera kao što su, na primjer, enzimi koji kataliziraju sinteze vezane na ATP, promjene konfiguracije i neke druge reakcije. Dalja podjela unutar glavnih grupa načinjena je prema tipu veze na kojoj se odvija enzimatska reakcija, a zadnja podjela je prema vrsti supstrata.

Istu bazu za klasifikaciju enzima koristila je i Internacionalna unija za čistu i primijenjenu kemiju (IUPAC) (7). Prema dogovoru, dopuštene su dvije nomenklature: sistematska i trivijalna. Sistematsko ime enzima

formira se u skladu s određenim pravilima i svrha mu je da se enzim što preciznije identificira i da se njegovo djelovanje prikaže u najegzaktnijem obliku. Uz sistematsko ime svaki enzim ima brojčanu oznaku od 4 elementa.

Prvi broj pokazuje u koji od glavnih razreda enzim spada; za razliku od podjele prema *Dixonu* i *Webbu*, po I. U. P. A. C. se enzimi dijele u 6 glavnih grupa: 1. oksidoreduktaze; 2. transferaze; 3. hidrolaze; 4. liaze; 5. izomeraze; 6. ligaze.

Drugi broj označuje tip veze koja se formira (ligaze) odnosno razgrađuje (hidrolaze, liaze), i prirodu grupe koja se prenosi (transferaze) ili podleži oksidaciji (oksidoreduktaze).

Trećim brojem se još detaljnije opisuje reakcija koju određeni enzim katalizira (tako na primjer kod liaza opisuje prirodu uklonjene grupe, a kod transferaza podjelu prema tipovima grupa koje se prenose).

Četvrti broj je serijski broj nekog enzima u zadnjem podrazredu.

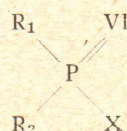
KLASIFIKACIJA HIDROLAZA

Prema klasifikaciji po I. U. P. A. C., glavni razred hidrolaza ima broj 3. Dalje se hidrolaze dijele u 9 prvih podrazreda, odnosno, tipovi veza koje hidrolaze mogu hidrolizirati jesu: esterske (3.1), glikozilne (3.2), cterske (3.3), peptidne (3.4), C-N-veze različite od peptidnih (3.5), kiselinsko-anhidridna veza (3.6), C-C-veze (3.7), halidne veze (3.8) i P-N-veze (3.9).

Treći broj predstavlja oznaku drugog podrazreda i detaljnije opisuje hidroliziranu vezu. Za podrazred esterskih veza 3.1, dalje je podjela ova: 3.1.1 hidrolaze karboksilnih estera, 3.1.2 hidrolaze tiolestera, 3.1.3 hidrolaze fosfornih monoestera, 3.1.4 hidrolaze fosfornih diestera, 3.1.5 hidrolaze trifosfornih monoestera i 3.1.6 hidrolaze sumpornih estera. Pojedine hidrolaze u svakom od navedenih podrazreda nose određeni serijski broj kao četvrtu znamenku brojčanoj oznaci.

Hidrolaze koje razgrađuju organofosforne spojeve

Općenita strukturna formula biološki aktivnih organofosfornih spojeva može se prikazati na ovaj način:



Oznaka VI predstavlja atom iz 6. grupe periodnog sistema, u prvom redu kisik ili sumpor. R_1 i R_2 predstavljaju alkilne, alkoksi- ili amino-grupe, ili, u malom broju slučajeva, aril- ili ariloksi-grupe. Te se grupe smatraju bazičnim supstituentima za razliku od grupa označenih sa X.

X predstavlja najkiseliju grupu u molekuli i naziva se stoga kiselom grupom, a s obzirom na to se i vez $P-X$ smatra *kiselinsko-anhidridnim vezom*, iako bi se u nekim slučajevima (na primjer kod paraoksiona i armina) taj vez trebalo opisati kao esterski. Nomenklatura na osnovu veze $P-X$ opravdava se isključivo činjenicom da upravo o kiselosti grupe X ovise biokemijska svojstva organofosfornih spojeva kao inhibitora i supstrata nekih esteraza (8). Postoji nekoliko organofosfornih spojeva za koje navedena općenita formula ne vrijedi, na primjer etil di-4-nitrofenil fosfat.

Istraživanja enzimatske hidrolize organofosfornih spojeva pokazala su da se razgradnja vrši na mjestu veza $P-X$ (9, 10, 11, 12). Od hidrolaza koje razgrađuju organofosforne spojeve, izričito je prema I. U. P. A. C. klasificiran samo enzim koji razgrađuje DFP (DFP-aza, 3.8.2.1 di-izopropilfosforfluoridat fluorohidrolaza). Ostali enzimi moraju se formalistički smjestiti u druge grupe, iako po biokemijskim svojstvima imaju neke zajedničke karakteristike. Mogućnosti variranja u sastavu supstituenta X , a prema tome i u prirodi veze $P-X$, vrlo su velike. Iz toga izlazi da se klasifikacija enzima koji hidroliziraju organofosforne spojeve treba na osnovu propisa I. U. P. A. C. prilagoditi prirodi supstituenta X . Ako je X halid, tada su to enzimi klasificirani kao 3.8.2 *hidrolaze P-halidnih spojeva*. Anhidridne veze (kao u tetraetil pirofosfatu) razgrađuju 3.6.1 *hidrolaze anhidrida koji sadržavaju fosforilnu grupu*. Dosljedno propisanoj enzimatskoj nomenklaturi, kod triestera fosforne kiseline nije moguće vez $P-X$ tretirati kao vez kiselinskoanhidridnog karaktera. Prema tipu veze koju razgrađuju, enzimi koji hidroliziraju te spojeve spadaju u podrazred 3.1 *hidrolaza esterskih veza*. Međutim, svrstavanje u idući podrazred za sada još nije moguće, jer – iako su hidrolaze mono-estera i di-estera fosfornih kiselina svrstane i označene – podrazred hidrolaza koje hidroliziraju triestere fosfornih kiselina prema I. U. P. A. C. nije predviđen.

Klasifikacija hidrolaza prema tipu veze koju razgrađuju nije jedina moguća klasifikacija tih enzima. Rezultati istraživanja enzimatske razgradnje estera fenola ukazali su na mogućnost podjele hidrolaza na osnovu učinka organofosfornih spojeva, koji su ili supstrati ili inhibitori tih enzima.

Inhibitorsko djelovanje organofosfornih spojeva na neke esteraze opaženo je 1949. godine (13, 14). Značaj tog zapažanja očitovao se tek pošto je Aldridge (4) istraživanjem enzimatske hidrolize p-nitrofenil-acetata, -propionata i -butirata našao da postoje izrazite razlike u specifičnosti tih enzima s obzirom na paraokson kao inhibitor. Na osnovu tih razlika Aldridge je podijelio esteraze na: *A-esteraze*, koje organofosforni spojevi ne inhibiraju i *B-esteraze*, koje su inhibirane već s vrlo niskim koncentracijama (10^{-6} do 10^{-8} M) tih spojeva.

Prioritetni supstrati *A-esteraza* su aromatski esteri, kao na primjer fenilacetat i p-nitrofenilacetat (15), no do određene mjere *A-esteraze* hidroliziraju i neke jednostavne alifatske estere kao etil-kloroacetat (14)

i etil-acetat (4). A-esteraze hidroliziraju estere octene kiseline brže od estera maslačne i propionske kiseline, i ta je činjenica potakla *Aldridgea* da ih označi s *A* (prema acetat).

B-esteraze hidroliziraju tributirin (15, 16) isto tako brzo kao etil-, nitrofenil- i fenil-ester. Za razliku od prve grupe esteraza, *B-esteraze* brže hidroliziraju estere maslačne kiseline od estera octene kiseline.

Kolinesteraze, iako izvanredno osjetljive na organofosforne spojeve, izdvajaju se iz grupe *B-esteraza* zbog svojih specifičnih svojstava. Svi tipovi kolinesteraza hidroliziraju estere kolina brže nego druge estere, ali mogu katalizirati i hidrolizu drugih aromatskih (u vrlo maloj mjeri) i alifatskih estera, dok ni *A-* ni *B-esteraze* ne hidroliziraju estere kolina (17). Kolinesteraze su potpuno inhibirane fizostigminom u vrlo niskim koncentracijama (10^{-5} M i manje) (18), a *A-* i *B-esteraze* su na taj inhibitor rezistentne. Fizostigmin se, međutim, ne može smatrati selektivnim inhibitorom za kolinesteraze, jer je *Augustinsson* (19) našao nekoliko *B-esteraza* koje ne hidroliziraju ester kolina, ali su ipak inhibirane niskim koncentracijama fizostigmina. Takve se esteraze nalaze u plazmi štuke, patke i žabe. Štaviše, plazma kornjače ima esteraze s karakteristikama i kolinesteraza i *B-esteraza*; te esteraze su inhibirane fizostigminom i organofosfornim spojevima, a hidroliziraju uz različite aromatske i alifatske estere i estere kolina.

