

## Ispitivanje kinetike inhibicije aktivnosti enzima acetilholinesteraze polifenolima zelenog čaja

---

*U radu je ispitivana inhibicija enzima acetilholinesteraze polifenolima zelenog čaja i kinetički parametri ove inhibicije. Step en inhibicije acetilholinesteraze je određen spektrofotometrijski. Na osnovu koncentracije proizvoda reakcije, 5-tio-2-nitrobenzoata, određeni su step en inhibicije i kinetički parametri Mihaelisova konstanta ( $K_m$ ), maksimalna brzina reakcije ( $V_{max}$ ) i konstanta inhibicije ( $K_i$ ). Rezultati istraživanja su pokazali da aktivnost acetilholinesteraze opada sa povećanjem koncentracije polifenola u ekstraktu zelenog čaja. Utvrđeno je da je inhibicija polifenolima zelenog čaja nekompetitivna, što predstavlja novi podatak u vezi sa inhibicijom acetilholinesteraze polifenolima zelenog čaja i može biti od značaja u daljim istraživanjima.*

---

### Uvod

Zeleni čaj se dobija iz biljke čaja (*Camellia sinensis*). Proizvodi se izlaganjem svežeg lišća čaja vodenoj pari na visokoj temperaturi koja inak -tiviše oksidacione enzime. Na taj način se sprečava degradacija polifenola. Katehini su polifenolne komponente koje čine do 30% (w/w) mase suvog lišća čaja (Baruah *et al.* 1986; Harbowy and Balentine 1997). U najvećoj koncentraciji je zastupljen epigalokatehin galat (EGCG), koji čini 61% derivata epikatehina u zelenom čaju (Agarwal *et al.* 1992; Katiyar *et al.* 1992). Polifenoli zelenog čaja poseduju antioksidantno, antikarcinogeno, anti-inflamatorno, antimikrobno dejstvo (Alschuler 1998; Graham 1992). Ekstrakt zelenog čaja ima inhibitorno dejstvo na acetilholinesterazu (Okello *et al.* 2004; Kim *et al.* 2004).

Reverzibilni inhibitori acetilholinesteraze (E.C.3.1.1.7), enzima odgovornog za hidrolizu neurotransmitera acetilholina, koriste se u terapiji glaukoma, mijastenije gravis i Alchajmerove bolesti. Alchajmerova bolest je neurodegenerativni poremećaj povezan sa gubitkom holinergičkih neurona u mozgu (Davies and Maloney 1976) uz sledstveno smanjenje nivoa acetilholina. Povećanje nivoa acetilholina, primenom reverzibilnih inhibitora

---

*Goran Tomić (1988),  
Omoljica, Patrijarha  
Arsenija Čarnojevića  
39/B, učenik 2.  
razreda Medicinske  
škole "Stevica  
Jovanović" u Pančevu*

*MENTOR:  
Natalija Polović,  
Hemijski fakultet,  
Beograd*

acetilholinesteraze, predstavlja potencijalnu terapiju Alchajmerove bolesti. Polifenoli zelenog čaja su interesanti kao potencijalna terapija ovih bolesti jer inhibiraju acetilholinesterazu. U ovim radovima nisu određeni kinetički parametri inhibicije.

Cilj ovog rada je određivanje kinetičkih parametara inhibicije acetilholinesteraze polifenolima zelenog čaja.

## Materijal i metode

Za pripremu ekstrakta nabavljen je suvi list zelenog čaja. Acetilholinesteraza (Tip VI-S) iz električne jegulje (*Electrophorus electricus*), Acetilthioholin jodid i 5,5'-ditio-bis- (2-nitrobenzojeva kiselina) (DTNB) su kupljeni u Sigma Chemical Co.

**Priprema vodenog ekstrakta polifenola.** 10 g usitnjenog suvog lišća zelenog čaja potopljeno je u 1000 mL destilovane ključale vode i mešano na magnetnoj mešalici 10 minuta na 90°C. Dobijeni ekstrakt je filtriran, a zatim je uparavan na 90°C do koncentracija polifenola od 1.3 g/L, 1.6 g/L, 2.2 g/L, 3.25 g/L (Caffin *et al.* 2004).

