

## Ispitivanje antiholinesterazne aktivnosti galne i p-kumarinske kiseline

---

*U radu je ispitivana inhibicija enzima acetilholinesteraze i butirilholinesteraze fenolnim kiselinama, galnom i p-kumarinskom kiselinom. Step en inhibicije enzima je određen spektrofotometrijski. Reverzibilnost inhibicije je ispitana putem gel filtracije. Određeni su kinetički parametri inhibicije butirilholinesteraze galnom kiselinom. Rezultati su pokazali da galna i p-kumarinska kiselina inhibiraju acetilholinesterazu i butirilholinesterazu. p-kumarinska kiselina je jači inhibitor u odnosu na galnu kiselinu. Galna kiselina neselektivno inhibira holinesteraze, dok acetilholinesteraza pokazuje veći afinitet prema p-kumarinskoj kiselini. Inhibicija ispitivanim fenolnim kiselinama je reverzibilna. Na osnovu kinetičkih parametara je zaključeno da je inhibicija butirilholinesteraze galnom kiselinom sloena i zahteva detaljnija istraživanja.*

---

### Uvod

Hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline su fenolne kiseline, ne-flavonoidne fenolne komponente, široko zastupljene u prirodnim proizvodima. Galna kiselina je hidroksibenzojeva kiselina koja čini 0.06–0.62 procenta suve mase zelenog čaja (*Camellia sinensis*) (Kuhr and Engelhardt 1991) dok je p-kumarinska kiselina najzastupljenija hidroksicimetna kiselina u prirodnim proizvodima. Pored brojnih bioloških svojstava koje poseduju fenolne komponente, utvrđeno je da polifenoli zelenog čaja poseduju inhibitorno dejstvo na acetilholinesterazu (Kim *et al.* 2004).

Povećanje holinergičke neurotransmisije se smatra jednim od načina u tretmanu bolesti kod kojih postoji snižen nivo acetilholina i to prvenstveno upotrebom reverzibilnih inhibitora acetilholinesteraze. Reverzibilnom inhibicijom acetilholinesteraze (EC 3.1.1.7) se povećava nivo acetilholina, što otvara mogućnost za terapiju ovih oboljenja. Međutim, selektivni inhibitori butirilholinesteraze (EC 3.1.1.8), enzima koji ima 65% identičnu sekvencu aminokiselina sa acetilholinesterazom (Soreq and Zaku 1993), takođe dovode do povećanja nivoa acetilholina (Giacobini 2000).

---

*Goran Tomić (1988), Omoljica, Patrijarha Arsenija Čarnojevića 39B, učenik 3. razreda Medicinske škole "Stevica Jovanović" u Pančevu*

Inhibicija oba enzima dovodi do poboljšanja kognitivnih funkcija u odnosu na period uzimanja selektivnih inhibitora acetilholinesteraze (Bartorelli *et al.* 2005). Zbog boljih rezultata u lečenju kognitivnih disfunkcija teži se pronalaženju inhibitora koji inhibiraju i acetilholinesterazu i butirilholinesterazu.

Iako je utvrđeno da polifenoli zelenog čaja inhibiraju acetilholinesterazu, do sada nisu izvedena ispitivanja antiholinesterazne aktivnosti pojedinačnih fenolnih komponenti iz biljaka. Nije poznato da li ispitivane fenolne kiseline, galna i p-kumarinska kiselina inhibiraju acetilholinesterazu i butirilholinesterazu.

**Cilj** ovog rada je utvrđivanje i karakterizacija antiholinesterazne aktivnosti galne kiseline i p-kumarinske kiseline.

## Materijal i metode

U radu su korišćeni Acetilholinesteraza (Tip VI-S) iz električne jegulje (*Electrophorus electricus*), butirilholinesteraza iz seruma konja, acetiltioholin jodid, butiriltioholin jodid, 5,5'-ditio-bis- (2-nitrobenzojeva kiselina) (DTNB), Galna kiselina i P-kumarinska kiselina (Sigma Chemical Co).