Podjelu esteraza prema *Aldridgeu* prihvatili su i neki drugi autori koji se bave istraživanjem enzimatske razgradnje organofosfornih spojeva ili njihovih antiesteraznih efekata, bilo u potpunosti ili s nekim modifikacijama. Tako su *Mounter* i *Whittaker* (15) predložili naziv *aromatske esteraze* (arom-esteraze) za *A-esteraze* i *alifatske esteraze* (ali-esteraze) za *B-esteraze*. Naziv *ali-esteraze* potječe još od *Richtera* i *Crofta* (18). Takvu nomenklaturu prihvaća djelomično i *Myers* (20), zadržavajući naziv *A-esteraza* samo za one aromatske esteraze koje nisu inhibirane organofosfornim spojevima nego ih hidroliziraju.

Mendel i suradnici (21) su pokušali proširiti *Aldridgeovu* terminologiju uvođenjem pojma *C-esteraze*. Opazili su da postoje esteraze *B-tipa*, koje su gotovo 100 puta manje osjetljive na diizopropilfluorofosfat (DFP), a razlikuju se i u kinetici inhibicije od *B-esteraza*. *C-esteraze* su isto kao i *B-esteraze* inhibirane organofosfornim spojevima. Razlika je, međutim, u kinetici inhibicije kao i u koncentraciji organofosfornog spoja koja izaziva određeni stupanj inhibicije. DFP inhibira *B-esteraze* u cjelosti pri koncentracijama koje su 2 do 5 puta veće od koncentracija koje su potrebne za 50% (I_{50})-inhibiciju, dok *C-esteraze* ni pri koncentracijama koje su 100 puta veće od I_{50} nisu kompletno inhibirane. Za modelni tip *C-esteraze* predložena je jedna alifatska esteraza mozga štakora, koja je jednakom brzinom hidrolizirala i tributirin i triacetin. Međutim, *Mendel* i suradnici su i sami pokazali (16) da postoji i niz drugih esteraza za hidrolizu alifatskih estera, koje bi u tom slučaju trebale da se uz poseban naziv izdvoje iz grupe esteraza *B-tipa*. Tako, na primjer,

mozak i jetra štakora sadržavaju fizostigmin – rezistentnu esterazu za hidrolizu alifatskih estera, koja odlično hidrolizira triacetin, ali vrlo slabo tributirin. Zbog toga su odustali od naziva C-esteraza i odlučili se za naziv ali-esteraza kad se radi o enzimima koji hidroliziraju jednostavne alifatske estere bez poznate prirodne funkcije.

Naziv C-esteraza ponovno je uveden nekoliko godina kasnije, kad su u toku sistematskih istraživanja hidrolize različitih karboksilnih estera s čišćenim enzimatskim preparatom iz bubrega svinje, *Bergman* i suradnici (22, 23, 24) utvrdili prisutnost esteraze koja niti je inhibirana organofosforinim spojevima niti ih hidrolizira. Budući da te esteraze ni u kojem pogledu nisu slične ni A- ni B-tipu, to su ih autori nazvali C-esteraze. Supstrati te grupe esteraza su neki karboksilni esteri kao diacetin, n-propilkloroacetat i p-nitrofenilacetat (PNPA). Kromatografskom separacijom na DEAE-celuloznoj koloni, *Bergman* i *Segal* su razlučili dva tipa C-esteraza. *C-I tip* ne inhibiraju sulfhidrilni reagensi, a *C-II tip* je inhibiran β -merkaptopropionskom kiselinom i merkaptotetanolom i dolazi vezan uz još jedan neodređeni nativni inhibitor.

Istraživanjem supstrate specifičnosti paraoksonaze, dobivene čišćenjem iz seruma ovce, *Main* (25, 26) je utvrdio prisutnost još jedne esteraze koja je neosjetljiva na inhibiciju organofosforinim spojevima, ali ne hidrolizira paraokson već samo PNPA. U toku čišćenja paraoksonaze, aktivnost prema PNPA pala je približno sedmerostruko, a toga nije bilo u istovrsnim postupcima sa serumima kunića (27), štakora i konja, za koje je *Aldridge* (28) utvrdio da imaju isti enzimski sistem za hidrolizu paraoksona i PNPA. Pokusi termičke inaktivacije su također potvrdili da su u serumu ovce prisutni enzimski sistemi za hidrolizu spomenutih supstrata različiti; pokazalo se da je paraoksonaza mnogo osjetljivija na denaturaciju povišenom temperaturom. Za razliku od C-esteraza, enzim koji hidrolizira PNPA ne razgrađuje kratkočlane alifatske estere, a inhibiran je s vrlo niskim koncentracijama (0.4 mM) p-kloromerkuri-benzojeve kiseline (p-CMB), koje na C-esteraze nemaju nikakav inhibitorski učinak, a hidrolizu paraoksona inhibiraju tek slabo. S obzirom na spomenute razlike sa A-, B- i C-esterazama, *Main* je predložio da se esteraza seruma ovce, koja hidrolizira PNPA, u smislu *Aldridgeove* terminologije označi kao *D-esteraza*. Takva esteraza je vrlo vjerojatno prisutna i u bubregu svinje, jer bubrežni homogenat vrlo slabo hidrolizira paraokson, a pokazuje izrazito visoku aktivnost prema PNPA (26, 29).

Da bi izdvojili aktivni protein i odredili mu biokemijske karakteristike, više je autora primijenilo elektroforetske metode (5, 30, 31, 32).

Opširna istraživanja te vrste o različitim oblicima esteraza plazme kralješnjaka vršili su *Augustinsson* i suradnici (19, 31, 32, 33, 34). Podaci pokusa na 27 različitih životinjskih vrsta pokazuju da svaka vrsta ima svoj tipični sklop esteraza plazme, te da unutar svake vrste postoje različiti oblici esteraznih tipova (34). Istraživanja su vršena na plazmi velikog broja životinja i elektroforetski su separirani pojedini proteini – nosioci esteraznih aktivnosti. Svaka aktivna frakcija bila je zasebno istra-

živana s obzirom na supstratnu specifičnost i inhibiciju selektivnim inhibitorima. Na osnovu elektroforetske pokretljivosti izdvojena su tri tipa esteraza plazme. Utvrđeno je da neke plazme sadržavaju sva tri tipa esteraza, neke dva, a neke samo jedan. Nazivi pojedinih esteraznih grupa, prema riječima autora, nisu dani s namjerom uvođenja neke nove terminologije, već samo kao oznaka za pojedine elektroforetske frakcije. Osnovne karakteristike elektroforetski separiranih grupa esteraza su ove:

Arilesteraze (ArE) su tipične aromatske esteraze (alifatske estere hidroliziraju u zanemarljivoj mjeri), i imaju veliku elektroforetsku pokretljivost, te migriraju s albuminima. One imaju sve karakteristike A-esteraza i tipični su enzimi za plazmu sisavaca. Plazme ostalih ispitivanih kralješnjaka, tj. amfibija, reptilija i ribe, ih nemaju.

Alifatske esteraze (AliE) su elektroforetski slabije pokretljive od ArE (izuzetak je plazma jegulje), a nalaze se u α_1 -globulinskoj frakciji ili blizu nje. Ta esteraza predstavlja glavnu esteraznu vrstu u plazmama nižih kralješnjaka. Nema je u plazmi čovjeka, majmuna, psa i svinje, a prisutnost u plazmi preživača i kokoši je sporna. Izrazito velike koncentracije utvrđene su u plazmi riba. Sva svojstva su u skladu s definicijom B-esteraze.

Kolinesteraze (ChE). Uz već spomenute karakteristike (inhibicija organofosforinim spojevima i fizostigminom, hidroliza estera kolina), mogućnost odvajanja elektroforezom samo je dokaz više da se kolinesteraze mogu smatrati zasebnom grupom esteraza. Kolinesteraze su elektroforetski najsporije (izuzetak je plazma žabe) i nalaze se između α_2 - i β -globulinske frakcije.

A - ESTERAZE

Grupa A-esteraza je od naročitog interesa, jer uključuje brojne enzime koji ne samo da nisu inhibirani organofosforinim spojevima, već imaju specifična svojstva da ih hidrolitski razgrađuju (10, 28). S obzirom na antikolinesteraznu aktivnost organofosforinim spojeva, postojanje takvih enzima od velikog je značenja. Prirodni supstrati i fiziološke funkcije tih enzima nepoznati su. Do sada izvršena istraživanja pridonijela su otkrivanju kompleksnosti distribucije i ukazala na veliko podudaranje u specifičnostima. Dosljedno tome, za te esteraze ne postoji neka određena shema naziva. Zbog prikladnosti, mnogi autori su pojedine enzime te grupe nazivali prema sintetskim supstratima koje su hidrolizirali. Tako su u literaturu uvedena imena kao: sarinaza, tabunaza ili dialkilfluorofosfataza, no ti termini nemaju poželjnu suoznaku za specifičnost i funkciju kakva se traži u enzimatskoj nomenklaturi. Mnogo se upotrebljava i naziv *fosforilfosfataza* predložen od *Augustinssona* (35), budući da te esteraze hidroliziraju spojeve karakterizirane fosforilnom (PO)-grupom i različitim organskim supstituentima.

Prema današnjem shvaćanju esteraza i fosfataza, svi su navedeni nazivi nekorektni, jer te esteraze, uglavnom, ne razaraju esterske veze uz stvaranje anorganskog fosfata i alkohola niti su specifične za vezu *P-F* (36).

