

ISPITIVANJE UTICAJA FEROCENA I NJEGOVIH DERIVATA NA AKTIVNOST PROTEOLITIČKIH ENZIMA PRISUTNIH U LIZATU *E. COLI* ATCC 25922

Mirjana Žabić², Zoran Kukrić², Ljiljanja Topalić-Trivunović²

¹Univerzitet u Banjoj Luci, Poljoprivredni fakultet, Banja Luka, RS, BiH

²Univerzitet u Banjoj Luci, Tehnološki fakultet, Banja Luka, RS, BiH

ISSN 2232-755X

UDC: 582.284.51:577.15

DOI: 10.7251/GHTE1309011Ž

Originalni naučni rad

*Sve značajnija upotreba organometalnih jedinjenja u terapeutske svrhe je potakla mnoga istraživanja u oblasti inhibicije enzima. U ovom radu je ispitivan efekat ferocena i njegovih derivata na proteolitičke enzime prisutne u lizatu *E. coli* ATCC 25922. Utvrđeno je da ferocen najviše, skoro za 50%, smanjuje brzinu nastajanja p-nitroanilina iz N- α -benzoil-DL-arginin p-nitroanilida (BAPNA) uz pomoć enzima lizata bakterije *E. coli*. Dakle, za inhibiciju hidrolize BAPNA-e pomoću lizata ove bakterije i sam ferocen je bio dovoljno djelotvoran, iako je bilo za očekivati da će uvođenje poželjnih funkcionalnih grupa u molekulu ferocena poboljšati inhibiciju tripsina ostvarivanjem bolje interakcije sa enzimskim aktivnim mjestom.*

Ključne riječi: ferocen, inhibicija, tripsin, E. coli lizat

UVOD

Selektivna i efikasna inhibicija proteolitičkih enzima je predmet mnogih istraživanja jer proteaze katalizuju razlaganje proteina u brojnim biološkim procesima, zbog čega imaju značajnu ulogu i u nastanku mnogih bolesti u organizmu. Prelazni metali i njihovi kompleksi mogu uspješno inhibirati djelovanje nekih proteolitičkih enzima kao što je tripsin. Njihovo inhibično djelovanje se zasniva na direktnom vezanju za aktivno mjesto tripsina imitirajući pentakoordinatno prelazno stanje reakcije hidrolize proteina. Ferocen i odabrani derivati ferocena nisu strukturni analozi supstrata tripsina, ali je pretpostavljeno da bi ciklopentadienilni prstenovi ferocena mogli da imitiraju prelazno stanje reakcije hidrolize proteina i na taj način inhibiraju enzim. Ferocen je takođe odabran da bi se pokušale iskoristiti prednosti malih, rigidnih, cikličkih molekula koje smanjuju gubitak entropije zbog promjene konformacije pri vezivanju za enzim, koje su otpornije na degradativne enzime, lipofilnije i time bolje prolaze kroz ćelijsku membranu, te su biodostupnije. Preliminarna ispitivanja su pokazala da djeluje antitumorno na miševima, u dozama dvije hiljade puta nižim od LD₅₀ doze(1). Ova činjenica, kao i poboljšanje selektivnosti i efikasnosti već poznatih lijekova kada se u njih ugradi ferocenska jedinica, govori u prilog terapeutske efikasnosti i niske toksičnosti ferocena.

Uticaj ferocena i odabranih derivata ferocena na aktivnost čistog tripsina sa N- α -benzoil-DL-arginin p-nitroanilidom kao supstratom je već objavljen (2, 3). Derivati ferocena su odabrani tako da, između ostalog, u svojoj strukturi imaju amino grupu za koju se zna da ostvaruje važnu interakciju sa Asp 189 u aktivnom mjestu tripsina i time poboljšava inhibiciju. Određivanjem Michaelis-ovih konstanti, maksimalnih brzina reakcije i konstanti inhibicije utvrđeno je da ferocen i njegovi derivati inhibiraju čist tripsin, i da je inhibicija akompetitivnog tipa. Dimetilaminometil ferocen se pokazao kao najefikasniji inhibitor, sa $K_i=0.048$ mmol/L (2). Takođe je ispitivan uticaj ovih jedinjenja *in vivo*, prateći rast bakterije *E. coli* ATCC 25922(4). Rast bakterije je praćen spektrofotometrijski, korelacijom optičke gustoće sa brojem formiranih bakterijskih kolonija i upoređivanjem rezultata preko srednjeg generacijskog vremena. Utvrđeno je da dimetilaminometil ferocen najuspješnije inhibira rast bakterije, tj. bakterije dvostruko sporije rastu uz dimetilaminometil ferocen i ne dostižu ni polovinu ukupnog broja bakterija u poređenju sa kontrolnom serijom. Ferocen takođe značajno usporava rast i smanjuje ukupan broj bakterija za gotovo 50%.