**Određivanje ukupnih polifenola u ekstraktu zelenog čaja.** Rastvor za merenje apsorbance je pripremljen uzimanjem 1 mL rastvora čaja, 4 mL destilovane vode, 5 mL rastvora FeSO<sub>4</sub> i KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, 15 mL rastvora fosfatnog pufera. Ovako pripremljenom rastvoru se određivala apsorbance na spektrofotometru (GBC Cintra 10 UV/VIS Spectrophotometer) na talasnoj dužini od 540 nm (Caffin *et al.* 2004).

Procenat ukupnih polifenola u ekstraktu izračunat je po formuli:

$$\text{Polifenoli (\%)} = 3.914 \cdot E \cdot \frac{V_o}{1000 \cdot W} \cdot V_i \cdot 100$$

gde je  $E$  – apsorbance,  $V_o$  – ukupna zapremina rastvora čaja (250 mL),  $V_i$  – zapremina rastvora čaja uzeta za merenje (1 mL),  $W$  – težina suvog uzorka čaja (2 g) (Caffin *et al.* 2004).

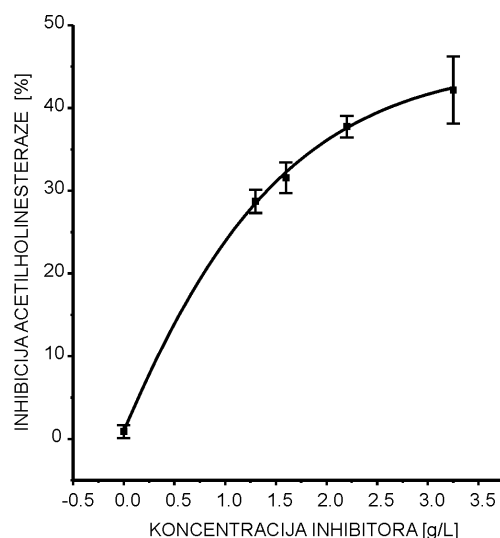
**Određivanje aktivnosti acetilholinesteraze.** Svi rastvori su pripremljeni u fosfatnom puferu (pH 7.4). U kivetu je dodato 60 L rastvora DTNB (0.01 M), 30 L vodenog rastvora inhibitora (1.3 g/L), 1000L rastvora acetilthioholina ( $6 \cdot 10^{-4}$  M), 1000 L rastvora fosfatnog pufera (0.067 M, pH 7.4). Reakcija je započeta dodavanjem 300 L rastvora acetilholinesteraze (0.5 U/mL). Alikvot od 30 L destilovane vode je korišćen kao kontrola za inhibitor. Apsorbance 5-tio-2-nitrobenzoata, anjona žute boje, registrovana je na talasnoj dužini od 414 nm, na svakih 30 sekundi u vremenskom periodu od 2 minuta. Proba koja se sastojala od svih reagenasa, sem enzima, izvedena je kako bi se u rezultatima eliminisala neenzimska hidroliza supstrata (Ellman *et al.* 1961; Hillhouse *et al.* 2004).

Korišćene su koncentracije inhibitora od 1.3, 1.6, 2.2 i 3.25 g/L. Koncentracija supstrata je menjana od 0.123 mM do 0.246 mM jer se metod određivanja  $K_m$  i  $V_{max}$  zasniva na merenju brzine reakcije pri različitim koncentracijama supstrata. Za svako merenje su izvedena tri ponavljanja. Na osnovu izmerenih apsorbanci nacrtana je kriva inhibicije.

Bilo je potrebno utvrditi kojem tipu inhibitora pripadaju polifenoli prilikom inhibicije acetilholinesteraze jer kod monosupstratnih enzimskih reakcija postoje tri tipa enzimskih inhibitora: kompetitivni, antikompetitivni, nekompetitivni inhibitori. Sastavljen je Lineweaver–Burkov dijagram i određeni su kinetički parametri  $K_m$ ,  $V_{max}$  i  $K_i$ . Analizom dobijenih podataka utvrđen je tip inhibicije.

