
Aleksej Drino

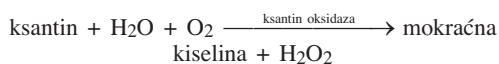
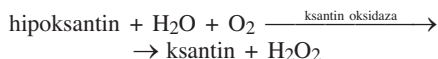
Ispitivanje uticaja kvercetina na aktivnost katalaze u in vivo model sistemu *Helix pomatia*

Ispitivano je indirektno dejstvo kvercetina na aktivnost enzima oksidativnog stresa katalaze, na in vivo modelu *Helix pomatia*. Puževi su tretirani rastvorima olovo acetata kao prooksidanta, i kvercetina kao antioksidanta i inhibitora ksantin oksidaze. Aktivnost katalaze je merena spektrofotometrijski na 240 nm. Rezultati su pokazali da je rastvor olovo acetata inhibirao katalazu, dok kvercetin doprinosi očuvanju aktivnosti enzima. Mala razlika u aktivnosti katalaze u kontrolnoj grupi i grupi tretiranoj kvercetinom se pripisuje inhibitornom dejstvu kompleksa kvercetina sa olovom na ksantin oksidazu. Inhibicijom ksantin oksidaze se smanjuje koncentracija vodonik peroksida, čime se smanjuje i aktivnost enzima. Pređašnji in vitro rezultati pokazuju slične rezultate kompleksiranja flavonoida sa metalima.

Uvod

Flavonoli su polifenolski sekundarni biljni metaboliti. Kvercetin je flavonoid koji, zajedno sa kampfrolom i miricetinom pripada podgrupi flavonola. Ova jedinjenja pokazuju jako antioksidantno dejstvo (Pietta 2000). Pored antioksidantnog, ova grupa flavonoida pokazuje inhibitorno (Jun *et al.* 2006), kao i aktivirajuće dejstvo (Nagata *et al.* 1999) na određene enzime koji pripadaju oksidoreduktazama, tako što interaguje sa njihovom FAD (flavin adenin dinukleotid) komponentom (Džamić 1990). U ranijim istraživanjima je dokazano da kvercetin inhibira enzim ksantin oksidaze, mada sam mehanizam inhibicije nije u potpunosti razjašnjen (Bindoli *et al.* 1985; Hanaee *et al.* 2004),

Ksantin oksidaza je enzim koji pripada grupi flavoproteina, i u sebi sadrži 8 atoma gvožđa, 2 atoma molibdena i 2 FAD-vezujuća domena. Igra važnu ulogu u procesu stvaranja mokraćne kiseline, koja je krajnji produkt metabolizma nukleinskih kiselina. Naime, mokraćna kiselina se obrazuje iz ksantina, oksidativnim putem, dejstvom ksantin oksidaze. Ksantin potreban za proizvodnju mokraćne kiseline se dobija oksidacijom hipoksantina, takođe dejstvom ksantin oksidaze, kao što je naznačeno sledećom šemom:.



Kao što se vidi, u reakcijama koje katalizuje ksantin oksidaza stvara se vodonik peroksid. Vodonik peroksid je jak prooksidans i predstavlja jednu od najbitnijih reaktivnih kiseoničnih vrsta.

Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli koji u spoljašnjoj elektronskoj orbiti sadrže jedan ili više nesparenih elektrona. Veoma su reaktivni i imaju sposobnost da izazovu niz lančanih reakcija u kojima dalje nastaju novi slobodni radikali. U uslovima kada produkcija slobodnih radikala prevazilazi kapacitet antioksidantne zaštite nastaje stanje koje se naziva oksidativni stres. Ispoljavanju njihovih štetnih dejstava se suprotstavljaju razni neenzimski i enzimski antioksidansi. Razlaganje vodonik peroksida u organizmu se vrši posredstvom enzima katalaze (Đorović 2006).

Enzim katalaza se nalazi u skoro svim organizmima koji su izloženi kiseoniku. Njegova glavna uloga je reakcija oksidoredukcije u kojima se H_2O_2 raspada na vodu i kiseonik. U reakciji se jedan

Aleksej Drino (1991), Valjevo, Karađorđeva 65/a, učenik 3. Razreda Valjevske gimnazije

MENTOR: Luka Mihajlović, Hemijski fakultet, Beograd

molekul ponaša kao donor elektrona i oksiduje se do O₂, dok drugi kao akceptor i redukuje se do H₂O:



Cilj ovog rada je da se utvrdi da li kvercetin inhibitornim dejstvom na ksantin oksidazu i sledstvenim smanjenjem koncentracije vodonik peroksida utiče na aktivnost katalaze.

Materijali i metode

Laboratorijske životinje. Dvadeset jedan vingo gradarski puž (vrste *Helix pomatia*), teških prosečno 30 grama su korišćeni u ovom eksperimentu. Aktivni puževi su uhvaćeni u svom prirodnom staništu, u blizini Istraživačke Stanice Petnica. Po donošenju u laboratoriju su čuvani u providnim staklenim akvarijumima na sobnoj temperaturi. Bili su izloženi prirodnoj smeni dana i noći, i bili su hranjeni kupusom, šargarepom i travom.