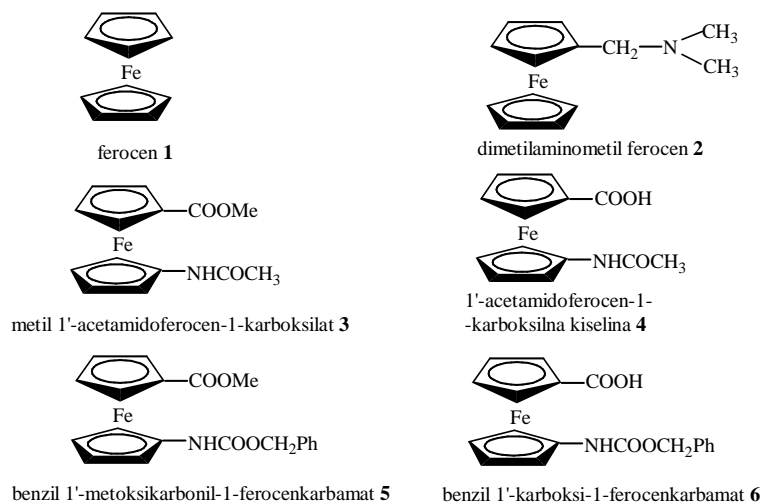
Ovaj rad ima za cilj da ispita djelovanje ferocena i ferocenovih derivata na aktivnost proteolitičkih enzima prisutnih u lizatu *E. coli*, radi omogućavanja bolje biodostupnosti ovih jedinjenja, prateći nastajanje p-nitroanilina hidrolizom N- α -benzoil-DL-arginin p-nitroanilida pomoću lizata. U tu svrhu je potrebno odrediti brzine reakcije hidrolize supstrata lizatom, konstante eventualne inhibicije pomoću ferocena i njegovih derivata, i uporediti ih sa efektom koji ova jedinjenja imaju na čist tripsin.

²Korespondentni autor: Mirjana Žabić, Univerzitet u Banjoj Luci, Poljoprivredni fakultet, Bulevar vojvode Petra Bojovića 1a, 78 000 Banja Luka, BiH, e-mail: mirjana.zabic@agrofabl.org

Rad je izložen na međunarodnom naučnom skupu *X Savjetovanje hemičara, tehnologa i ekologa Republike Srpske u Banjaluci*, novembar 2013.

MATERIJAL I METODE RADA

Tripsin (Sigma T-4799, Lot 284 7440, aktivnost 1000-1500 BAEE jedinica/mg čvrste materije, iz svinjskog pankreasa); BAPNA (N- α -benzoil-DL-arginin p-nitroanilid), (Fluka, $\geq 98\%$); ferocen 1 (slika 1, Aldrich, 98%); dimetilaminometil ferocen 2 (slika 1, Aldrich, 96%); Tris pufer [Tris(hidroksimetil)aminometan, Lachema]; dimetilsulfoksid (Merck, $>99\%$); benzamidin hidroklorid (Sigma); hranjivi bujon u prahu (Institut za imunologiju i virusologiju - Torlak, Beograd); komercijalna kultura *E. coli* ATCC 25922 (Veterinarski zavod "Vaso Butozan", Banja Luka). Derivati ferocena (metil 1'-acetamidoferocen-1-karboksilat 3, 1'-acetamidoferocen-1-karboksilna kiselina 4, benzil 1'-metoksikarbonil-1-ferocenkarmat 5, benzil 1'-karboksi-1-ferocenkarmat 6, slika 1) su nabavljeni na Fakultetu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Univerziteta u Zagrebu (5).



Slika 1. Feroceni i derivati ferocena
Figure 1. Ferrocene and its derivatives

U daljem tekstu će se ferocen i njegovi derivati, radi jednostavnosti, nazivati "inhibitor #" (broj kao na slici 1). Za izvođenje eksperimenata su korišteni UV-VIS spektrofotometar Jenway 6305 sa termočelijom i ultrazvučno kupatilo Falc, frekvencija 30 kHz. Priprema rastvora BAPNA-e (2) i hranjive podloge za uzgoj bakterija (4) su već opisani.

Razvoj kulture *E. coli* i priprema bakterijskog lizata

Zapripremu lizata ćelija *E. coli* korištena je metodasonikacije. Mehanizam lize ćelija sonikacijom, tj. razaranje ćelijske membrane sonikacijom se zasniva na stvaranju šupljina ultrazvukom (6, 7). Efikasnost metode za pripremu bakterijskog lizata je poboljšavana variranjem različitih parametara: dužine trajanja i učestalosti sonikacije za efikasno razbijanje ćelije; uslova centrifugiranja radi taloženja ćelijskog otpada nakon sonikacije; izborom vrste kontejnera za kulturu, itd. Ispostavilo se da je sonikacija efikasnija ako se uzorak nalazi u plastičnim vrećicama za homogenizaciju, jer se one mogu ravnomjerno rasporediti u ultrazvučnom kupatilu, izlažući istovremeno veći broj ćelija mikroorganizama djelovanju ultrazvuka. U uzorke je prilikom sonikacije dodavan kvarcni pijesak, jer se zrna pijeska međusobno sudaraju proizvodeći dovoljnu snagu za lizu ćelija (8), što znatno poboljšava razbijanje ćelije. Destilovana voda u ultrazvučnom kupatilu je bila degasirana, radi uklanjanja mjehurića vazduha koji umanjuju efekat ultrazvuka. Temperatura je kontrolisana prije i poslije centrifugiranja, kao i sonikacije zbog eventualnog pregrijavanja kulture. Utvrđeno je da nema znatnog povećanja temperature uzorka u ultrazvučnoj kadi, kao ni pri centrifugiranju pri datim uslovima. Efekat razbijanja ćelijskog zida bakterije je praćen spektrofotometrijski (mjerenjem OD_{600nm} ; što je metoda pripreme lizata bolja, to je OD_{600nm} manja, tj. lizat je bistriji), kao i standardnom tehnikom određivanja ukupnog broja bakterija. Samo intaktne ćelije će dalje rasti i formirati kolonije koje se broje nakon 48 sati.

$$\text{Efekat lize (\%)} = \frac{OD_{600nm} \text{ nakon lize}}{OD_{600nm} \text{ prije lize}} \times 100 \quad (1)$$