## Rezultati i diskusija

Procenat polifenola u ispitivanom vodenom ekstraktu zelenog čaja iznosio je  $13 \pm 2\%$ . Rezultat pokazuje da je procenat polifenola u korišćenom zelenom čaju ispod nivoa navedenog u referencama (Baruah *et al.* 1986; Harbowy and Balentine 1997), gde se navode vrednosti do 30%, a što se moglo odraziti na inhibitornu aktivnost ekstrakta.



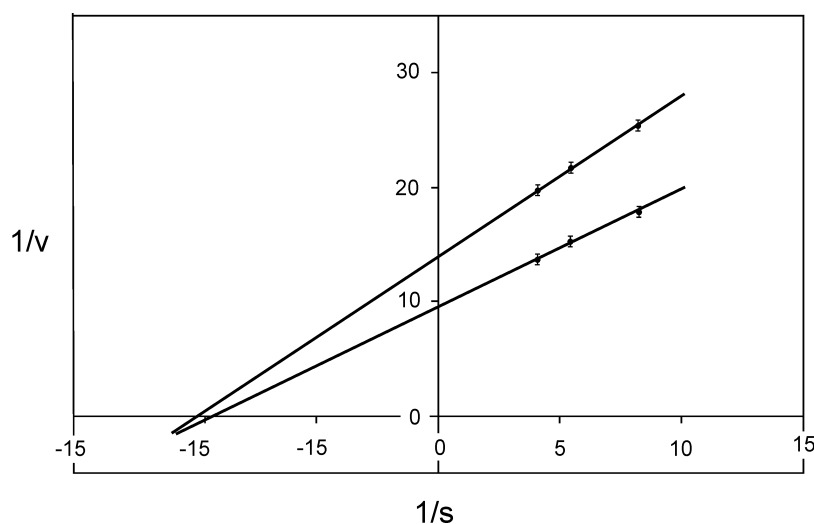
Slika 1.  
Kriva inhibicije aktivnosti acetilholinesteraze različitim koncentracijama polifenola

Figure 1.  
Curve of acetylcholinesterase activity inhibition caused by different polyphenol concentrations

Dobijeni rezultati pokazuju da postoji funkcionalna zavisnost između koncentracije polifenola u ekstraktu zelenog čaja i stepena inhibicije acetilholinesteraze, čime su potvrđeni podaci navedeni u referencama (Okello *et al.* 2004; Kim *et al.* 2004). Sa povećavanjem koncentracije polifenola u ekstraktu dolazi do smanjenja aktivnosti acetilholinesteraze. Ekstrakt zelenog čaja je izazvao  $42 \pm 5\%$  inhibiciju acetilholinesteraze pri koncentraciji

polifenola od 3.25 g/L (slika 1). Zbog nemogućnosti prečišćavanja ekstrakta nisu mogle biti korišćene veće koncentracije polifenola kako bi se utvrdila koncentracija polifenola koja dovodi do potpune inhibicije acetilholinesteraze.

Izračunavanjem recipročnih vrednosti brzine reakcije i recipročnih vrednosti koncentracije supstrata sastavljen je Lineweaver–Burkov dijagram (slika 2), pomoću koga su dobijene vrednosti  $K_m$  i  $V_{max}$ . Analizom ovih parametara utvrđen je tip inhibicije.  $K_m$  neinhibirane reakcije iznosila je  $0.118 \pm 0.024$  mM dok je  $V_{max}$  iznosila  $0.110 \pm 0.009$  mM/min. Dodavanjem ekstrakta zelenog čaja koncentracije polifenola od 1.3 g/L došlo je do smanjenja  $V_{max}$  ali je  $K_m$  ostala nepromenjena u okviru greške.  $K_m$  inhibirane reakcije iznosila je  $0.101 \pm 0.004$  mM dok je  $V_{max}$  iznosila  $0.072 \pm 0.001$  mM/min. Ovi podaci su pokazali da polifenoli zelenog čaja inhibiraju acetilholinesterazu nekompetitivno. Na osnovu ovog podatka zaključeno je da polifenoli zelenog čaja inhibiraju acetilholinesterazu ne utičući na aktivni centar enzima. Polifenoli se vezuju za molekul enzima van aktivnog centra. Na taj način dovode do promena u strukturi enzima čime sprečavaju njegovu katalitičku aktivnost.