Budući da s biokemijskog stajališta ti enzimi predstavljaju definiranu cjelinu, to je njihovo svrstavanje u zasebnu grupu prema podjeli esteraza u *A-* i *B-*esteraze, koju je predložio *Aldridge* (4), a proširili neki drugi istraživači (22, 25), vrlo prikladno.

Distribucija A-esteraza

Dosadašnje znanje o *A-*esterazama nedovoljno je za kompletno tabelliranje njihovih supstratnih specifičnosti, svojstava i distribucije. Detaljnija istraživanja enzimske razgradnje DFP-a, tabuna (etil *N,N* dimetilamido-cijanofosfat) i paraoksona te niza njihovih derivata, ukazala su na veliku rasprostranjenost *A-*esteraza u različitim biološkim izvorima

Tablica 1.
Popis enzimskih preparata koji hidroliziraju DFP, tabun i paraokson (8)

Spoj	Izvor enzima
DFP	Kunić: 8 organa (39); svinja: jetra i bubreg (40, 41); čovjek: 8 organa (39, 40); štakor: 12 organa (40); mačka: 9 organa; zamorac: 9 organa; golub: 7 organa; kornjača: 5 organa (40); 14 različitih mikroorganizama (40); serumi čovjeka (39, 40); kunića (10) i zamorca (5) te eritrociti čovjeka (39).
Paraokson	Štakor: 5 organa; kunić: 12 organa (28); jetre zamorca (42); pčela: glava i abdomen; živčani splet žohara (43); serumi štakora (44), zamorca, kunića, ovce, koze, čovjeka, konja, miša i afričkog tvora (28); sadržaj govedeg buraga (45).
Tabun	Kunić: 12 organa; krava, svinja i štakor, od svakog po 2 organa; jetre mačke i majmuna (35, 38); serumi kunića, čovjeka, psa, konja, štakora, mačke, krave i zamorca (35).

(tablica 1). S obzirom na specifičnost, pri tom su uočene nesumnjive razlike; serum kunića, na primjer, hidrolizira paraokson, a homogenat svinjske jetre ga ne hidrolizira. Enzimi sličnih izvora različitih vrsta također se razlikuju u supstratnoj specifičnosti. Tako je 3-dietoksifosfinil-oksi-metilkinolinium jodid hidroliziran serumom čovjeka, ali ne serumom kunića (37). Sarin (izopropilmetil fluorofosfat) i tabun razgrađuju isti enzimi, no različitim relativnim brzinama, već s obzirom na organ iz kojeg je enzim prepariran (38).

Dosad je svega nekoliko vrsta A-esteraza, vezanih na hidrolizu DFP-a, tabuna, paraoksona i djelomično sarina, detaljnije istraženo. U iduća dva potpoglavlja dan je pregled literature radova s tog područja.

A-esteraze seruma

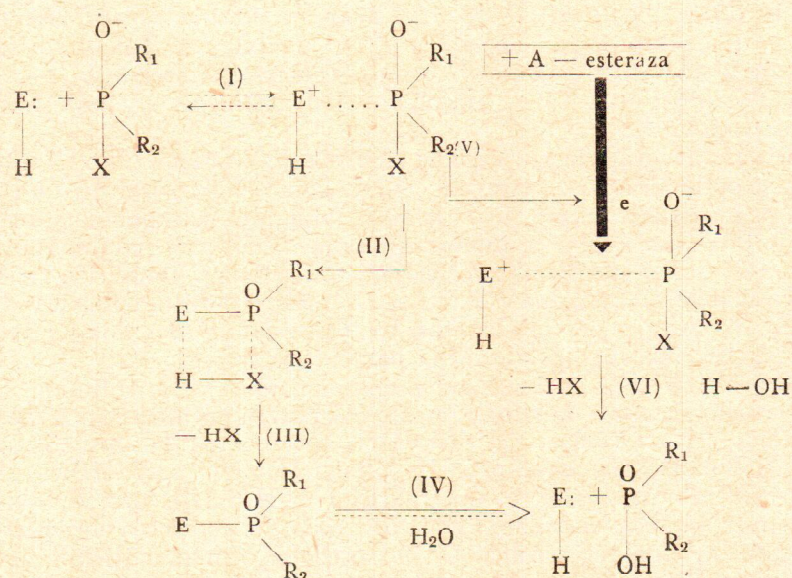
Prvi opis enzimske hidrolize jednog organofosfornog spoja (DFP) serumom publicirao je Mazur 1946. god. (11). Istraživanjem enzimske razgradnje DFP-a utvrdio je da se brzine hidrolize serumima pojedinih životinjskih vrsta razlikuju i opazio da su enzimi seruma različiti od enzima tkiva. Upotpuniti i proširiti svoja zapažanja Mazur više nije imao prilike; u tome ga je spriječio drugi svjetski rat. Tako su istraživanja te vrste nastavljena tek pet godina nakon Mazurova otkrića, radovima Aldridgea (28, 46) o hidrolizi jednoga drugog organofosfornog spoja, paraoksona.

Enzimska razgradnja paraoksona istražena je vrlo temeljito. Utvrđeno je da se optimalni pH za esterazu seruma kunića nalazi između 7.4 i 7.6. U tri primijenjena pufera, fosfatnom, boratnom i bikarbonatnom, aktivnost je bila ista. Enzim je inhibiran teškim metalima i tiolnim reagensima, naročito *p*-kloromerkuribenzojevom kiselinom. Inhibicija tiolnih reagensima je reverzibilna i aktivnost se može vratiti dodatkom tiolnih spojeva, na primjer cisteina i glutationa. Fizostigmin, jak inhibitor kolinesteraze, bez ikakvog je učinka na paraoksonazu.

Postupak čišćenja enzimatskog preparata amonijevim sulfatom, koji daje odlične rezultate za kolinesterazu, pokazao se potpuno neprikladnim pri čišćenju paraoksonaze (28). Međutim, metodom frakcioniranog taloženja etanolom, metodom broj 10, prema Cohnu i suradnicima (47), može se u uzorku koji odgovara frakciji I + II + III (uzorak dobiven taloženjem sa 19% etanolom uz pH 5.8) naći 2.8 puta veća aktivnost od aktivnosti originalnog seruma. Od 9 istraženih seruma različitih životinja (tablica 1), najvišu aktivnost ima serum kunića; ona je približno 16 puta veća od aktivnosti paraoksonaze bilo kojega drugog istraženog seruma.

Na serumu kunića, kao najbogatijem izvoru A-esteraza, testirani su i neki drugi organofosforni spojevi. U nizu publikacija, Augustinsson i suradnici (9, 35, 48, 49) opisuju rezultate istraživanja enzimske razgradnje nekih organofosfornih antikolinesteraza, primjenjujući u prvom redu tabun kao supstrat. Rezultati su ih naveli na misao da bi prisutnost esteraza koje razgrađuju toksične organofosforne spojeve mogla biti od velikog značaja za proces detoksikacije *in vivo*. Reakcioni produkti nastali enzimskom razgradnjom tabuna *in vitro*, u dobivenim su koncentracijama biološki inaktivni. Toksikološko djelovanje organofosfornih spojeva na organizam je stoga u prisutnosti takvih enzima smanjeno. Osim toga, A-esteraze dodane *in vitro* reaktiviraju kolinestrazu inhibiranu tabunom (50). Autor dopušta mogućnost da je ta reakcija možda odgovorna za oporavljanje normalne kolinesterazne aktivnosti u organizmu zatrovanom organofosfornim spojem. Istraživanje učinka A-este-

raze dodane fosforiliranoj kolinesterazi *in vitro* (51) pokazalo je da ne dolazi do pravog reaktivirajućeg efekta, već da se progresivna inaktivacija zaustavlja, ako se esteraza doda prije nego što je postignut maksimum inaktivacije kolinesteraze. Prema pretpostavci, A-esteraza reagira s primarnim adicionim kompleksom kolinesteraze i organofosfornog spoja, hidrolizirajući ga uz oslobađanje odgovarajuće kiseline (HCN u slučaju tabuna), fosforne kiseline i aktivne kolinesteraze. Slijed reakcija fosforiliranja kolinesteraze (52, 53, 57) i interferiranja A-esteraza (51) može se prikazati ovom reakcionom shemom:



Organofosforni spoj se veže na estersku stranu enzima (EH) i tako stvara kompleks (I). Taj kompleks može: 1. disociirati na enzim i slobodni organofosforni spoj, ili 2. oslobađanjem kiseline HX dati fosforilirani enzim (II, III). Fosforilirani enzim može reagirati s vodom (IV); pri tom se enzim opet oslobađa u aktivnoj formi, ali ta reakcija defosforilacije je za većinu fosforinih spojeva vrlo polagana u usporedbi s reakcijama (I), (II) i (III). Isto tako može slobodni enzim nastati ako se kompleksu doda A-esteraza (ϵ), koja uzrokuje cijepanje veze $E-P$ uz istodobnu hidrolizu veze $P-X$ (V).

Efekt A-esteraze ovisi o vremenu koje je proteklo od kontakta organofosfornog spoja s kolinesterazom i o supstituentima u molekuli organofosfornog spoja.