Čista kultura *E. coli* se sa kosog agara ezom prenese u 3x10 mL sterilnog hranjivog bujona pripremljenog u 0.1 mol/L Tris HCl, pH 8.2. Inkubira se na 37°C 24 sata, a zatim se 30 mL ovako pripremljene bakterijske kulture nacijepi u 160 mL hranjivog bujona, pripremljenog u 0.1 mol/L Tris HCl, pH 8.2. Nakon 24 sata inkubacije na 37°C, centrifugira se na 4000 obrt/min, 10 minuta. Supernatant se odbaci, a talog se resuspenduje u 0.05 mol/L Tris HCl, pH 8.2. Ovako dobijena suspenzija ćelija *E. coli* se stavi u vrećicu za homogenizaciju, a zatim se sonikuje 2x15 minuta u ultrazvučnoj kadi sa degasiranim destilovanim vodom, pri frekvenciji od 30 kHz. U vrećicu za homogenizaciju se doda 1 mL sterilnog kvarcnog pijeska na 6 mL bakterijske suspenzije. Čelijski otpad se odvoji centrifugiranjem na 4000 obrt/min, 10 minuta. Supernatant (lizat) se otpipetira i dalje upotrebljava u eksperimentima. Utvrđeno je da svježe pripremljen

lizat daje najbolje rezultate, jer stajanjem na sobnoj temperaturi ili u frižideru aktivnost lizata opada. S obzirom da su početne vrijednosti OD_{600nm} uzgojene kulture *E. coli* i OD dobijenog lizata različiti za svaki eksperiment (a time i enzimski aktivnost lizata), mogu se porediti samo rezultati eksperimenata koji su provedeni istovremeno, sa istim lizatom.

Određivanje aktivnosti lizata bez dodatka ferocena ili derivata ferocena

U 0.6 mL svježe pripremljenog lizata (termostatiran na 37°C, u kivetu spektrofotometra) se doda 2 mL rastvora BAPNA-e (rastvor pripremljen u 50 mmol/L Tris HCl, pH 8.2, takođe termostatiran na 37°C). Hidroliza BAPNA-e, tj. nastanak p-nitroanilina se prati spektrofotometrijski na $\lambda=410$ nm u trajanju od ukupno 5 minuta (prve dvije minute se A_{410} nm očitava svakih 10 sekundi). Slijepa proba sadrži 0.6 mL lizata i 2 mL 50 mmol/L Tris HCl, pH 8.2.

Određivanje aktivnosti lizata uz dodatak ferocena ili derivata ferocena

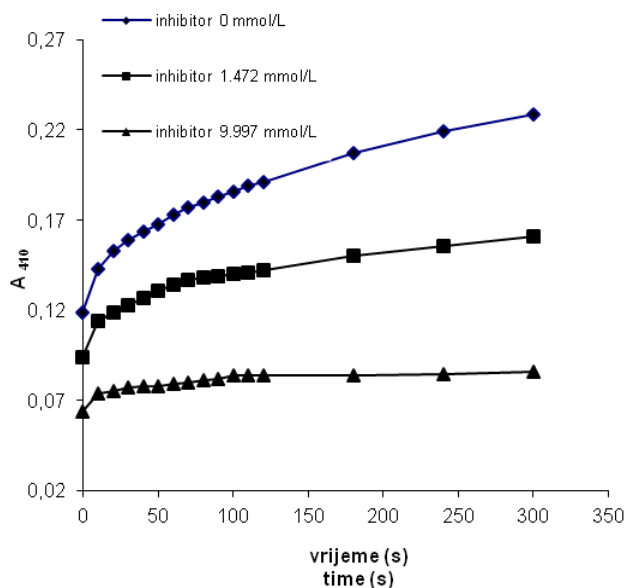
U kivetu koja sadrži 0.6 mL lizata (37°C) se doda 0.1 mL rastvora inhibitora (37°C) i ova smjesa stoji na 37°C 5 minuta. Zatim se doda 2 mL rastvora BAPNA-e (37°C) i spektrofotometrijski se prati nastanak p-nitroanilina, kao što je opisano u eksperimentima bez dodavanja inhibitora. Slijepa proba sadrži 0.6 mL lizata, 0.1 mL rastvora inhibitora i 2 mL 50 mmol/L Tris HCl, pH 8.2.

REZULTATI I DISKUSIJA

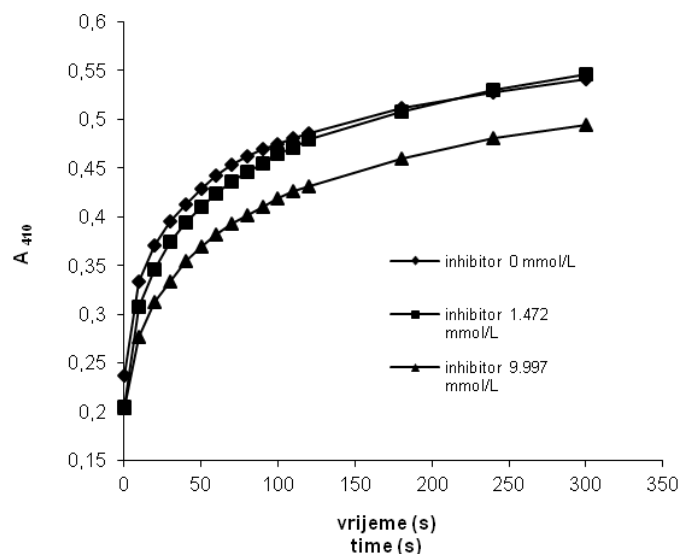
Da bi se ispitalo da li ferocen i njegovi derivati inhibiraju aktivnost proteolitičkih enzima prisutnih u bakterijskoj ćeliji, urađeni su eksperimenti sa lizatom *E. coli*. Razbijanjem ćelijske membrane i oslobađanjem ćelijskog sadržaja inhibitorima su dostupniji bakterijski enzimi, a razgradnja inhibitora je bar djelimično izbjegnuta. Sistem je posmatran kao da je sistem sa čistim enzimom, iako u lizatu još uvijek ima živih, intaktnih bakterijskih ćelija zaostalih u supernatantu i nakon centrifugiranja, kao i drugih enzima iz ćelijskog sadržaja. Cilj je bio da se upotrijebe tri različite koncentracije inhibitora na dvije koncentracije supstrata da bi se odredila konstanta eventualne inhibicije.