Slika 2.  
Lineweaver–Burkov  
dijagram neinhibirane  
i inhibirane reakcije

Figure 2.  
Lineweaver–Burk plot  
of uninhibited and  
inhibited reaction.

Vrednost  $K_i$  je izračunata po formuli:

$$n = \frac{1 + \frac{[I]}{K_i}}{V_{max}}$$

gde je  $n$  – odsečak na y osi,  $[I]$  – koncentracija inhibitora,  $V_{\max}$  – maksimalna brzina reakcije,  $K_i$  – konstanta inhibicije.

Vrednost  $K_i$  iznosi  $1.02 \pm 0.02$  mg/mL.

Usled tehničkih nedostataka nije bilo moguće analizirati sastav pojedinačnih polifenola u ekstraktu. Zbog toga nije moguće diskutovati vrednost konstante inhibicije kako bi se izveli zaključci o afinitetu enzima prema inhibitoru.

## Zaključak

Rezultati pokazuju da polifenoli zelenog čaja inhibiraju acetilholinesterazu. Step en inhibicije zavisi od koncentracije polifenola u vodenom ekstraktu zelenog čaja. Sa povećanjem koncentracije polifenola u ekstraktu dolazi do smanjenja aktivnosti acetilholinesteraze. Ekstrakt zelenog čaja izaziva  $42 \pm 5\%$  inhibiciju acetilholinesteraze pri koncentraciji polifenola od 3.25 g/L.

Prilikom inhibicije dolazi do smanjenja  $K_{\max}$ , dok  $K_m$  ostaje nepromenjena. Na osnovu toga je zaključeno da je inhibicija nekompetitivna. Ovaj podatak ukazuje da polifenoli zelenog čaja inhibiraju acetilholinesterazu ne utičući na aktivni centar enzima.

Dalja istraživanja bi trebalo sprovesti sa pojedinačnim polifenolima zelenog čaja kako bi se utvrdilo koji od njih ispoljava najveći step en inhibicije. Bilo bi značajno ispitati da li postoji sinergistički efekat prilikom inhibicije. Potrebno je utvrditi na kojim mestima na molekulu enzima je moguće vezivanje polifenola. Na taj način bi se detaljnije razjasnio mehanizam inhibicije.

**Zahvalnost.** Najveću zahvalnost dugujem NIS Rafineriji nafte Pančevo, koja je obezbedila nepohodne hemikalije za izvođenje ovog istraživanja.

---

## Literatura

Agarwal R., Katiyar S., Zaidi I. A., Mukhtar H. 1992. Inhibition of skin tumor promoter-caused induction of epidermal ornithine decarboxylase in SENCAR mice by polyphenolic fraction isolated from green tea and its individual derivatives. *Cancer Research*, **52**: 3582-3588

Alschuler L. 1998. Green Tea: Healing tonic. *American Journal of Natural Medicine*, **5**: 28-31

Baruah S., Hazakira M., Mahanta D. K., Horita H., Murai T. 1986. The effect of plucking intervals on the chemical constituents of CTC black teas. *Agricultural and Biological Chemistry*, **50**: 1039-1041

Caffin N., D'Arcy B., Yao L., Rintoul G. 2004. *Developing an index of quality for Australian tea*. St. Lucia: The University of Queensland