Postavilo se također pitanje, jesu li esteraze koje hidroliziraju istraživane organofosforne spojeve: paraokson, tabun i DFP, istovetne ili se radi o različitim enzimima. Tako se na osnovu omjera aktivnosti prema

paraoksonu i *DFP*-u moglo zaključiti da su oba supstrata hidrolizirana istim enzimom (27). Međutim, eksperimenti s čistim preparatom paraoksonaze seruma kunića i plazme čovjeka (49) omogućili su razdvajanje esteraznih aktivnosti. Testiranje čišćenjem dobivenih frakcija pokazalo je da su najviše aktivnosti za supstrate *DFP* i paraokson prisutne u globulinskoj frakciji IV-1. Ali, dok *DFP* razgrađuje u manjoj mjeri i neke druge frakcije, paraokson je hidroliziran isključivo frakcijom IV-1, a to je jak dokaz neistovetnosti paraoksonaze i *DFP*-aze.

Na osnovu analognih istraživanja hidrolize tabuna, *Augustinsson* i *Heimbürger* (49) su pretpostavili da razgradnju tabuna i *DFP*-a vrši jedna te ista esteraza. Rezultati mjerenja brzine djelovanja enzima na smjesu supstrata također su išli u prilog toj pretpostavci (51). Pokazalo se, međutim, da ioni Sr^{2+} predstavljaju izrazite aktivatore hidrolize tabuna enzimom seruma, a istovremeno inhibiraju serumsku *DFP*-azu.

Main (25, 26) je u svojim radovima dao dokaz neistovetnosti enzima za hidrolizu tabuna i paraoksone. Primjenom modificirane metode broj 6 za čišćenje enzima seruma po *Cohnu* i suradnicima (47), *Main* je iz seruma ovce pripravio 300 puta čistiji preparat paraoksonaze. Mjerenjem enzimskih aktivnosti u pojedinim frakcijama u toku čišćenja, utvrdio je da je samo dio hidrolize tabuna vezan za hidrolizu paraoksone, dok je drugim dijelom razgradnja tabuna posljedica djelovanja zasebnog enzima, koji se čišćenjem odvajaju i koji je identičan s enzimom za hidrolizu tabuna što ga je opisao *Augustinsson* (49).

Vrlo je vjerojatno da isti enzim razara i tabun i sarin. Istraživanjem specifičnosti esteraza s obzirom na tabun i sarin, *Adie* i *Tuba* (54) su našli da u plazmi 6 različitih sisavaca odnos aktivnosti sarin/tabun pokazuje zanemarljive varijacije. Primjenom *Cohnove* metode frakcioniranog taloženja i ultracentrifugiranjem, *Adie* (55) je pripravio frakciju koja je sarin hidrolizirala 1000 puta brže po jedinici težine proteina od originalne plazme vola. U toku svih stadija čišćenja, omjer aktivnosti sarin/tabun bio je konstantan. Obje esterazne aktivnosti imale su istu termostabilnost i slične energije aktivacije (sarin: 13.200 cal/mol, tabun: 14.600 cal/mol). Iz toga izlazi da s mnogo vjerojatnosti isti enzim u serumu razgrađuje oba supstrata.

A-esteraze tkiva

Nakon originalnog zapažanja da 10^{-2} M otopina *DFP*-a u prisutnosti tkivnog ekstrakta uzrokuje značajnije oslobođenje CO_2 iz bikarbonatnog medija, *Mazur* (11) je pokušao precipitacijom s etanolom izdvojiti i očistiti enzim odgovoran za hidrolizu *DFP*-a. Kao izvor poslužio mu je homogenat bubrega kunića. Dobivena enzimatska preparacija pokazivala je približno 13 puta višu aktivnost od ishodnog homogenata i bila inhibirana već vrlo niskim koncentracijama teških metala, naročito Cu^{2+} i Hg^{2+} . Mjerenja aktivnosti s homogenatima tkiva čovjeka i kunića pokazala su da aktivnosti padaju ovim redom: jetra, bubreg, tanko crijevo, plazma, pluća, srce, mozak, mišić i eritrociti.

Nekoliko godina kasnije, *Mounter, Floyd i Chanutin* (56) također su koristili bubreg kunića kao izvor za pripravu čišćene DFP-aze. Njihova enzimatska preparacija bila je 50% aktivnija od originalnog ekstrakta. Koristeći tako priređenu preparaciju enzima za studij svojstava i specifičnosti, autori su zapazili da, iako je većina divalentnih i trivalentnih metala inhibirala hidrolizu DFP-a, u suglasnosti s rezultatima istraživanja *Mazura*, ioni Mn^{2+} i Co^{2+} pokazali su izrazito aktivirajući efekt (koncentracija od 10^{-3} M uzrokovala je četverostruku aktivaciju), a isto tako i ioni Mg^{2+} , no u mnogo manjoj mjeri. Aktivatorsko djelovanje spomenutih kationa ispitali su *Mounter, Dien i Chanutin* (40) na nizu tkiva različitih životinjskih vrsta, tako: čovjeka, štakora, mačke, zamorca, svinje i goluba. Pri tom su DFP-aze nekih tkiva bile jače aktivirane Co^{2+} (na primjer slezena i jetra čovjeka), a druge opet Mn^{2+} (bubreg čovjeka i bubreg te jetra mačke). Prema tome je vrlo vjerojatno da je u hidrolizu DFP-a u istraživanim tkivima uključeno više različitih enzima.

Detaljnijim istraživanjem bubrega i jetre štakora i svinje *Mounter* (57) je uspio separirati tri različite enzimatske preparacije različitih svojstava (tablica 2). Povrh toga su zapažene i razlike između vrsta. Tako je omjer aktivnosti prema *n*-butil analogu DFP-a, diizobutilfluorofosfatu (DBFP), i DFP-u s enzimatskom preparacijom bubrega svinje 1.3, a oko 1.0 za enzim bubrega štakora. Neka vrlo mala količina netopljivog enzima utvrđena je i u bubregu obiju istraživanih vrsta.

Tablica 2.

Svojstva preparacija A-esteraza dobivenih čišćenjem iz jetre i bubrega svinje i štakora

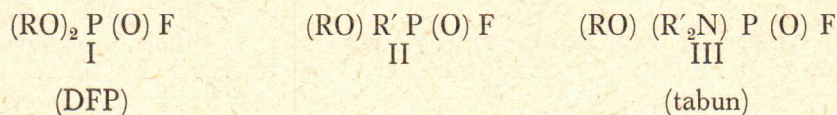
Organ	A-esteraza	Aktivirana	Inhibirana	Supstrat
Bubreg . . .	topljivi enzim	Co^{2+} Mn^{2+} naročito uz dipiridil	—	DFP i DBFP hidrolizirani jednakom brzinom
Jetra	„	Co^{2+} Mn^{2+} dipiridil bez efekta	—	„
Jetra	netopljivi enzim	Ca^{2+} dipiridil bez efekta	Co^{2+} Mn^{2+}	DFP i DBFP hidrolizirani u omjeru 1 : 10

DBFP = diizobutilfluorofosfat

Serijska frakcija bubrega svinje (58) hidrolizirala je i N-acetil derivate leucina, metionina i alanina. U usporedbi s hidrolizom DFP-a, aktivnosti su se slično ponašale u odnosu na učinak metalnih iona i povišenih temperatura te imale sličan pH-optimum. I eksperimenti s miješanim supstratima ukazivali su na mogućnost da se radi o jednom enzimu. Na osnovu

toga, *Mounter* je pretpostavio da je normalna funkcija DFP-aze hidroliza i sinteza derivata aminokiselina. Međutim, *Cohen* i *Warringa* (59) su *Mounterovu* preparaciju bubrega svinje podvrgli elektroforezi i dobili 4 puta čišći preparat, koji više nije pokazivao aktivnost prema acetiliranim aminokiselinama. Sva ostala svojstva su se, međutim, podudarala sa svojstvima enzima što ga je opisao *Mounter*. Time je dokazano da je *Mounterova* pretpostavka o prirodi DFP-aze bila preuranjena i da je aktivnost njegove preparacije prema aminokiselinama rezultat onečišćenja.

Ispitivanjem supstrate specifičnosti čišćene preparacije DFP-aze, *Cohen* i *Warringa* (59) su zaključili da taj enzim hidrolizira supstrate s općom formulom prema jednom od ova tri tipa:



Spojivi tipa *I* i *III* hidrolizirani su brže uz dodatak Mn^{2+} , a kod spojeva tipa *II* dodatak je tog metalnog iona bez efekta. Neki od istraženih spojeva formule tipa *I* ili *II* hidrolizirani su čak i brže od DFP-a.

Studij distribucije DFP-aze upotpunjen je istraživanjem enzimatske aktivnosti brojnih vrsta mikroorganizama (60, 61). Najviša aktivnost izmjerena je u gramnegativnim organizmima, a efekti Mn^{2+} , Co^{2+} i Mg^{2+} ispitani na različitim preparacijama, ukazuju na mogućnost razlika u enzimatskom sastavu pojedinih vrsta. Aktivatori DFP-aze iz brojnih tkiva kralješnjaka, 2,2'-dipiridil i histidin, bez učinka su na aktivnost DFP-aze velikog broja istraženih mikroorganizama.