Isprobavane su različite koncentracije lizata (koncentrovan, 25% i 50% razrijeđen sa 0.05 mol/L Tris HCl puferom, pH 8.2), i zaključeno je da se najbolji rezultati postižu sa nerazrijeđenim lizatom. Utvrđeno je da je reakciju dovoljno pratiti 5 minuta, jer brzina nastanka p-nitroanilina vrlo brzo počne da opada (zato se prve dvije minute apsorpcija mjeri svakih 10 sekundi). Probni eksperimenti su rađeni sa standardnim tripsinovim inhibitorom benzamidinom. Pri koncentracijama supstrata i inhibitora koje su korištene u eksperimentima sa čistim enzimom (2): BAPNA (2.3676 mmol/L i 3.5428 mmol/L u reakcionoj smjesi) i benzamidin (42.570 μ mol/L, 70.948 μ mol/L i 141.896 μ mol/L u reakcionoj smjesi) nema inhibitorynog efekta. Povećavanjem koncentracije benzamidina (1.472 mmol/L i 9.997 mmol/L u reakcionoj smjesi) i zadržavanjem iste koncentracije supstrata kao kod čistog enzima dobijen je vrlo dobar inhibitoryni efekat. Efekat je još bolji ako se smanji koncentracija supstrata na 1.1838 mmol/L, pa je pretpostavljeno da je rezultat to bolji što je odnos koncentracija u reakcionoj smjesi BAPNA/benzamidin što manja vrijednost.

Dobijeni rezultati na dvije koncentracije BAPNA-e ($S_1=1.1838$ mmol/L i $S_2=2.3676$ mmol/L) i pri koncentracijama benzamidina 1.472 mmol/L i 9.997 mmol/L (odnosi supstrat/inhibitor su na $S_1:0.80$ i 0.12 , a na $S_2:1.61$ i 0.24 , redom) su prikazani naslikama 2 i 3. Svi eksperimenti su urađeni u paralelnim probama.



Slika 2. Uticaj benzamidina na aktivnost lizata *E. coli* ($S_1=1.1838$ mmol/L)
Figure 2. Influence of benzamidine on *E. coli* lysate activity ($S_1=1.1838$ mmol/L)



Slika 3. Uticaj benzamidina na aktivnost lizata *E. coli* ($S_2 = 2.3676$ mmol/L)
 Figure 3. Influence of benzamidine on *E. coli* lysate activity ($S_2 = 2.3676$ mmol/L)

Iz vrijednosti inicijalnih brzina (tabela 1) se vidi da one opadaju sa porastom koncentracije benzamidina, na obe koncentracije supstrata.

Tabela 1. Inicijalne brzine reakcije hidrolize katalizovane lizatom *E. coli* na S_1 i S_2 koncentracijama supstrata u prisustvu različitih koncentracija benzamidina
 Table 1. Initial reaction velocities of *E. coli* lysate catalyzed hydrolysis at S_1 and S_2 substrate concentrations in the presence of various benzamidine concentrations

Benzamidin Benzamidine (mmol/L)	v_{S_1} ($\mu\text{mol/Lmin}$)	$1/v_{S_1}$ ($\text{Lmin}/\mu\text{mol}$)	v_{S_2} ($\mu\text{mol/Lmin}$)	$1/v_{S_2}$ ($\text{Lmin}/\mu\text{mol}$)
0	4.8	0.208	18.6	0.054
1.472	2.4	0.417	17.4	0.057
9.997	0.6	1.667	15.0	0.067

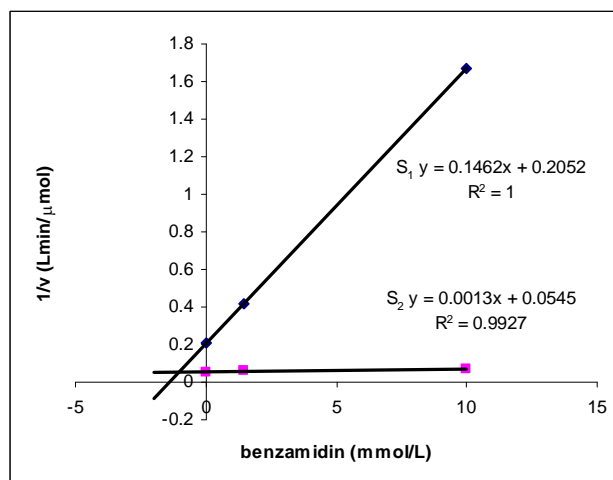
v_{S_1} - brzina reakcije pri koncentraciji supstrata S_1 (1.1838 mmol/L)

v_{S_2} - brzina reakcije pri koncentraciji supstrata S_2 (2.3676 mmol/L)

v_{S_1} - reaction velocity at substrate concentration S_1 (1.1838 mmol/L)

v_{S_2} - reaction velocity at substrate concentration S_2 (2.3676 mmol/L)

Na slici 4 je grafički prikazano određivanje konstante inhibicije (K_i) za benzamidin.