Određivanje aktivnosti acetilholinesteraze i butirilholinesteraze. Aktivnost holinesteraza je određena spektrofotometrijski, merenjem koncentracije proizvoda reakcije, 5-tio-2-nitrobenzoata. Apsorbanca 5-tio-2-nitrobenzoata je registrovana na svakih 5 sekundi u periodu od 2 minuta, na talasnoj dužini od 414 nm (Cintra 10 UV/VIS Spectrophotometer, GBC Spectral, Melbourne). Rastvori su pripremljeni u fosfatnom puferu (0.067 M, pH 7.4). Kao supstrat za acetilholinesterazu je korišćen acetiltioholin jodid, dok je kao supstrat za butirilholinesterazu korišćen butiriltioholin jodid. U kivetu je dodato 30  $\mu$ L rastvora DTNB (0.01 M), 1000  $\mu$ L rastvora inhibitora odgovarajuće koncentracije, 15  $\mu$ L rastvora supstrata (29.4 mM), 150  $\mu$ L rastvora enzima (0.5 U/mL). Alikvot od 1000 L fosfatnog pufera je korišćen kao kontrola za inhibitor. Finalna zapremina reakcione smeše iznosila je 1195  $\mu$ L. Koncentracija supstrata u reakcionoj smeši je iznosila 0.370 mM. 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).

Koncentracija galne kiseline u reakcionoj smeši iznosila je 83.6 mM, 66.9 mM, 50.2 mM, 41.8 mM i 20.9 mM. Koncentracija p-kumarinske kiseline u reakcionoj smeši iznosila je 41.8 mM, 20.9 mM, 10.4 mM, 5.2 mM i 2.6 mM. Nisu mogle biti korišćene veće koncentracije p-kumarinske kiseline zbog slabe rastvorljivosti u korišćenom fosfatnom puferu. Svako merenje je ponovljeno tri puta. Na osnovu dobijenih apsorbanci izračunate su početne brzine reakcija i nacrtane krive inhibicije za svaki inhibitor i enzim.

Određeni su kinetički parametri inhibicije butirilholinesteraze galnom kiselinom. Za određivanje Mihaelisove konstante ( $K_m$ ) i maksimalne brzine reakcije ( $V_{max}$ ) koncentracija butiriltioholin jodida je menjana od 0.0842 mM do 0.337 mM. Merenja određivanja  $K_m$  i  $V_{max}$  su ponovljena dva puta.

Ispitivanje reverzibilnosti inhibicije. Reverzibilnost inhibicije je proverena gel filtracijom. Zapremina kolone iznosila je 4 mL, dimenzija 15 × 0.8 cm. Kolona je ispunjena Sephadex-om G100 ekvilibrisanim u fosfatnom puferu (0.067 M, pH 7.4). Na kolonu je nanet uzorak od 40 μL rastvora butirilholinesteraze i inhibitora. Sakupljane su frakcije od 500 μL. Aktivnost enzima u dobijenim frakcijama je analizirana metodom po Ellman-u. žuta boja je bila indikator aktivnosti enzima u spot testu. Na ovaj način je kvalitativno ispitana reverzibilnost inhibicije.

## Rezultati i diskusija

Galna kiselina i p-kumarinska kiselina inhibiraju acetilholinesterazu i butirilholinesterazu. Galna kiselina je izazvala 98.6% inhibiciju acetilholinesteraze pri koncentraciji od 83.6 mM. Inhibicija butirilholinesteraze pri istoj koncentraciji galne kiseline iznosila je  $99.3 \pm 0.3\%$ . Ispitivanje inhibicije pri različitim koncentracijama galne kiseline pokazalo je da sa povećanjem koncentracije galne kiseline dolazi do smanjenja aktivnosti oba enzima (slika 1A i 1B).