Rezultati enzimatske hidrolize *tabuna* homogenatom bubrega svinje u prisutnosti niza različitih metala (50, 62) pokazali su da je enzim bubrega, za razliku do serumskog enzima, inhibiran ionima Sr^{2+} i Ba^{2+} , ali aktiviran ionima Mn^{2+} i Co^{2+} . Od istraženih metalnih iona ispoljili su najjači inhibitorški učinak Ag^{2+} ioni te kationi metala: Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} i Hg^{2+} .

Uspoređivanjem enzimskih aktivnosti homogenata nekih tkiva različitih vrsta sisavaca prema DFP-u i *tabunu* *Augustinsson* i *Heimbürger* (35) su pretpostavili da postoji neka vjerojatnost za istovetnost esteraza koje hidroliziraju spomenute supstrate. Ali je dalja obrada njihovih rezultata (63) pokazala da je takva vjerojatnost zaista mala; odnos aktivnosti *tabun*/DFP, koji su dobili za nadbubrežne žlijezde svinje i krave, bio je približno jednak (iznosi 1.6), dok je takav omjer za bubrege istih životinja pokazivao velike razlike (za kravu 2.5 a za svinju 0.89). Postoji samo ta mogućnost da je isti enzim, odnosno mješavina enzima prisutna u istraženim nadbubrežnim žlijezdama, a sigurno je da su enzimi koji hidroliziraju *tabun* i DFP u ostalim homogenatima različiti.

Enzimatsku hidrolizu *sarina* u tkivima nekih sisavaca istraživali su *Adie* i *Tuba* (54, 55). Pri tom nisu koristili samo kompletne homogenate

tkiva već i celularne komponente jetre i bubrega kunića, zamorca, majmuna, miša i štakora. Utvrdili su da enzimi koji hidroliziraju sarin nisu ograničeni na jedan dio stanice već se nalaze u svim staničnim frakcijama, ali u različitim količinama, ovisno o animalnoj vrsti i organu. Aktivnost pojedinih frakcija pada ovim redom: supernatant, mikrosomi, mitohondrija i nuklei. Odnos aktivnosti pojedinih frakcija prema sarinu je približno: 65 : 20 : 10 : 5.

Mjerenje enzimatske hidrolize *tabuna* i *sarina* homogenatima tkiva 6 različitih sisavaca pokazalo je statistički značajne varijacije u omjeru esteraznih aktivnosti za te supstrate. Omjer aktivnosti sarin/tabun varirao je od 0.9 ± 0.1 za mozak kunića, do 4.8 ± 0.02 za jetru štakora. Ti rezultati izrazito ukazuju na neistovetnost esteraza koje hidroliziraju spomcnute supstrate. Nasuprot tome, kod frakcija majmunskih organa, procentualno izražene aktivnosti za sarin bile su jednake vrijednostima za tabun, a to opet pokazuje da su oba supstrata hidrolizirana istim enzimom. Stoga pitanje istovetnosti esteraza tkiva koje hidroliziraju sarin i tabun ostaje još neriješeno.

Uz vrlo opširna istraživanja svojstava paraoksonaze seruma *Aldridge* (28) je mjerio i brzine enzimatske hidrolize *paraoksona* homogenatima različitih tkiva kunića i štakora. Od organa štakora najvišu aktivnost pokazuje jetra, a zatim slezena, bubreg, srce i mišić. Takav redoslijed pada aktivnosti prema paraoksonu u organima štakora razlikuje se od pada aktivnosti prema DFP-u (4): jetra, bubreg, testis, mozak, srce, pluća i slezena. Aktivnosti organa kunića, izuzevši serum s kudikamo najvišim sadržajem paraoksonaze, padaju ovim redom: jetra, srce, bubreg, slezena i mišić.

Zajedničke karakteristike A-esteraza

Efekt SH-reagensa. Sulfhidrilni reagensi su vrlo prikladni selektivni inhibitori A-esteraza, budući da su kolinesteraze i B-esteraze rezistentne na one koncentracije tih spojeva koje uzrokuju najmanje 50%-inhibiciju A-esteraza. Ali, svi sulfhidrilni reagensi nisu jednako jaki inhibitori. Najdjelotvorniji su oni koji stvaraju merkaptide, na primjer *p*-merkuri-benzojeva kiselina, dok ostali, kao jodacetamid i jodbenzoat, imaju vrlo nizak inhibitoryni efekt. Inhibirani enzim se može reaktivirati dodatkom cisteina ili reduciranog glutationa (34, 64).

Djelovanje Ca^{2+} i nekih metalnih iona. Ca^{2+} i metalni ioni mogu na A-esteraze djelovati bilo kao aktivatori ili kao inhibitori. *Erdös, Debay* i *Westerman* (65) su našli da EDTA dodan uzorcima krvi radi sprečavanja koagulacije inhibira aktivnost A-esteraza, a na kolinesteraze i B-esteraze nema učinka. *Augustinsson* (34) je također došao do zaključka da je normalna aktivnost i stabilnost A-esteraza ovisna o prisustvu Ca^{2+} . Dijalizom prema destiliranoj vodi mnogi od istraživanih enzima gube aktivnost, koju je moguće reaktivirati dodatkom kalcija dijalizatu. Mg^{2+} je, naprotiv, inhibirao aktivnost A-esteraza, a to je suprotno efektima

tog metala na B-esteraze i kolinesteraze. Ioni Na^+ u visokim koncentracijama također umanjuju aktivnost A-esteraza.

Kationi teških metala kao: Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} i Pd^{2+} jaki su inhibitori A-esteraza; koncentracije koje uzrokuju 50% inhibiciju (I_{50} vrijednosti) kreću se u rasponu od 10^{-4} do 10^{-6} M (56). Osjetljivost enzima na testirane ione varira u izvjesnoj mjeri od seruma do seruma unutar iste vrste (65).

Izrazito jaki inhibitori nekih A-esteraza su soli rijetkih zemalja. Njihove I_{50} vrijednosti su niske i uz fenil-acetat kao supstrat nalaze se unutar 10^{-7} do 10^{-8} M. *Augustinsson* (34) je pokazao da se A-esteraze različitih vrsta razlikuju u svojoj osjetljivosti prema La^{3+} . Primjenom različitih koncentracija nitrata lantana, utvrdio je da su u nekim preparacijama (serum čovjeka, psa, krave i konja) prisutne dvije različite A-esteraze. Jedna je potpuno inhibirana koncentracijama La^{3+} od $5 \cdot 10^{-5}$ M, dok je s tom istom koncentracijom druga A-esteraza inhibirana svega 50%.

Istraživanja aktivatora (66) pokazala su da su najefektivniji derivati piridina i imidazola i da je za optimalno aktivatorsko djelovanje potrebna prisutnost Mn^{2+} . *Mounter* i *Chanutin* (29) smatraju da se kod aktivacije enzima stvara kompleks između metalnog iona i grupa u proteinskoj molekuli. Dodatak kelatogenih agensa može spriječiti aktivatorski učinak, ako formiraju stabilnije komplekse s metalnim ionom od enzima. Moguće je da i metalni ion aktivatorskih osobina, kao što je Mn^{2+} , istisnu iz kompleksa metalni ioni većeg afiniteta, koji, međutim, s enzimom tvore inaktivni kompleks.

Cohen i *Warringa* (59) su isto tako uvrđili da su 2,2'-dipiridil i Mn^{2+} aktivatori. Pri daljoj separaciji *Mounterove* frakcije bubrega kunića elektroforezom uspjeli su izdvojiti i dvije do tada nepoznate komponente, koje su označili sa *G* i *U*. Pokazalo se da te komponente predstavljaju snažne prirodne aktivatore DFP-aze, osobito uz dodatak Mn^{2+} .

Izuzetan slučaj predstavljaju neki metalni ioni, koji su za jednu grupu A-esteraza jaki aktivatori, dok aktivnost drugih esteraza inhibiraju (49). Tako su ioni Mn^{2+} i Co^{2+} aktivatori A-esteraza bubrežnog tkiva, a inhibiraju A-esteraze seruma. Nasuprot tome, Sr^{2+} i Ba^{2+} aktiviraju esteraze seruma, ali na esteraze tkiva djeluju kao inhibitori.

Inhibitorski efekt Mn^{2+} i Co^{2+} ovisi i o supstratu. Brzina hidrolize tabuna i DFP-a je u prisutnosti spomenutih metalnih iona povećana 10 do 30 puta, a brzina hidrolize sarina i njegovih homologa samo slabo ili je u nekim slučajevima, štaviše, smanjena (57).

Stereospecifičnost A-esteraza. Neke A-esteraze seruma i tkiva pokazuju stereospecifičnost prema nekim organofosfornim spojevima. *Hoskin* i *Trick* (67) su pokazali da serum štakora hidrolizira toksični dekstrogirni izomer tabuna mnogo brže nego netoksični levogirni izomer. U jednoj od svojih studija *Augustinsson* je opisao da su neke A-esteraze tkiva za tabun izrazito stereospecifične. Ako se tabun doda u bikarbonatnom mediju A-esterazi bubrega svinje, polovina ekvivalentne količine

izluči se vrlo brzo, a ostatak tek sporo. Isto se ponavlja dodatkom novih količina tabuna. *Hoskin* i *Trick* (67) su utvrdili da u toku brze faze hidrolize otopina postaje levogirna, a onda polagano prelazi u optički neutralnu, indicirajući time da je D-izomer tabuna manje stabilan.