Slika 4. Određivanje K_i za benzamidin Lineweaver-Burk-ovom metodom
Figure 4. Lineweaver-Burk plot for the determination of K_i for benzamidine

Dobijena konstanta inhibicije je $K_i=1.04$ mmol/L, dok je sa čistim tripsinom konstanta inhibicije bila $K_i=18.66$ μ mol/L. (2)

Očito je iz eksperimenata sa benzamidinom da su potrebne veće koncentracije benzamidina i manja koncentracija BAPNA-e da bi se dobio inhibirajući efekat. Međutim, ferocen i njegovi derivati imaju limitiranu rastvorljivost u etanolu, ali i naročito izražen problem stvaranja zamućenja pri dodavanju u reakcionu smjesu sa lizatom, pa je njihova maksimalna koncentracija u reakcionoj smjesi 0.14 mmol/L.

Da bi se postigao što povoljniji supstrat/inhibitor odnos, koncentracija BAPNA-e u reakcionoj smjesi je zato smanjena na 0.5926 mmol/L (navedeni odnos je tada 4.17). Koncentracija supstrata se ne može dalje smanjiti, jer se dobiju suviše niske, i time nepouzdanе vrijednosti apsorpcije. Dakle, minimalna vrijednost odnosa koncentracija BAPNA/inhibitor je 4.17 za ferocen i njegove derivate, kao što se vidi u tabeli 2, što je znatno veća vrijednost od ranije navedene vrijednosti kod vrlo dobre inhibicije benzamidinom (gdje je taj odnos 0.12).

Tabela 2. Koncentracije inhibitora u reakcionoj smjesi (I_1 i I_2) i odnos koncentracija supstrat/inhibitor pri $S_1=0.5926$ mmol/L i $S_2=1.1838$ mmol/L
Table 2. Inhibitor concentrations in the reaction mixture (I_1 and I_2) and substrate/inhibitor concentration ratios at $S_1=0.5926$ mmol/L and $S_2=1.1838$ mmol/L

	ferocen ferrocene	inhibitor 2	inhibitor 3	inhibitor 4	inhibitor 5	inhibitor 6
I_1 (mmol/L)	0.0709	0.0710	0.0709	0.0710	0.0710	0.0709
I_2 (mmol/L)	0.1417	0.1420	0.1417	0.1419	0.1420	0.1418
S_1/ I_1	8.36	8.35	8.36	8.35	8.35	8.36
S_1/ I_2	4.18	4.17	4.18	4.18	4.17	4.18
S_2/ I_1	16.70	16.67	16.70	16.67	16.67	16.70
S_2/ I_2	8.35	8.34	8.35	8.34	8.34	8.35

Radi poređenja je ispitan uticaj benzamidina na reakciju hidrolize pri istim odnosima supstrata i inhibitora kao kod ferocena i ferocenovih jedinjenja, a rezultati su prikazani u tabeli 3.

Tabela 3. Inicijalne brzine reakcije hidrolize BAPNA-e v_0 (bez inhibitora), v_1 i v_2 (uzdodatak I_1 i I_2 koncentracije inhibitora) na S_1 i S_2 koncentracijama supstrata
 Table 3. Reaction velocities of BAPNA hydrolysis in the absence of the inhibitor (v_0) and in the presence of inhibitor (v_1 and v_2 , I_1 and I_2 inhibitor concentrations) at S_1 and S_2 substrate concentrations

Inhibitor	S_1			S_2		
	v_0 $\mu\text{M/Lmin}$	v_1 $\mu\text{M/Lmin}$	v_2 $\mu\text{M/Lmin}$	v_0 $\mu\text{M/Lmin}$	v_1 $\mu\text{M/Lmin}$	v_2 $\mu\text{M/Lmin}$
Benzamidin Benzamidine	1.20	0.60	0.60	3.30	2.40	2.10
Ferocen Ferrocene	1.20	0.21	0.51	2.40	2.10	0.90
Inhibitor 2	0.60	0.60	0.60	3.00	2.10	2.40
Inhibitor 3	1.20	0.57	0.90	2.40	1.80	2.10
Inhibitor 4	0.60	0.60	0.60	2.40	1.20	1.80
Inhibitor 5	0.36	0.42	0.11	2.40	2.10	1.20
Inhibitor 6	1.50	0.90	1.20	3.00	3.00	2.70

Posmatrajući dijagrame uticaja inhibitora na lizat *E. coli* uočeno je da postoje razlike između inicijalnog nagiba krive i efekta inhibitora koji je vidljiv nakon što je inicijalna faza reakcije završena. To se moglo i očekivati s obzirom da se ne radi o čistom enzimu nego o kompleksnom sistemu, pa nije dovoljno uporediti samo inicijalne brzine reakcije, nego je efekat inhibicije potrebno kvantifikovati i preko prvih izvoda odgovarajućih funkcija promjene vrijednosti apsorpcija sa vremenom trajanja reakcije (9). Da bi se što približnije i pouzdanije matematički opisao uticaj inhibitora na hidrolizu BAPNA-e, odabrana je funkcija koja najbolje korelira promjenu vrijednosti apsorpcija u vremenu (ovdje se u svim slučajevima radi o stepenoj funkciji), a zatim se izračuna brzina promjene apsorpcije na osnovu prvog izvoda date funkcije. Iz opšteg izraza za stepenu funkciju:

$$A = a \times t^b \quad (2)$$

(gdje su: A= apsorpcija, t = vrijeme, a i b = parametri stepene funkcije) dobije se prvi izvod, tj. brzina promjene u datom vremenu:

$$v = a \times b \times t^{b-1} \quad (3)$$

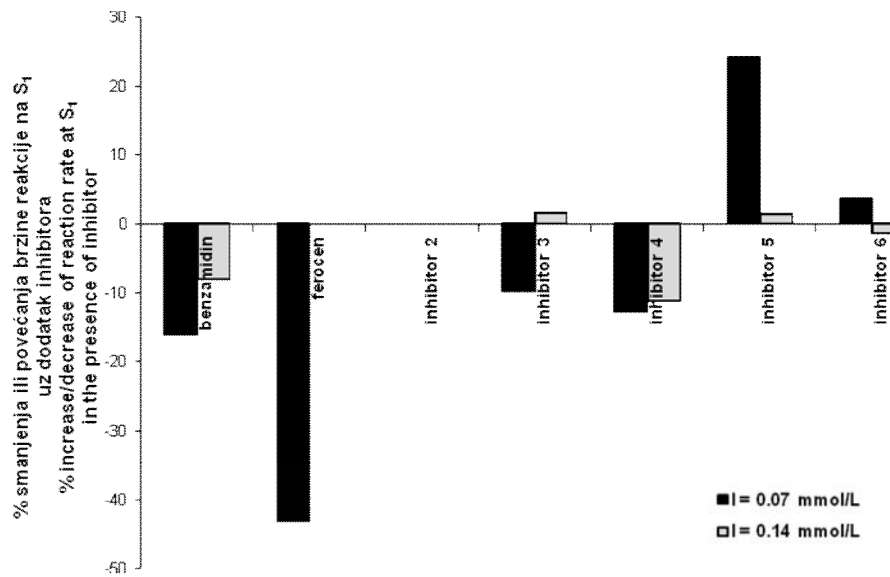
Na osnovu brzina nastajanja p-nitroanilina izračunatih preko prvog izvoda stepene funkcije (jednačina 3) u inicijalnoj fazi (t = 2.5 s), na kraju inicijalnog, brzog dijela reakcije (t = 50 s), te kada reakcija hidrolize ulazi u završnu fazu (t = 100 s), mogu se uporediti efekti pojedinih inhibitora na hidrolizu BAPNA-e pomoću lizata *E. coli*.

Procenat smanjenja brzine nastajanja produkta u prisustvu inhibitora je zatim izražen kao $(1 - v_1/v_0)\%$, odnosno $(1 - v_2/v_0)\%$, gdje su v_0, v_1 i v_2 brzine nastanka p-nitroanilina bez prisustva inhibitora, te uz I_1 i I_2 koncentraciju inhibitora, redom.

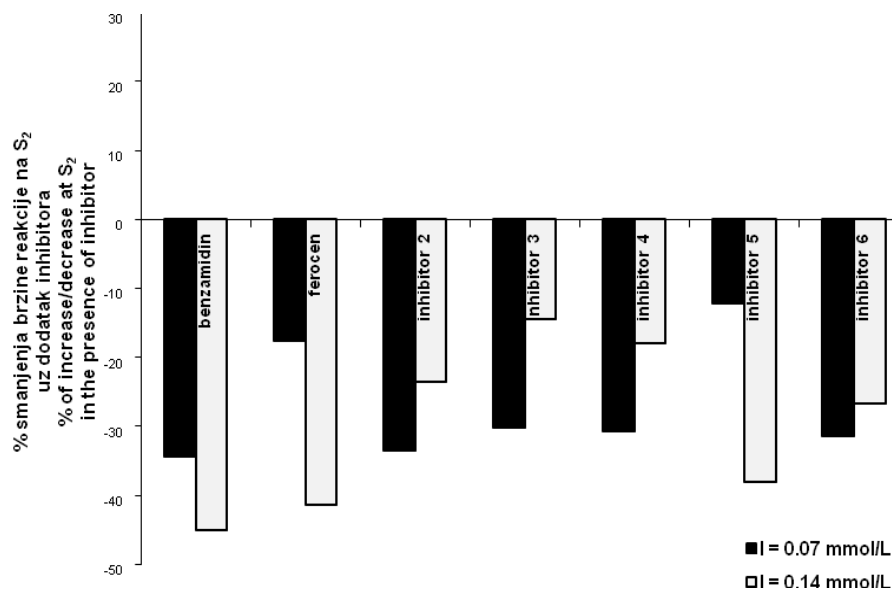
Ovako izračunat procenat smanjenja je najjače izražen kada se lizatu doda benzamidin (sistem S_2 , I_2 do 45% i S_1 , I_1 do 34%) i ferocen (sistem S_1 , I_1 do 43% i S_2 , I_2 do 41%). Slijede inhibitor 5 (S_2 , I_2 do 38%), inhibitor 2 (S_2 , I_1 do 33% i S_2 , I_2 do 23%), inhibitor 6 (S_2 , I_1 do 31% i S_2 , I_2 do 26%), inhibitor 3 (S_2 , I_1 do 30%), inhibitor 4 (S_2 , I_1 do 30%).

U nekim slučajevima dolazi i do porasta brzine hidrolize BAPNA-e: ferocen (S_1 , I_2 do 19% na t = 2.5 s) i inhibitor 5 (S_1 , I_1 do 24%, i S_1 , I_2 do 4%).