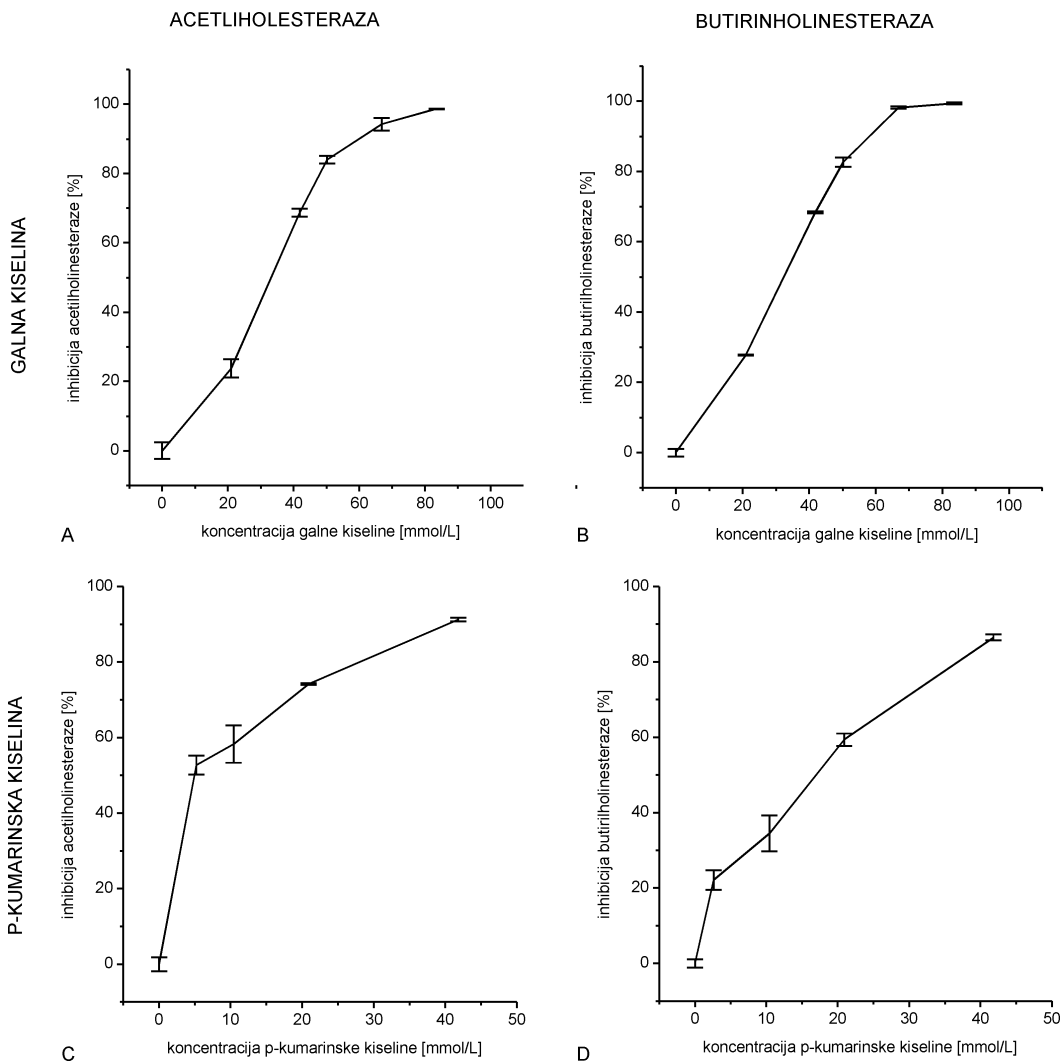
Acetilholinesteraza i butirilholinesteraza pokazuju sličan afinitet prema galnoj kiselini pri korišćenim koncentracijama ovog inhibitora. Na osnovu toga se može zaključiti da galna kiselina neselektivno inhibira holinesteraze što je značajan podatak jer se i težilo pronalaženju neselektivnog inhibitora.

P-kumarinska kiselina je izazvala  $91.3 \pm 0.5\%$  inhibiciju acetilholinesteraze i  $86.4 \pm 0.8\%$  inhibiciju butirilholinesteraze pri koncentraciji od 41.8 mM (slika 1C i 1D).

Acetilholinesteraza pokazuje veći afinitet prema p-kumarinskoj kiselini u odnosu na butirilholinesterazu što ukazuje da je acetilholinesteraza podložnija inhibiciji p-kumarinskom kiselinom.

Poređenjem procenta inhibicije acetilholinesteraze i butirilholinesteraze pri istim koncentracijama galne i p-kumarinske kiseline zaključeno je da p-kumarinska kiselina postiže viši stepen inhibicije holinesteraza u poređenju sa galnom kiselinom tj. da je jači inhibitor od galne kiseline.

Usled nestabilnosti acetilholinesteraze dalja karakterizacija inhibicije fenolnim kiselinama je izvedena samo na butirilholinesterazi.



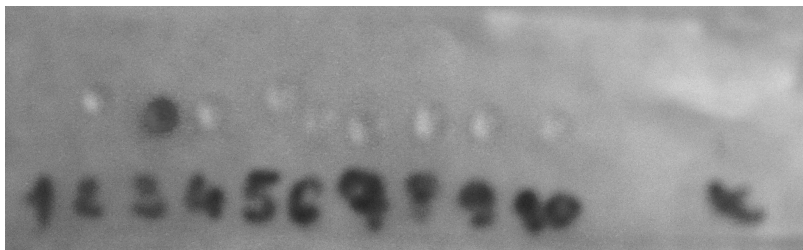
Slika 1.

- A. Kriva inhibicije aktivnosti acetilholinesteraze galnom kiselinom
- B. Kriva inhibicije aktivnosti butirilholinesteraze galnom kiselinom
- C. Kriva inhibicije aktivnosti acetilholinesteraze p-kumarinskom kiselinom
- D. Kriva inhibicije aktivnosti butirilholinesteraze p-kumarinskom kiselinom

Figure 1.