Stereospecifičnost A-esteraza ovisi i o izvoru enzima i o organofosforom spoju koji se istražuje. Tako plazma štakora pokazuje izrazitu stereospecifičnost prema tabunu, plazma kunića mnogo manju, a plazma čovjeka nikakvu. Za tabun je A-esteraza bubrega svinje visoko specifična, a esteraza jetre pokazuje tek umjerenu stereospecifičnost. Za razliku od tabuna, kod hidrolize sarina enzim ili uopće ne diferencira dva optička izomera ili ih diferencira tako malo da se brzine hidrolize ne mogu odijeliti. Stoga, iako postoje svi preduvjeti za to, stereospecifičnost za sarin nije uopće izražena (69).

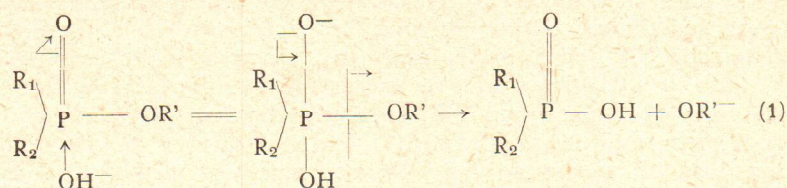
MEHANIZAM DJELOVANJA

Godine 1913. *Michaelis* i *Menten* (70) su postavili hipotezu o nastajanju kompleksa između enzima i supstrata u toku enzimske reakcije. Na osnovu te pretpostavke izvedene su sve jednadžbe za funkcionalnu zavisnost brzine reakcije od koncentracije supstrata. Iako su tako teoretski dobivene jednadžbe vrlo dobro odgovarale eksperimentalno dobivenim rezultatima, izravna potvrda ispravnosti pretpostavke o stvaranju kompleksa supstrat-enzim dobivena je tek dokazivanjem postojanja kompleksa između vodikova peroksida i peroksidaze (71) te peroksida i katalaze (72).

Nasuprot anorganskim katalizatorima, enzimi imaju visok stupanj specifičnosti. Već 1894. godine, na osnovu proučavanja djelovanja esteraza na glukozide, *Emil Fischer* uvodi u enzimologiju i danas aktuelnu usporedbu o »bravi i ključu«. Njegova koncepcija proširena je na većinu enzimatskih sistema, iako ne u smislu apsolutne specifičnosti, jer je ona vrlo rijetka. Mnogo je češće da enzim katalizira jedan određeni tip reakcija kod različitih, ali strukturno sličnih supstrata i pri tome je osnovni preduvjet da molekula supstrata dobro pristaje uz aktivni centar enzima. Budući da enzimi pokazuju izrazitu specifičnost s obzirom na inhibitore, pretpostavlja se da i u reakcijama inhibicije dolazi do stvaranja kompleksa enzima s inhibitorom, slično onima sa supstratom. Smatra se, stoga, da nema principijelne razlike između supstrata i inhibitora u načinu vezanja na enzim.

Uspriko brojnim radovima na području hidrolize fosfatnih estera, mehanizam enzimatske hidrolize još uvijek nije riješen. *Augustinsson* i *Heimbürger* (9) zastupaju mišljenje da se enzimatska hidroliza organofosfornih spojeva odvija reakcionim mehanizmom sličnim neenzimatskoj hidrolizi fosfornih estera kataliziranoj bazom.

Rezultati niza istraživanja *neenzimatske hidrolize* organofosfornih estera (73, 74) pokazali su da se P-X-vez najbrže hidrolizira katalitičkim posredovanjem OH⁻-iona. Reakcija se odvija zamjenom radikala X nukleofilnom OH⁻-grupom; to se može prikazati na ovaj način:

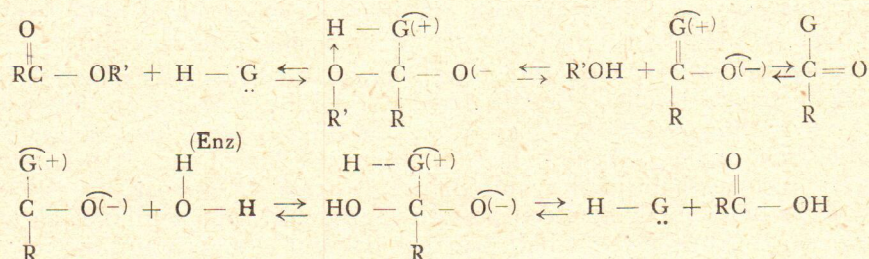


Reakcija je bimolekularna i brzina je proporcionalna koncentracijama obaju reaktanata:

$$\text{brzina} = k [(\text{RO})_2 \cdot \text{P}(\text{O}) \text{X}] [\text{OH}^-] \quad (2)$$

Prema navedenim karakteristikama, neenzimska bazna hidroliza organofosfornih estera je tip S_N2 reakcije. Iako je sistem klasifikacije za nukleofilnu supstituciju, predložen od *Ingolda* i suradnika (75), zamišljen kao sistem potpuno općenitog karaktera, neki autori (76) smatraju da takvu terminologiju treba izbjegavati kad se govori o fosfornim esterima, jer neki detalji vrijede samo za S_N2 reakcije na zasićenom ugljikovu atomu, a ne i za spojeve fosfora.

Kinetika enzimatske hidrolize fosfatnih estera bila bi, prema tome, reakcija dvostruke izmjene i njezin bi se mehanizam principijelno podudarao s mehanizmom djelovanja karboksilnih esteraza, kakav su, konkretno, *Wilson* i suradnici (77) utvrdili za hidrolizu acetilkolina acetilkolinesterazom:



Da li je mehanizam djelovanja A-esteraza zaista sličan ili pak različit od onog za B- i kolinesteraze, danas se još ne može sigurno utvrditi. *Mounter* (57) smatra da je aktivni centar A-esteraza vrlo vjerojatno drugačiji od aktivnog centra karboksilnih esteraza, budući da su A-esteraze, za razliku od ostalih esteraza, inhibirane kelatogenim supstancijama a aktivirane kalcijem. Kao tipični SH-enzimi, A-esteraze su najmanje 50% inhibirane koncentracijama tiolnih reagensa na koje su

kolinesteraze i B-esteraze potpuno rezistentne. *Augustinsson* (34) smatra da enzimatska hidroliza katalizirana A-esterazama uključuje vezivanje supstrata na SH-grupu aktivnog centra enzima, na isti način kao što se to dešava sa OH-grupama u aktivnom centru karboksilnih estera. Kako se aktivnost A-esteraza inhibiranih sulfhidrilnim reagensima može reaktivirati dodatkom cisteina, to *Augustinsson* pretpostavlja da cisteinska SH-grupa može imati istu ulogu u mehanizmu A-esteraza kao što je OH-grupa ima za kolinesteraze i B-esteraze. Tim mehanizmom moglo bi se ujedno objasniti zašto neki spojevi služe kao supstrat A-esterazama i ne inhibiraju ih. Poznato je da se P-S-veza mnogo lakše hidroliza od P-O-veze (78). Prema tome, fosforilirana, a vjerojatno i karbamoilirana A-esteraza znatno brže predaje acilni ostatak prisutnom receptoru nego kolinesteraza i B-esteraza, kojih se P-O-veza sporo prekida (34, 79, 80, 81).

Istraživanjem brzina hidrolize supstrata kod različitih koncentracija vodikovih iona, za mnoge esterase određene su konstante disocijacije aktivnog centra. Kako je utvrđeno da je afinitet supstrata prema enzimu to veći što je jača elektrofilnost onog dijela supstrata na kojem dolazi do hidrolize, smatra se da pri stvaranju kompleksa dolazi do aciliranja jedne bazne grupe aktivnog centra. Građa te bazne grupe danas još nije jednoznačno određena. Kod karboksilnih se estera konstanta disocijacije kreće u području od 6.6 do 7.2, a to odgovara vrijednosti konstante disocijacije imidazolne grupe histidina. Na osnovu toga, mnogi autori smatraju da je imidazolna grupa mjesto u aktivnom centru na koje se supstrat u prvom redu veže (82). Nasuprot tome je, međutim, utvrđeno da se pri fosforiliranju acetilkolinesteraze (83, 84), pseudokolinesteraze (84), tripsina, kimotripsina, trombina i nekih drugih estera (1, 82, 84, 85) fosfor veže na hidroksilnu grupu serina a ne na histidin.

Dok mehanizam djelovanja nekog enzima zavisi o karakteristikama veze na kojoj se hidroliza odvija, specifičnost enzima određena je strukturom cjelokupne molekule, bez obzira na mehanizam reakcije.

Augustinsson i *Ekedahl* (86) su komparirali brzinu hidrolize serije estera octene kiseline iz reda fenola, indoksila i vinila sa čistom A-esterazom plazme. Fenil-acetat je hidroliziran vrlo brzo, a njegov aliciklički analog, cikloheksilacetat, nije uopće hidroliziran. Od tri moguća cikloheksenil-acetata hidroliziran je samo Δ^1 derivat, kao što je hidroliziran i Δ^1 ciklopentenil-acetat za razliku od ciklopentila. Ti rezultati sugeriraju da je za hidrolizu kataliziranu A-esterazama potreban preduvjet dvostruki vez između dvaju C-atoma, od kojih je jedan direktno vezan s alkoholnim O-atomom. I uvođenje različitih elektrofilnih i nukleofilnih grupa u acilni radikal estera, u velikoj mjeri utječe na specifičnost enzima. Tako A-esteraza seruma ovce 27 puta sporije hidrolizira o-nitrofenilacetat od m-nitrofenilacetata (25, 26).

