

## Uticaj miricetina i kampferola na aktivnost enzima glutacion reduktaze

---

*Ispitivan je uticaj flavonola miricetina i kampferola na aktivnost enzima glutacion reduktaze. Izvršena je kinetička karakterizacija enzima, određivanjem vrednosti Vmax i Km. Aktivnost glutacion reduktaze merena je spektrofotometrijski uz korišćenje konstantnih koncentracija supstrata i promenljive koncentracije miricetina i kampferola. Oba flavonola uzrokovala su smanjenje aktivnosti glutacion reduktaze. Pri koncentraciji kampferola od 0.53 μM/L aktivnost glutacion reduktaze bila je 74±4%, dok je pri istoj koncentraciji miricetina aktivnost enzima bila 50±4 %. Pri koncentracijama višim od 60 μM/L dolazi do potpune inhibicije enzima. Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne grupe i grupa sa flavonoidima (p<0.01), kao i između dve grupe sa flavonoidima (p<0.01). Miricetin je ispoljio jače inhibitorno dejstvo od kampferola, verovatno usled razlike u strukturi. Radi boljeg shvatanja mehanizma inhibicije potrebno je uraditi kinetička i strukturna istraživanja inhibicije sa oba inhibitora.*

---

### Uvod

Glutation-glutaredoxin i tioredoxin sistemi predstavljaju dva srodna sistema čija je funkcija u ćeliji raznovrsna. Jedna od osnovnih funkcija jeste prenos elektrona do ribonukleotid reduktaze, a samim tim i redukcija ribonukleotida koji ulaze u sastav nukleinskih kiselina DNK i RNK (Holmgren 1989). Pored toga imaju važnu ulogu u regulisanju mnogih metaboličkih enzima koji obrazuju disulfide tokom katalize (Rietsch i Beckwith 1998). Glutation-glutaredoxin sistem čine NADPH, glutacion reduk-

taza, glutacion i glutaredoxin (Holmgren 1989). Ključni regulatorni enzimi koji određuju redoks stanje tioredoxin i glutacion-glutaredoxin sistema jesu tioredoxin reduktaza i glutacion reduktaza (Trotter i Grant 2003).

Glutation reduktaza (GR, EC 1.6.4.2) katališe reakciju redukcije oksidovanog glutaciona (GSSG) do glutaciona (GSH). Neophodna je za održavanje glutacion redoks ciklusa koji omogućava održavanje odgovarajućeg nivoa redukovanog glutaciona u ćeliji.

Ovaj homodimerni enzim je član porodice flavo-protein disulfid oksidoreduktaza. Svaka subjedinica ima četiri domena: FAD-vezujući domen, NADPH-vezujući domen, centralni i međuvezni domen. Vezujuće mesto oksidovanog glutaciona je sastavljeno od nastavaka sa obe subjednice, tako da je samo dimerna forma enzima aktivna (Bashir *et al.* 1995).

Kampferol i miricetin su flavonoidi, koji zajedno sa kvercetinom pripadaju podgrupi flavonola. Flavonoli su polifenolski sekundarni biljni metaboliti. Prisutni su u mnogim biljkama u različitim koncentracijama.

Flavonoli pokazuju snažno antioksidantno dejstvo. Pored poznatog antioksidantnog dejstva, ova grupa flavonoida u novijim istraživanjima pokazuje inhibitorno, odnosno aktivirajuće dejstvo na određene enzime koji pripadaju oksido-reduktazama. Ispitivanjem delovanja kampferola i miricetina pokazano je njihovo inhibitorno dejstvo na aktivnost tioredoxin reduktaze (Jun *et al.* 2006), dok je kvercetin pokazao aktivirajuće dejstvo na glutacion peroksidazu, mada nije objašnjen sam mehanizam aktivacije (Nagata *et al.* 1999).

Cilj ovog istraživanja je da se ispita dejstvo miricetina i kampferola na aktivnost glutacion reduktaze zbog njihove strukturne sličnosti sa kvercetinom.

---

*Vladan Martinović (1988), Banatsko Karađorđevo, Đure Jakšića BB, učenik 4. razreda Zrenjaninske gimnazije*

## Materijal i metode

Korišćene su sledeće hemikalije (Sigma Aldrich Chem. Corp.):

- Glutation reduktaza iz pekarskog kvasca (*S. cerevisiae*)
- $\beta$ -nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) ~ 95%
- oksidovani L – glutation (GSSG)
- kampferol u obliku praška 90% (HPLC)
- miricetin u obliku kristala 96%

Sve ostale korišćene hemikalije su bile p.a ili research grade čistoće.