- A. Curve of acetylcholinesterase activity inhibition caused by gallic acid
- B. Curve of butyrylcholinesterase activity inhibition caused by gallic acid
- C. Curve of acetylcholinesterase activity inhibition caused by p-coumaric acid
- D. Curve of butyrylcholinesterase activity inhibition caused by p-coumaric acid

Reverzibilnost inhibicije je kvalitativno utvrđena gel filtracijom. Pošto butirilholinesteraza ima veliku molekulska masu dobijena je među prvim frakcijama. Indikator enzimske aktivnosti je bila žuta boja u frakciji. Enzimska aktivnost je uočena u trećoj frakciji (slika 2). (Slika je prikazana u plavom kanalu radi boljeg uočavanja enzimske aktivnosti u trećoj frakciji.) Dobijeni rezultati ukazuju na reverzibilno vezivanje molekula p-kumarinske kiseline za molekul butirilholinesteraze.



Slika 2.  
Frakcije dobijene nakon gel filtracije smeše butirilholinesteraze i p-kumarinske kiseline

Figure 2.  
Gel filtrated fractions of butyrylcholinesterase and p-coumaric acid mixture

Karakterizacija inhibicije butirilholinesteraze galnom kiselinom je izvršena određivanjem kinetičkih parametara  $K_m$  i  $V_{max}$  pri različitim koncentracijama supstrata i inhibitora (tabela 1).

Tabela 1.  $K_m$  i  $V_{max}$  vrednosti butirilholinesteraze pri različitim koncentracijama galne kiseline

Konc. galne kiseline [mM/L]	$K_m$ [mM/L]	$V_{max}$ [mM/min]
0	$0.17 \pm 0.01$	$0.035 \pm 0.001$
40.8	$0.22 \pm 0.03$	$0.029 \pm 0.002$
50.2	$0.14 \pm 0.03$	$0.022 \pm 0.003$
66.9	$0.14 \pm 0.06$	$0.014 \pm 0.003$
83.6	$0.26 \pm 0.04$	$0.011 \pm 0.001$

Sa povećavanjem koncentracije galne kiseline dolazi do postepenog smanjenja maksimalne brzine reakcije.  $K_m$  vrednost se povećava pri dodavanju galne kiseline koncentracije 40.8 mM što ukazuje na smanjenje afiniteta enzima prema supstratu u prisustvu inhibitora ove koncentracije. Pri dodavanju galne kiseline koncentracije 50.2 mM i 66.9 mM dolazi do smanjenja  $K_m$  vrednosti. Ovaj rezultat se može objasniti time što vezivanjem galne kiseline u određenom opsegu koncentracija dolazi do porasta afiniteta enzima prema supstratu odnosno smanjenja afiniteta enzima prema inhibitoru. Ukoliko se u određenom opsegu koncentracija galna kiselina veže sa jednu subjedinicu tetramera butirilholinesteraze moguće je da to dovodi do konformacionih promena koje se prenose na ostale sub-

jedinice. To rezultura povećanjem afiniteta ostalih subjedinica prema supstratu ili smanjenjem afiniteta ostalih subjedinica prema inhibitoru. Dodavanjem galne kiseline koncentracije 83.6 mM dolazi do povećanja vrednosti  $K_m$ . U ovom slučaju je koncentracija galne kiseline tolika da dovodi do smanjenja afiniteta butirilholinesteraze prema supstratu. Dobijeni rezultati pokazuju da je inhibicija butirilholinesteraze galnom kiselinom složena i da se ne može objasniti postojećim kinetičkim modelima.

## Zaključak

Rezultati pokazuju da ispitivane fenolne kiseline poseduju antiholinesterazna svojstva. Galna i p-kumarinska kiselina inhibiraju acetilholinesterazu i butirholinesterazu. Galna kiselina dovodi do 98.6% inhibicije acetilholinesteraze i  $99.3 \pm 0.3\%$  inhibicije acetilholinesteraze pri koncentraciji od 83.6 mM. P-kumarinska kiselina poseduje jače inhibitorno dejstvo na oba enzima. Pri koncentraciji od 40.8 mM dovodi do  $91.3 \pm 0.5\%$  inhibicije acetilholinesteraze i  $86.4 \pm 0.8\%$  inhibicije butirilholinesteraze. Galna kiselina ne pokazuje selektivnost pri inhibiciji holinesteraza dok acetilholinesteraza pokazuje veći afinitet prema p-kumarinskoj kiselini nego butirilholinesteraza. Inhibicija butirilholinesteraze galnom i p-kumarinskom kiselinom je reverzibilna. Pri inhibiciji butirilholinesteraze galnom kiselinom dolazi do postepenog opadanja vrednosti  $V_{max}$  dok se  $K_m$  vrednost povećava pri koncentraciji inhibitora od 40.8 mM, opada pri koncentracijama od 50.2 mM i 66.9 mM a zatim ponovo raste pri koncentraciji od 83.6 mM. Ovi podaci ukazuju da u određenom opsegu koncentracija galne kiseline dolazi do porasta afiniteta enzima prema supstratu ili smanjenja afiniteta enzima prema inhibitoru.