Uticaj inhibitora na brzinu reakcije, tj. % smanjenja ili povećanja brzine reakcije kada se doda inhibitor I_1 i I_2 koncentracije, nakon 100 sekundi toka reakcije, su prikazani na slikama 5 (koncentracija supstrata S_1) i 6 (koncentracija supstrata S_2).



Slika 5. Procenat smanjenja/povećanja brzine nastajanja produkta u prisustvu inhibitora na S₁
 Figure 5. Percentage of decrease/increase of the product formation rate in the presence of the inhibitor at S₁



Slika 6. Procenat smanjenja brzine nastajanja produkta u prisustvu inhibitora na S₂
 Figure 6. Percentage of the product formation rate reduction in the presence of the inhibitor at S₂

Tripsin i drugi enzimi iz klase tripsina koji su prisutni u lizatu su neprečišćeni, a sa manje čistim enzimom teže dolazi do formiranja enzim-supstrat ili enzim-inhibitor kompleksa. Niska im je koncentracija u lizatu i brzo dolazi do zasićenja, pa je konverzija supstrata mnogo slabija nego u eksperimentima sa čistim enzimom. Treba imati u vidu da BAPNA-u mogu razlagati i drugi proteolitički enzimi prisutni u lizatu (himotripsin, trombin, pankreasna elastaza, subtilisin ne mogu, ali mogu pepsin i svi enzimi iz tripsin-klase), a na njih ferocen i derivati mogu imati inhibirajuće ili aktivirajuće dejstvo.

Ipak je očito da se brzina nastajanja produkta reakcije pomoću lizata bakterije *E. coli* mijenja u prisustvu ferocena i ferocenovih derivata. Smanjenje brzine reakcije je generalno veće pri većoj koncentraciji BAPNA-e, što je u skladu sa osobinama akompetitivnih inhibitora, čiji je efekat inhibicije izraženiji kako koncentracija supstrata raste. Pri nižoj

koncentraciji BAPNA-e čak ima primjera aktivatorskog djelovanja na tripsin, što je bio slučaj i u eksperimentima sa čistim tripsinom (2). I benzamidin se pri istim koncentracijama ponaša isto kao ferocen i derivati ferocena: inhibicija je bolja pri većoj koncentraciji BAPNA-e. Međutim, kada se znatno poveća koncentracija benzamidina i smanji odnos $[S]/[I]$, onda se ponaša kao klasični kompetitivni inhibitor, čiji se efekat inhibicije najbolje vidi pri nižim koncentracijama supstrata (tabela 1, slike 2 i 3).

Praćenjem brzine razgradnje BAPNA-e pomoću lizata se pokazalo da se tripsin i drugi proteolitički enzimi koji razlažu BAPNA-u mogu inhibirati ferocenom i ferocenovim derivatima, a efekat inhibicije bi bio bolje definisan da su se koncentracije ovih jedinjenja u reakcionoj smjesi mogle povećati, kao što je to bilo moguće u slučaju referentnog inhibitora benzamidina.

ZAKLJUČAK

Razbijanjem ćelijske membrane i oslobađanjem ćelijskog sadržaja u kojem se, između ostalih, nalaze i enzimi iz klase tripsina, prevazilazi se problem permeabilnosti membrane, djelimično i eventualni metabolizam ferocena i njegovih derivata, a time i dostupnost ovih jedinjenja.

Na osnovu rezultata ispitivanja uticaja ferocena i njegovih derivata na aktivnost proteolitičkih enzima prisutnih u lizatu bakterije *E. coli*, može se zaključiti sljedeće:

Smanjenje brzine reakcije hidrolize N- α -benzoil-DL-arginin p-nitroanilida pomoću lizata *E. coli* je najviše izraženo u prisustvu benzamidina i ferocena, na odgovarajućim koncentracijama supstrata i inhibitora. Procenat smanjenja brzine reakcije uz benzamidin ide maksimalno do 45% u odnosu na brzinu reakcije hidrolize koja teče bez dodanog inhibitora, a u prisustvu ferocena brzina se maksimalno smanjuje do 43%. I drugi ferocenovni derivati dovode do smanjenja brzine nastajanja p-nitroanilina, pri odgovarajućim koncentracijama supstrata i inhibitora: benzil 1'-metoksikarbonil-1-ferocen karbamat do 38%, dimetilaminometil ferocen do 33%, benzil 1'-karboksi-1-ferocen karbamat do 31%, metil 1'-acetamidoferocen-1-karboksilat i 1'-acetamidoferocen-1-karboksilna kiselina do 30%.

Pri određenim kombinacijama koncentracija supstrata i inhibitora dolazi i do porasta brzine hidrolize BAPNA-e u slučaju ferocena i inhibitora. Generalno je efekat inhibicije veći na višim koncentracijama supstrata, što je odlika akompetitivnih inhibitora.

Problemi rastvorljivosti i stvaranje zamućenja pri dodavanju ferocena i derivata ferocena u sistem sa lizatom *E. coli* nisu dozvolili dalje povećanje koncentracije inhibitora i određivanje konstanti inhibicije, kao što je to bilo moguće sa benzamidinom. Pri vrlo visokim koncentracijama (maksimalno 10 mmol/L koncentracija u reakcionoj smjesi), benzamidin se ponaša kao tipični kompetitivni inhibitor i ima $K_i = 1.04$ mmol/L, dok je sa čistim tripsinom $K_i = 0.018$ mmol/L.