### Kinetička karakterizacija preparata glutacione reduktaze

Radi odabira koncentracija supstrata koje će se koristiti pri određivanju aktivnosti glutacione reduktaze, urađena je karakterizacija enzima koja podrazumeva određivanje kinetičkih parametara: maksimalne brzine ( $V_{max}$ ) i Michaelis-Menteove konstante ( $K_m$ ).

Korišćeno je po deset različitih koncentracija oba supstrata (tabela 1) tako da je ukupno bilo 100 reakcionih smeša sa različitim koncentracijama oba supstrata.

Tabela 1. Koncentracije supstrata za kinetičku karakterizaciju

| NADPH [ $\mu$ M/L] | GSSG [M/L] |
|--------------------|------------|
| 0.67               | 10.67      |
| 1.33               | 26.67      |
| 2.67               | 45.33      |
| 4                  | 53.33      |
| 5.33               | 82.67      |
| 8                  | 109.33     |
| 9.33               | 138.67     |
| 10.67              | 165.33     |
| 13.33              | 194.67     |
| 17.33              | 248        |

Aktivnost glutacione reduktaze je određivana spektrofotometrijski. Promena apsorbancije merena je na 340 nm tokom 1 minuta sa očitavanjem apsorbancije na svake 3 sekunde (GBC UV-VIS Cintra 10).

## Određivanje aktivnosti glutacione reduktaze pod dejstvom flavonola

Za određivanje aktivnosti glutacione reduktaze pod dejstvom flavonoida korišćene su konstantne koncentracije oba supstrata: 248  $\mu$ M GSSG i 17  $\mu$ M NADPH.

Korišćeno je devet koncentracija miricetina i sedam koncentracija kampferola. Odabir koncentracija flavonola je izvršen na osnovu literature (Lu *et al.* 2006). Koncentracije miricetina bile su: 0.26, 0.53, 1, 5, 10, 15, 20, 60, 80  $\mu$ M/L, dok su koncentracije kampferola iznosile 0.53, 1, 5, 10, 20, 60, 80  $\mu$ M/L.

Zapremina reakcione smeše za sve analize bila je 1500  $\mu$ L. U sastav reakcione smeše ulazili su:

1. Destilovana voda, 100  $\mu$ L
2. 1  $\mu$ M rastvor GSSG, 380  $\mu$ L
3. 200  $\mu$ M rastvor NADPH. 130  $\mu$ L
4. Određene zapremine flavonola radi postizanja željene koncentracije
5. 100 mM Fosfatni pufer sa 3.4 mM EDTA, pH 7.6 – do 1475  $\mu$ L.
6. 25  $\mu$ L glutacione reduktaze.

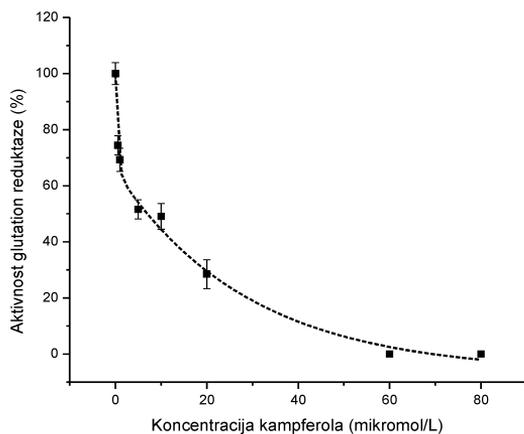
Kontrolna grupa je, umesto flavonola, sadržala fosfatni pufer u istoj zapremini. Aktivnost glutacione reduktaze određivana je spektrofotometrijski. Promena apsorbancije u zavisnosti od vremena merena je na 340 nm 1 minut sa očitavanjem apsorbancije na svake 3 sekunde (GBC UV-VIS Cintra 10).

Merjenja za sve tri grupe ponovljena su četiri puta.

## Rezultati i diskusija

Radi određivanja koncentracija supstrata koje će se koristiti pri izračunavanju početnih brzina reakcija sa različitim koncentracijama oba napravljene su Lineweaver-Burkov dijagram na osnovu koga su određeni kinetički parametri  $K_m$  i  $V_{max}$ . Vrednost  $K_m$  za GSSG iznosila je 201.47  $\mu$ M/L, a za NADPH 16.8  $\mu$ M/L, dok je  $V_{max}$  bila 0.0085  $\mu$ M/L. Na osnovu dobijenih kinetičkih parametara odabrane su koncentracije supstrata koje su korišćene prilikom određivanja aktivnosti glutacione reduktaze usled uticaja flavonola.