Inhibicija butirilholinesteraze galnom kiselinom je složena i izuzetno interesantna za dalje istraživanje. Korišćenom metodom se nisu mogli razjasniti kinetički parametri inhibicije. Potrebno je koristiti preciznije metode kojim bi se razjasnio mehanizam inhibicije na molekulskom nivou. Moguće je da pri inhibiciji dolazi do konformacionih promena među subjedinicama tetramera butirilholinesteraze i da te interakcije daju za posledicu ovakve kinetičke parametre. Neophodno je obaviti ispitivanja sa ostalim predstavnicima fenolnih kiselina kako bi se utvrdilo da li postoje sličnosti u inhibiciji i koja fenolna kiselina ispoljava najjači inhibitorni efekat.

**Zahvalnost.** Zahvaljujem se NIS Rafineriji nafte Pančevo na pomoći u nabavci hemikalija, kao i Milošu Rokiću na sugestijama i pomoći pri izvođenju istraživanja.

## Literatura

- Bartorelli L., Giraldi C., Saccardo M., Cummarata S., Bottini G., Fasanaro A. M., Trequattrini A. 2005. Effects of switching from an AChE inhibitor to a dual AChE-BuChE inhibitor in patients with Alzheimer's disease. *Current Medicinal Research and Opinion*, **21** (11): 1809-1818.
- 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.
- Giacobini E. 2000. *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*. London: Martin Dunitz
- 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
- 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
- Kuhr S., Engelhardt U. H. 1991. Determination of flavanols, theogallin, gallic acid and caffeine in tea using HPLC. *Springer Berlin / Heidelberg*, **192** (6): 526-529
- Soreq H., Zaku H. 1993. *Human cholinesterases and anticholinesterases*. New York: Academic Press

---

Goran Tomić

### Anticholinesterase Activity of Gallic Acid and p-Coumaric Acid

Phenolic acids are non-flavonoid phenolic components of plants. In addition to a variety of biological activities of phenolic compounds, it has been determined that polyphenols have anticholinesterase properties (Kim *et al.* 2004), but anticholinesterase properties of phenolic acids have not been determined yet.

Enhancement of the acetylcholine level, as a result of the application of reversible acetylcholinesterase inhibitors, is seen as a potential therapy for diseases accompanied by a resulting acetylcholine level decline. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase share 65% of sequence homology (Soreq and Zaku 1993). Butyrylcholinesterase can hydrolyse acetylcholine with lower affinity. Inhibition of both acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase increases cognitive function (Bartorelli *et al.* 2005).

The purpose of this study was to determine and characterize anticholinesterase properties of gallic and p-coumaric acid.

Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities were determined using the spectrophotometric method of Ellman. Reversibility of butyrylcholinesterase inhibition was determined by gel filtration.

According to the results obtained, gallic and p-coumaric acid have anticholinesterase properties. Gallic acid showed 98.6% acetylcholinesterase inhibition at a concentration of 83.6 mM. At the same concentration, gallic acid showed  $99.3 \pm 0.3\%$  butyrylcholinesterase inhibition. P-coumaric acid showed  $91.3 \pm 0.5\%$  acetylcholinesterase inhibition and  $86.4 \pm 0.8\%$  butyrylcholinesterase inhibition at a concentration of 41.8 mM. Statistical analysis showed that gallic acid is a nonselective inhibitor of cholinesterases. Acetylcholinesterase showed a higher affinity for p-coumaric acid. Statistical analysis showed that p-coumaric acid is a stronger inhibitor of cholinesterases than gallic acid. Butyrylcholinesterase inhibition by gallic acid and p-coumaric acid is reversible. Kinetic analysis showed that butyrylcholinesterase inhibition by gallic acid is complicated and needs more detailed research.

Gallic and p-coumaric acid have anticholinesterase properties. Inhibition is reversible. P-coumaric acid showed higher inhibition than gallic acid. Butyrylcholinesterase inhibition mechanism is complex. Further analyses should be carried out on other phenolic acids. Inhibition mechanism should be clarified by more detailed research.