Uprkos velikom broju radova o distribuciji, istraživanju specifičnosti i mehanizma djelovanja A-esteraza, konačni odgovor o prirodi te grupe estera – njihovoj fiziološkoj funkciji i prirodnim supstratima – još

nije moguće dati. Međutim, činjenica da postoje esteraze koje nisu inhibirane organofosfornim spojevima već ih hidrolitski razgrađuju, vrlo je značajna, jer ta grupa spojeva spada u najjače poznate antikolinesterazne agense. Upravo ti spojevi predstavljaju vrlo korisno oruđe u osnovnim istraživanjima s područja enzimologije, prvenstveno u nastojanjima da se kemijski okarakterizira aktivni centar esteraza i upozna mehanizam enzimatske hidrolize uopće.

Literatura

1. Dixon, G. H., Neurath, H., Pechère, J. F.: Proteolytic Enzymes, Ann. Rev. Biochem., 489 (1958).
2. Myers, D. K., Tol, J. W., de Jonge, M. H. T.: Studies on Ali-esterases. V. Substrate Specificity of the Esterases of Some Saprophytic Mycobacteria, Biochem. J., 65 (1957) 223.
3. Wilson, I. B.: The Mechanism of Enzyme Action, McElroy Glass, Johns Hopkins Press, Baltimore, 1954, str. 642.
4. Aldridge, W. N.: Serum Esterases. I. Two Types of Esterase (A and B) Hydrolysing *p*-nitrophenil Acetate, Propionate and Butirate, and a Method for Their Determination, Biochem. J., 53 (1953) 110.
5. Goutier, R.: Étude électrophorétique des esterases sériques et de la fixation du DF32P dans la sérum, chez le lapin et le cobaye, Biochim. Biophys. Acta, 19 (1956) 524.
6. Dixon, M., Webb, F. C.: Enzymes, London 1960.
7. International Union of Biochemistry: Report of the Commission on Enzymes, Symposium series, 20 (1961), Pergamon Press, Oxford.
8. Heath, D. F.: Organophosphorus Poisons, Pergamon Press, London 1961.
9. Augustinsson, K. B., Heimbürger, G.: Enzymatic Hydrolysis of Organophosphorus Compounds. II. Analysis of Reacting Products in Experiments with Tabun and Some Properties of Blood Plasma Tabunase, Acta Chem. Scand., 8 (1954) 762.
10. Aldridge, W. N.: The Inhibition of Erythrocyte Cholinesterase by Tri-Esters of Phosphoric Acid, Biochem. J., 54 (1953) 442.
11. Mazur, A.: An Enzyme in Animal Tissues Capable of Hydrolyzing the Phosphorus-fluorine Bond of Alkyl Fluorophosphates, J. Biol. Chem., 164 (1946) 271.
12. Mounter, L. A., Dien, L. T. H.: Liberation of Hydrofluoric Acid by Enzymatic Hydrolysis of Dialkylfluorophosphates, Proc. Soc. exptl. Biol. Med., 87 (1954) 40.
13. Adams, D. H., Whittaker, U. P.: The Characterization of the Esterases of Human Plasma, Biochem. J., 44 (1949) 62.
14. Myers, D. K., Mendel, B.: Investigation on the Use of Eserine for the Differentiation of Mammalian Esterases, Proc. Soc. exptl. Biol., 71 (1949) 357.
15. Mounter, L. A., Whittaker, U. P.: The Hydrolysis of Esters of Phenol by Cholinesterases and Other Esterases, Biochem. J., 54 (1953) 551.
16. Myers, D. K., Mendel, B.: Studies on Ali-Esterases and Other Lipid-Hydrolysing Enzymes. I. Inhibition of the Esterases and Acetoacetate Product on of Liver, Biochem. J., 53 (1953) 16.
17. Whittaker, U. P.: Specificity, Mode of Action and Distribution of Cholinesterases, Physiol. Rev., 31 (1951) 312.
18. Richter, D., Croft, P. G.: Blood Sterases, Biochem. J., 36 (1942) 746.
19. Augustinsson, K. B., Heimbürger, G.: Electrophoresis Studies on Blood Plasma Esterases. II. Avian, Reptilian, Amphibian and Piscine Plasmata, Acta Chem. Scand., 13 (1959) 1081.
20. Myers, D. K.: Studies on Selective Esterase Inhibitors, monografija, 1954.
21. Mendel, B., Myers, D. K., Uydelrt, T. E., Ruys, A. Ch., De Bruyn, W. M.: Ali-Esterase Inhibitors and Growth, Brit. J. Pharmacol., 8 (1953) 217.

22. Bergman, F., Rimon, S., Segal, R.: A New Type of Esterase in Hog Kidney Extract, *Biochem. J.*, **67** (1957) 481.
23. Bergman, F., Rimon, S., Segal, R.: Effect of pH on the Activity of Fel Esterase Towards Different Substrates, *Biochem. J.*, **68** (1958) 493.
24. Bergman, F., Rimon, S.: The Effect of pH Variations on the Activities of C-esterase, *Biochem. J.*, **70** (1958) 339.
25. Main, A. R.: The Purification of the Enzyme Hydrolysing Diethyl *p*-nitrophenyl Phosphate (Paraoxon) in Sheep Serum, *Biochem. J.*, **74** (1960) 10.
26. Main, A. R.: The Differentiation of the A-Type Esterases in Sheep Serum, *Biochem. J.*, **75** (1960) 188.
27. Mounter, L. A.: Some Studies of Enzymatic Effects of Rabbit Serum, *J. Biol. Chem.*, **209** (1954) 813.
28. Aldridge, W. N.: Serum Esterases. II. An Enzyme Hydrolysing Diethyl *p*-Nitrophenyl Phosphate (E 600) and its Identity with the A-Esterase of Mammalian Sera, *Biochem. J.*, **53** (1953) 117.
29. Mounter, L. A., Chanutin, A.: Dialkylfluorophosphatase of Kidney. II. Studies of Activation and Inhibition by Metals, *J. Biol. Chem.*, **204** (1953) 837.
30. Hunter, R. L., Markert, C. L.: Histochemical Demonstration of Enzymes Separated by Zone Electrophoresis in Starch Gels, *Science*, **125** (1957) 1924.
31. Augustinsson, K. B.: Electrophoretic Separation and Classification of Blood Plasma Esterases, *Nature*, **181** (1958) 1786.
32. Augustinsson, K. B., Heimbürger, G.: Electrophoresis Studies on Blood Plasma Esterases. I. Mammalian Plasma, *Acta Chem. Scand.*, **13** (1959) 571.
33. Augustinsson, K. B., Heimbürger, G.: Electrophoresis Studies on Blood Plasma Esterases. III. Conclusions, *Acta Chem. Scand.*, **13** (1959) 1097.
34. Augustinsson, K. B.: Multiple Forms of Esterase Invertebrate Blood Plasma. *Ann NY Acad. Sci.*, **94** (1961) 844.
35. Augustinsson, K. B., Heimbürger, G.: Enzymatic Hydrolysis of Organophosphorus Compounds. I. Occurrence of Enzymes Hydrolysing Dimethyl-amido-ethoxy-phosphoryl Cyanide (Tabun), *Acta Chem. Scand.*, **8** (1954) 753.
36. Mounter, L. A.: *The Enzymes*, 4. ed. Boyer, Lardy i Myrbäck. New York. 1960. str. 541.
37. Hobbiger, F.: Inhibition of Cholinesterases by Irreversible Inhibitors *in vitro* and *in vivo*, *Brit. J. Pharmacol.*, **6** (1951) 21.
38. Adie, P. A.: Studies on the Enzymatic Hydrolysis of Sarin and Tabun, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **36** (1958) 15.
39. Mazur, A., Bodansky, J.: The Mechanism of *in vitro* and *in vivo* Inhibition of Cholinesterase Activity by Diisopropylfluorophosphate, *J. Biol. Chem.*, **163** (1946) 261.
40. Mounter, L. A., Dien, L. T. H., Chanutin, A.: The Distribution of DFP-ase in the Tissues of Various Species, *J. Biol. Chem.*, **215** (1955) 691.
41. Mounter, L. A., Tuck, K. D., Alexander, H. L., Dien, L. T. H.: Reactivity of Esterases and Proteases in the Presence of Organophosphorus Compounds, *J. Biol. Chem.*, **226** (1957) 873.
42. Heim, F., Neff, U.: cit. Heath, D. F.: *Organophosphorus Poisons*, Pergamon Press, London 1955.
43. Metcalf, R. L., Maxon, M., Fukuto, T. R., March, R. B.: Aromatic Esterase in Insects, *Ann. ent. Soc. Amer.*, **49** (1956) 274.
44. Payton, J.: Parathion and Ultra-violet Light, *Nature*, **171** (1953) 355.
45. Ahmed, M. K., Casida, J. E., Nichols, R. E.: Bovine Metabolism of Organophosphorus Insecticides: Significance of Rumen Fluid with Particular Reference to Parathion, *J. Agr. Food Chem.*, **6** (1958) 740.
46. Aldridge, W. N.: cit. Aldridge, W. N.: Ph. D. Thesis, London University, 1951.
47. Cohn, E. J., Gurd, F. R. N., Surgenor, D. M., Barnes, B. A., Brown, R. K., Derouaux, G., Gillespie, J. M., Kahnt, F. M., Lever, W. F., Liu, C. N., Mittelman, D., Mounton, R. F., Schmidt, K., Uroma, F.: A System for the Separation of the Components of Human Blood: Quantitative Procedures for the Separation of the Protein Components of Human Plasma, *J. Am. Chem. Soc.*, **72** (1950) 465.