Izračunavanjem početnih brzina pod dejstvom različitih koncentracija miricetina i kampferola dobi-



Slika 1.  
Uticaj kampferola na aktivnost glutation reduktaze

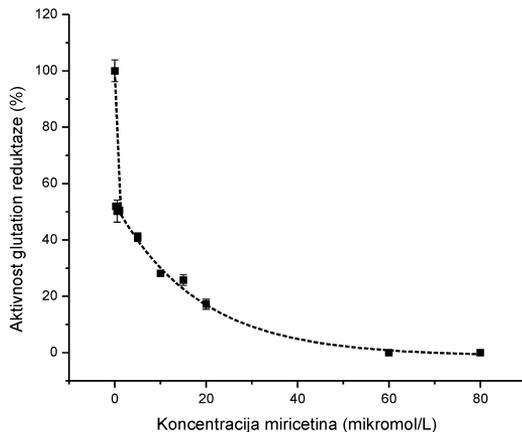
Figure 1.  
Effect of kaempferol on glutathione reductase activity

jene su vrednosti stepena aktivnosti glutation reduktaze. Rezultati su prikazani na graficima zavisnosti koncentracije flavonola i aktivnosti glutation reduktaze (slika 1 i 2).

Oba flavonola uzrokovala su smanjenje aktivnosti glutation reduktaze što je i bilo očekivano na osnovu prethodnih istraživanja sa sličnim enzimima i flavonoidima (Lu *et al.* 2006; Paulikova i Berczeliova 2005). Dobijeni rezultati pokazuju da postoji funkcionalna zavisnost između koncentracije flavonola i stepena inhibicije enzima. Povećanjem koncentracija flavonola dolazi do potpune inhibicije enzimske aktivnosti. Enzim postaje neaktivan pri koncentracijama preko 60 μM/L oba flavonola.

Pri koncentraciji kampferola od 0.53 μM/L aktivnost glutation reduktaze bila je 74 ± 4 %, dok je pri istoj koncentraciji miricetina aktivnost enzima bila 50 ± 4 %. Pri koncentracijama od 60 μM/L i višim dolazi do potpune inhibicije enzima (slike 1 i 2).

Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne grupe i grupa sa flavonoidima ( $p < 0.01$ ) pri najnižim koncentracijama flavonoida – 0.26 μM/L miricetina i 0.53 μM/L kampferola. Takođe statistički značajna razlika je utvrđena i između dve grupe sa flavonoidima miricetinom i kampferolom ( $p < 0.01$ ), pri istim koncentracijama od 0.53 μM/L. Ovo pokazuje da je miricetin jači inhibitor glutation



Slika 2.  
Uticaj miricetina na aktivnost glutation reduktaze

Figure 2.  
Effect of myricetin on glutathione reductase activity

reduktaze od kampferola. Mogući razlog je razlika u strukturi ova dva flavonoida jer miricetin poseduje tri hidroksilne grupe na svom C prstenu, dok kampferol ima samo jednu.

## Zaključak

Oba flavonola, miricetin i kampferol, jesu snažni inhibitori glutation reduktaze. Njihovo inhibično dejstvo ispoljava se i pri koncentracijama od 0.53 μM/L, što ukazuje da su dovoljne i niske koncentracije miricetina i kampferola za inhibiciju glutation reduktaze. Miricetin je jači inhibitor od kampferola verovatno usled strukturne različitosti u broju hidroksilnih grupa. Radi boljeg shvatanja mehanizma inhibicije potrebno je uraditi kinetička istraživanja inhibicije oba inhibitora kao i strukturno ispitivanje mehanizma inhibicije, radi saznanja koje hemijske grupe na flavonolima su odgovorne za inhibiciju enzima, odnosno da li broj hidroksilnih grupa na C prstenu flavonola ima uticaj na stepen inhibicije glutation reduktaze.

**Zahvalnost.** Zahvaljujem se kompaniji Van Drunen Farms-Europe iz Banatskog Karađorđeva na nabavci potrebnih hemikalija, bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć.

## Literatura

Arner E., Holmgren A. 2000. Physiological function of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem*, **267**: 6102.

Bashir A., Perham R. N., Scrutton N. S., Berry A. 1995. Altering kinetic mechanism and enzyme stability by mutagenesis of the dimer interface of glutathione reductase. *Biochem. J.*, **312**: 527.

Winkel-Shirley B. 2001. Flavonoid Biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Phys.*, **126**: 485.