Razlike vrijednosti konstanti inhibicije se pripisuju benzamidinovom djelovanju i na druge enzime koji su prisutni u lizatu, jer je poznato da se benzamidin rutinski dodaje pri izolaciji RNK i DNK u 10 mmol/L koncentraciji da bi inhibirao proteaze iz lizata i spriječio neželjenu degradaciju nukleinskih kiselina (10). Veća koncentracija inhibitora je vjerovatno potrebna zbog drugih enzima u lizatu na koje se inhibitor na neki način „troši“ (zna se da benzamidin inhibira i druge proteaze osim tripsina: trombin, subtilisin, plazmin, triptazu) ili zato što je tripsin iz lizata manje pristupačan, kako inhibitoru da ga inhibira, tako i supstratu da ga konvertuje. Nepoznato djelovanje ferocena i derivata na druge enzime prisutne u lizatu ne dozvoljava direktno poređenje sa djelovanjem ovih jedinjenja na čist tripsin, ali je evidentno da djeluju inhibirajuće na hidrolizu supstrata proteolitičkih enzima.

LITERATURA

1. Kovjazin, R., T. Eldar, M. Patya, A. Vanichkin, H.M. Lander, A. Novogrodsky: Ferrocene-induced lymphocyte activation and antitumor activity is mediated by redox-sensitive signaling. *FASEB J.*, **17** (2003) 467-469.
2. Žabić, M., iZ. Kukrić: Inhibicija aktivnosti tripsina ferocenom i njegovim derivatima. *Glasnik hemičara, tehnologa i ekologa Republike Srpske*, **1** (2009) 43-49.
3. Kukrić, Z., and M. Žabić: Trypsin inhibition by ferrocene. *Acta Periodica Technologica*, **36** (2005) 203-213.
4. Žabić, M., Z. Kukrić, LJ. Topalić-Trivunović: Influence of ferrocene and its derivatives on growth of *Escherichia coli* (ATCC 25922). *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, **15** (2009) 251-256.
5. Barišić, L., V. Rapić, V. Kovač: Ferrocene compounds. XXIX. Efficient syntheses of 1'- aminoferrocene-1-carboxylic acid derivatives. *Croat. Chem. Acta*, **75** (2002) 199-210.
6. Fykse, E.M., J.S. Olsen, G. Skogan: Application of sonication to release DNA from *Bacillus cereus* for quantitative detection by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, **55** (2003) 1-10.
7. Kuboi, R., H. Umakoshi, N. Takagi; I. Komasa: Optimal disruption methods for the selective recovery of β -galactosidase from *Escherichia coli*. *J. Ferment. Bioeng.*, **4** (1995) 335-341.

8. Colin, B., P. Cleuziat, P. Broyer, C. Mobilat, S. Incardona: Method and apparatus for ultrasonic lysis of biological cells. US.Pat.Publ. 6686195 B1, 3 Feb (2004)
9. Terpin, P., M. Bezjak, H. Abramović: A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. Food Chem., **115** (2009) 740-744.
10. Glover, D., and B.D. Hames: DNA cloning: A practical approach. Volume 2. Expression systems, Oxford University Press, USA, Oxford (1995) p. 63.

INFLUENCE OF FERROCENE AND ITS DERIVATIVES ON THE ACTIVITY OF PROTEOLYTIC ENZYMES PRESENT IN *E. COLI* ATCC LYSATE

Mirjana Žabić¹, Zoran Kukrić², Ljiljana Topalić-Trivunović²

¹*University in Banjaluka, Faculty of Agriculture, Banja Luka, RS, B&H*

²*University in Banjaluka, Faculty of Technology, Banja Luka, RS, B&H*

Proteolytic enzymes catalyze the degradation of peptides in numerous biological processes; they play an important role in the pathogenesis of most diseases in the body, and therefore selective and effective inhibition of the proteases is the subject of many studies. Transition metals and their complexes can successfully inhibit some proteolytic enzymes, including trypsin. Their inhibitory activity is based on the direct binding to the active site of trypsin, mimicking five-coordinate transition state of the peptide hydrolysis reaction. Ferrocene belongs to the family of organometallic sandwich compounds with cyclopentadienyl rings that have potentially adequate geometry.

Ferrocene is already being used for therapeutic purposes, usually incorporated in biologically active compounds in order to obtain more selective and efficient drug, and at the experimental stage ferrocene itself was proved to be a potential anticancer agent.

The influence of ferrocene and selected ferrocene derivatives on trypsin activity using N- α -benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide as a substrate is already reported. Determined Michaelis-constants, maximum velocities and inhibition constants suggested that ferrocene and its derivatives inhibited purified trypsin, and that the type of inhibition was a competitive. The best inhibitor was dimethylaminomethyl ferrocene, with $K_i = 0.048$ mmol/L.

Ferrocene derivatives were selected so that, inter alia, they have an amino group in their structure, known to interact with Asp 189 in the trypsin's active site, thus improving inhibition. The influence of these compounds was also investigated in vivo, by monitoring the growth of bacteria Escherichia coli ATCC 25922. It was found that dimethylaminomethyl ferrocene had the strongest inhibitory effect on the bacterial growth, i.e. bacteria was growing twice slower in the presence of dimethylaminomethyl ferrocene. Ferrocene also significantly reduced the growth rate and the total number of bacteria (for almost 50%). The effects of ferrocene and its derivatives on proteolytic enzymes present in E. coli lysate were examined in this work. It was found that ferrocene caused the greatest rate reduction of p-nitroaniline formation from BAPNA (by nearly 50%). Ferrocene alone was efficient enough in the inhibition of BAPNA hydrolysis with E. coli lysate.

Key words: ferrocene, inhibition, trypsin, *E. coli* lysate

Rad primljen: 12. 09. 2013.

Rad prihvaćen: 03. 12. 2013