48. *Augustinsson, K. B., Heimbürger, G.*: Enzymatic Hydrolysis of Organophosphorus Compounds. III. Effect of Cholinesterase Inhibitors and Inhibition of Cholinesterase in the Presence of Tabunase, *Acta Chem. Scand.*, **8** (1954) 915.
49. *Augustinsson, K. B., Heimbürger, G.*: Enzymatic Hydrolysis of Organophosphorus Compounds. IV. Specificity Studies, *Acta Chem. Scand.*, **8** (1954) 1533.
50. *Augustinsson, K. B.*: Enzymic Hydrolysis of Organophosphorus Compounds, *Biochim. Biophys. Acta*, **13** (1954) 303.
51. *Augustinsson, K. B., Heimbürger, G.*: Enzymatic Hydrolysis of Organophosphorus Compounds. V. Effect of Phosphoryl-phosphatase on the Inactivation of Cholinesterases by Organophosphorus Compounds *in vitro*, *Acta Chem. Scand.*, **9** (1955) 310.
52. *Wilson, I. B.*: Acetylcholinesterase. XI. Reversibility of Tetraethyl Pyrophosphate Inhibition, *J. Biol. Chem.*, **190** (1951) 111.
53. *Jansen, E. F., Fellows Nutting, D., Balls, A. K.*: Mode of Inhibition of Chymotrypsin by Diisopropylfluorophosphate. I. Introduction of Phosphorus, *J. Biol. Chem.*, **179** (1949) 201.
54. *Adie, P. A., Tuba, J.*: The Intracellular Localization of Liver and Kidney Sarinase, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **36** (1958) 21.
55. *Adie, P. A.*: The Purification of Sarinase from Bovine Plasma, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **34** (1956) 1091.
56. *Mounter, L. A., Floyd, C. S., Chanutin, A.*: A Dialkylfluorophosphatase of Kidney. I. Purification and Properties, *J. Biol. Chem.*, **204** (1953) 221.
57. *Mounter, L. A.*: The Complex Nature of DFP-ase of Hog and Rat Liver and Kidney, *J. Biol. Chem.*, **215** (1955) 705.
58. *Mounter, L. A.*: Dialkylfluorophosphatase of Kidney. IV. Dissociation Constant of Active Groups, *J. Biol. Chem.*, **219** (1956) 677.
59. *Cohen, J. A., Warringa, M. G. P. J.*: Purification and Properties of Dialkylfluorophosphatase, *Biochim. Biophys. Acta*, **26** (1957) 29.
60. *Mounter, L. A., Bacer, R. F., Chanutin, A.*: Dialkylfluorophosphates of Microorganisms, *J. Biol. Chem.*, **215** (1955) 699.
61. *Mounter, L. A., Tuck, K. D.*: Dialkylfluorophosphatases of Microorganisms. II. Substrate Specificity Studies, *J. Biol. Chem.*, **221** (1956) 537.
62. *Augustinsson, K. B., Heimbürger, G.*: Enzymatic Hydrolysis of Organophosphorus Compounds. VI. Effect of Metallic Ions on the Phosphorylphosphatases of Human Serum and Swine Kidney, *Acta Chem. Scand.*, **9** (1955) 383.
63. *O'Brien, R. D.*: Toxic Phosphorus Esters, Academic Press, New York, 1960.
64. *Aldridge, W. N.*: Some Observations on the Characteristics of Serum Esterases with Special Reference to the Hydrolysis of Diethyl *p*-nitrophenyl Phosphate (E 600), Ph. D. Thesis, London University, 1951.
65. *Erdős, E. G., Debay, C. R., Westerman, E.*: Arylesterases in Blood: Effect of Calcium and Inhibitors, *Biochem. Pharmacol.*, **5** (1960) 173.
66. *Mounter, L. A., Chanutin, A.*: Dialkylfluorophosphatase of Kidney. III. Studies of Activation and Inhibition by Cofactors, *J. Biol. Chem.*, **210** (1954) 219.
67. *Hoskin, F. C. G., Trick, G. S.*: Stereospecificity in the Enzymatic Hydrolysis of Tabun and Acetyl-methylcholine Chloride, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **33** (1955) 963.
68. *Augustinsson, K. B.*: Enzymatic Hydrolysis of Organophosphorus Compounds. VII. The Sterospecificity of Phosphorylphosphatases, *Acta Chem. Scand.*, **11** (1957) 1371.
69. *Adie, P. A., Hoskin, F. C. G., Trick, G. S.*: Kinetics of the Enzymatic Hydrolysis of Sarin, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **34** (1956) 80.
70. *Michaelis, L., Menten, M. L.* (1913), *iz Enzymes*, London, 1960.
71. *Keilin, D., Mann, T.* (1937): cit. *Dixon, M., Webb, E. C.*: *Enzymes*, London, 1960.
72. *Chance, B.* (1947): cit. *Dixon, M. i Webb, E. C.*, *Enzymes*, London, 1960.
73. *Dostrovsky, I., Halmann, M. J.*: Kinetic Studies in the Phosphinil Chloride and Phosphorochloridate Series, dio IV, General Discussion, *J. Chem. Soc.*, (1953) 516.
74. *Health, D. F.*: The Effects of Substituents on the Rates of Hydrolysis of Some Organophosphorus Compounds. Dio I. Rates in Alkaline Solution, *J. Chem. Soc.*, (1956) 3796.

75. *Ingold, C. K.*: Structure and Mechanism in Organic Chemistry, ed. L. Bell & Sons Ltd., London, 1953.
76. *James, R. C. Jr., Ramsay, O. B.*: Mechanisms of Nucleofilic Substitution in Phosphate Esters, *Chem. Rev.*, *64* (1964) 317.
77. *Wilson, I. B., Bergmann, F., Nachmansohn, D.*: Acetylcholinesterase. X. Mechanism of the Catalysis of Acylation Reaction, *J. Biol. Chem.*, *186* (1950) 781.
78. *Fukuto, T. R.*: The Chemistry and Action of Organic Phosphorus Insecticides, cit. *Metcalf, R. L.*: Advances in Pest Control Research, Vol. *1*, New York 1957., Interscience Publishers, inc., 147.
79. *Augustinsson, K. B., Casida, J. E.*: Enzymic Hydrolysis of *N*:*N*-dimethylcarbamoylfluoride, *Biochem. Pharmacol.*, *3* (1959) 60.
80. *Casida, J. E., Augustinsson, K. B.*: Reaction of Plasma Albumin with 1-Naphtyl *N*-methylcarbamate and Certain Other Esters, *Biochim. Biophys. Acta*, *36* (1959) 411.
81. *Casida, J. E., Augustinsson, K. B., Jonsson, G.*: Solubility, Toxicity and Reaction Mechanism with Esterases of Certain Carbamate Insecticides, *J. econ. Entom.*, *53*, 205.
82. *Oosterbaan, R. A., Kunst, P., van Rotterdam, J., Cohen, J. A.*: The Reaction of Chymotrypsin and Diisopropylphosphoryl-peptides, *Biochim. Biophys. Acta*, *27* (1958) 556.
83. *Schäffer, W. K., May, S. C., Summerson, W. H.*: Serine Phosphoric Acid from Diisopropylphosphoryl Derivative of Eel Cholinesterase, *J. Biol. Chem.*, *206* (1954) 201.
84. *Cohen, J. A., Oosterbaan, R. A., Warringa, M. G. P. J., Jansz, H. S.*: The Chemical Structure of the Reactive Group of Esterases, *Discussions Faraday Soc.*, *20* (1955) 114.
85. *Koshland, D. E. Jr., Erwin, M. J.*: Enzyme Catalysis and Enzyme Specificity-Combination of Amino Acids at the Active Site of Phosphoglucomutase, *J. Am. Chem. Soc.*, *79* (1957) 2657.
86. *Augustinsson, K. B., Ekedahl, G.*: On the Specificity of Arylesterases, *Acta Chem. Scand.*, *16* (1962) 240.
87. *Aldridge, W. N.*: Organophosphorus Compounds and Esterases, Annual rept. *Progr. Chem.*, *53* (1956) 294.

Summary

A GENERAL REVIEW OF ESTERASES WITH PARTICULAR REGARD TO ENZYMIC HYDROLYSIS OF ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS

Literature data about the classification of esterases, the mechanism of action of hydrolytic enzymes and enzymic hydrolysis of organophosphorus compounds are presented. The literature on distribution, specificity and common characteristics of A-esterases is also surveyed.

Received for publication
April 29, 1966

Institute for Medical Research
incorporating the Institute of
Industrial Hygiene, Zagreb