Dolphin D., Poulson R., Avramovic O. 1989. *Glutathione: Chemical, Biochemical and Metabolic Aspects*. London: Wiley.

Holmgren A. 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. of Biological Chemistry*, **264**: 13963.

Massey V., Williams C. H. 1965. On the mechanism of yeast glutathione reductase. *J. Biol. Chem.*, **240** (11): 4470.

Meister A. 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal of Biological Chemistry*, **263**: 17205.

Nagata H., Takekoshi S., Takagi T., Honma T., Watanabe K. 1999. Antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase. *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, **24** (1): 1.

Paulikova H., Berczeliova E. 2005. The effects of quercetin and galangin on glutathione reductase. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, **149** (2): 497.

Prieto-Alamo M., Jurado J., Gallardo-Madueno R., Monje-Casas F., Holmgren A., Pueyo C. 2000. Transcriptional Regulation of glutaredoxin and thioredoxin pathways and related enzymes in response to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, **275**: 13398.

Rietsch A., Beckwith J. 1998. The Genetics of Disulfide Bonds Metabolism. *Annual Review of Genetics*, **32**: 163.

Trotter E., Grant C. 2003. Non-reciprocal regulation of the redox state of the glutathione-glutaredoxin and thioredoxin systems. *EMBO reports*, **4** (2): 184.

Lu J., Papp L. V., Fang J., Rodriguez-Nieto S., Zhivotovsky B., Holmgren A. 2006. Inhibition of Mammalian Thioredoxin Reductase by Some Flavonoids: Implications for Myricetin and Quercetin Anticancer Activity. *Cancer Research*, **66**: 4410.

---

Vladan Martinović

## Effect of Myricetin and Kaempferol on Glutathione Reductase Activity

Glutathione-glutaredoxin and thioredoxin systems are two related systems whose functions in cells are versatile. One of the most important functions is the electron transfer to ribonucleotid reductase and the reduction of ribonucleotids which are components of DNA and RNA. The glutathione-glutaredoxin system is composed of NADPH, glutathione reductase, glutathione and glutaredoxin. (Holmgren 1989). Glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) catalyses the reaction of reduction of oxidized glutathione (GSSG) to glutathione (GSH). GR is needed for maintaining glutathione homeostasis in the cell.

Kaempferol and myricetin, along with quercetin, are flavonoids from the subgroup of flavonols. Apart from their known antioxidant effect, this group of flavonoids showed an inhibitory or activatory effect on some enzymes which belong to the oxidoreductase family in recent research (Lu *et al.* 2006; Paulikova and Berczeliova 2005).

The aim of this research was to investigate the effect of myricetin and kaempferol on glutathione reductase activity.

For the determination of glutathione reductase activity under the effect of flavonoids, constant concentrations of substrates were used: 248  $\mu\text{M}$  GSSG and 17  $\mu\text{M}$  NADPH, which were previously determined by the kinetic characterization of the enzyme. Nine concentrations of myricetin and seven concentrations of kaempferol were used. Concentrations were chosen based upon literary data (Lu *et al.*, 2006). Myricetin concentrations were: 0.26, 0.53, 1, 5, 10, 15, 20, 60, 80  $\mu\text{M/L}$ , while kaempferol concentrations were 0.53, 1, 5, 10, 20, 60, 80  $\mu\text{M/L}$ . The control group contained the same volume of phosphate buffer. Glutathione reductase activity was measured by a spectrophotometric assay. Absorbance change was measured at 340 nm for 1 minute with absorbance reading every 3 seconds. (GBC UV-VIS Cintra 10).

Both flavonols caused a decrease in glutathione reductase activity, which was expected based on pre-

vious research with similar enzymes and flavonoides. The results show that between flavonoid concentration and the level of inhibition there exists a functional dependency. With concentrations of kaempferol of  $0.53 \mu\text{M/L}$ , the glutathione reductase activity was  $74 \pm 4\%$ , while with the same myricetin concentration the enzyme activity was  $50 \pm 4\%$ . Complete inhibition is noticed at  $60 \mu\text{M/L}$  concentrations of both flavonols.

It is shown that even low concentrations of flavonols inhibit glutathione reductase, and that myricetin is more efficient. A possible explanation for this is the structural difference between these two flavonols, which is manifested in the number of hydroxyl groups at the C ring of the flavonols. In the future, a structural analysis of the enzyme-inhibitor complex is needed, as well as kinetic studies of glutathione reductase inhibition with myricetin and kaempferol.