- Davies P., Maloney A. J. F. 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*, **2**: 1403
- Ellman G. L., Courtney K. D., Andres B., Featherstone R. M. Jr. 1961. New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, **7**: 88–95
- Graham H. N. 1992. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Preventive Medicine*, **21**: 334-350
- Harbowy M. E., Balentine D. A. 1997. Tea chemistry. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **16** (5): 415–480
- Hillhouse B. J., Ming D. S., French C. J., Towers G. H. N. 2004. Acetylcholine Esterase Inhibitors in *Rhodiola rosea*. *Pharmaceutical Biology*, **42** (1): 68–72
- Katiyar S. K., Agarwal R., Wang Z. 1992. (–)-Epigallocatechin-3-gallate in *Camellia sinensis* leaves from Himalayan region of Sikkim: Inhibitory effects against biochemical events and tumor initiation in SENCAR mouse skin. *Nutrition and Cancer*, **18**: 73-83
- Kim H. K., Kim M., Kim S., Kim M., Chung J. H. 2004. Effects of Green Tea Polyphenol on Cognitive and Acetylcholinesterase Activities. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **68** (9): 1977-1979
- Okello E. J., Savelev S. U., Perry E. K. 2004. In vitro anti-beta-secretase and dual anti-cholinesterase activities of *Camellia sinensis* L. (tea) relevant to treatment of dementia. *Phytotherapy Research*, **18** (8): 624-627

---

Goran Tomic

## Kinetic Analysis of the Acetylcholinesterase Enzyme Activity Inhibition by the Green Tea Polyphenols

Green tea is obtained from the tea plant (*Camellia sinensis*). Green tea contains polyphenolic components called catechins. The tea catechins make as much as 30% (w/w) of the dry mass of tea (Baruah *et al.* 1986; Harbowy and Balentine 1997). Green tea polyphenols have demonstrated a wide range of biological activities. Green tea extract has an inhibitory effect upon acetylcholinesterase (Okello *et al.* 2004, Kim *et al.* 2004).

Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder associated with the loss of cholinergic neurons in the brain (Davies and Maloney 1967) and accompanied by a resulting acetylcholine level decline. Enhancement of the acetylcholine level, as a result of the application of reversible acetylcholinesterase inhibitors, is being seen as a potential therapy for Alzheimer's disease.

The purpose of this study is to determine the kinetic parameters of the acetylcholinesterase activity inhibition by green tea polyphenols.

Percent of polyphenols in used green tea extract was determined spectrophotometrically (Caffin *et al.* 2004). Dose-dependent inhibition of ace-

tylcholinesterase by green tea extract and inhibition kinetic parameters were determined using the spectrophotometric method of Ellman.

The polyphenol percentage in the tested green tea water extract was  $13\pm 2\%$ . This result shows that the polyphenol percentage in the used green tea was below the level in the references (Baruah *et al.* 1986; Harbowy and Balentine 1997). The green tea extract showed  $42\pm 5\%$  acetylcholinesterase inhibition at the polyphenol concentration of 3.25 g/L (Figure 1). The  $K_m$  and  $V_{max}$  values were ascertained based on the Lineweaver–Burk plot.  $K_m$  value of uninhibited reaction was  $0.118\pm 0.024$  mM while  $V_{max}$  value was  $0.1100.009$  mM/min.  $K_m$  value of inhibited reaction was  $0.101\pm 0.004$  mM while  $V_{max}$  value was  $0.072\pm 0.001$  mM/min when tested at polyphenol concentration of 1.3 g/L.  $V_{max}$  value decreased when inhibitor was added, while  $K_m$  value remained unchanged within the error limits. These results showed that green tea polyphenols inhibited acetylcholinesterase in a noncompetitive manner (Figure 2).  $K_i$  value was  $1.02\pm 0.02$  mg/mL.

According to the results obtained, the green tea polyphenols inhibit acetylcholinesterase. Inhibition reduces the  $V_{max}$  value, while  $K_m$  remains unchanged. This was the basis to conclude that inhibition was noncompetitive. Further analyses should be carried out on individual green tea polyphenols in order to establish which of them shows the highest degree of inhibition, as well as whether there is a synergetic effect during inhibition. It is necessary to establish the places on the enzyme molecule where polyphenol binding is possible. This would clarify the inhibition mechanism.