Puževi su bili podeljeni u tri grupe po sedam životinja. Svaka grupa je dva puta tretirana sa po 100 μL datih rastvora, u razmaku od 20 minuta. Shema tretmana je prikazana u tabeli 1.

Tabela 1. Rastvori kojim su tretirani puževi

Grupa	Prvo ubrizgavanje	Drugo ubrizgavanje
Kontrola	10% dimetilsufoksid u fiziološkom rastvoru	10% dimetilsufoksid u fiziološkom rastvoru
Kvercetin	olovo-acetat u fiziološkom rastvoru u koncentraciji od 200 ppm	Rastvor kvercetina u 10% dimetilsufoksidu u koncentraciji od 0.6 ppm
Olovo-acetat	olovo-acetat u fiziološkom rastvoru u koncentraciji od 200 ppm	10% dimetilsufoksid u fiziološkom rastvoru

Kontrolna grupa je primila dimetilsulfoksid da bi se otklonio mogući uticaj rastvarača na rezultate.

Rastvor olovo-acetata je korišćen za indukciju oksidativnog stresa u obe grupe, i podaci za korišćenje su nađeni u literaturi (Massó *et al.* 2007). Olovo acetat grupa je bila korišćena kao kontrolni parametar za indukovani oksidativni stres.

Priprema organa za biohemijske analize. Nakon 48 h od tretiranja rastvorima, hepatopankreasi puževa sve tri grupe su pripremljeni za merenje enzimske aktivnosti zamrzavanjem puževa u zamrzivaču na 4 h. Nakon disekcije i izolacije hepatopankreasa, uzeti su uzorci težine 0.5 g. Uzorci su homogenizovani u avanu sa 6 mL 0.1 M kalijum fosfatnog pufera pH 7.4. Ceo postupak je rađen na ledu. Homogenat je odmah centrifugiran 25 minuta na 3000 rpm. Uzeto je dva uzorka supernatanta od po 1 mL za svaki uzorak hepatopankreasa, koji su nadalje čuvani u frižideru (5°C).

Merenje aktivnosti katalaze. Merenje aktivnosti katalaze izvršeno je spektrofotometrijskim merenjem absorbance vodonik peroksida na 240 nm. Rastvor za merenje je napravljen tako što je 54 mM H₂O₂ u 50 mM fosfatnom puferu pH 7.0 pomešan sa 20 μL supernatanta homogenata svakog uzorka, do ukupne zapremine od 3 mL. Promena absorbance je praćena 3 minuta.

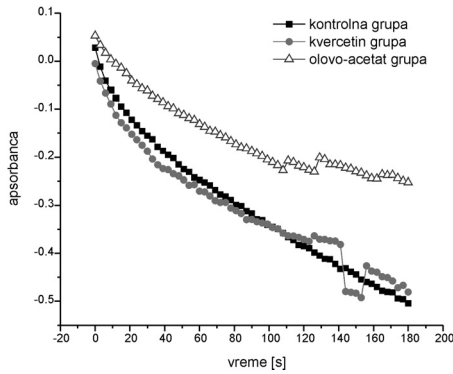
Statistička obrada. Dobijeni podaci su obrađeni u programu za statističku obradu Origin 8.5. Izračunate su srednje vrednosti absorbanci rastvora homogenata hepatopankreasa puževa u jedinici vremena za svaku grupu. Dobijeni podaci su prikazani grafički u vremenu (slika 1). Ovim je dobijena kriva promene absorbanci koja je proporcionalna enzimskoj aktivnosti. Kriva je linearizovana, da bi se preko koeficijenta našla aktivnost enzima.

Enzimska aktivnost sve tri grupe je iskazana preko promene koncentracije vodonik peroksida u vremenu. Dobijeni podaci su prikazani na slici 2. Koncentracija je izračunata preko Lambert-Beerove formule.

Rezultati i diskusija

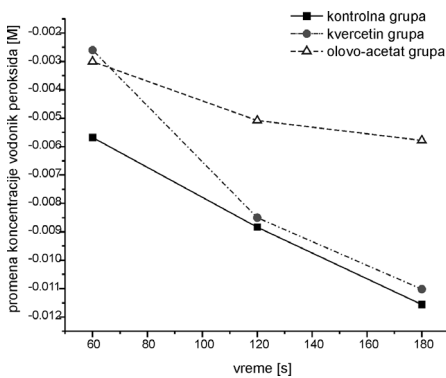
Dobijeni rezultati su prikazani grafički na slici 1. Nakon računanja koncentracija vodonik peroksida i grafičke obrade dobijen je grafik na slici 2.

Poređenjem grafika absorbanci hepatopankreasa i njihovih parametara, kao i grafika i tabele pada koncentracija vodonik peroksida za sve tri grupe zaključeno je da najveću aktivnost ima grupa 1. Suprotno očekivanjima, grupa 3 je imala najmanju aktivnost enzima. Ova pojava se može objasniti inhibicijom enzima samim olovom, kao jednim od pripadnika teških metala. Ovo je primer nekompetitivne inhibicije, koja se mogla dogoditi na dva sledeća načina:



Slika 1. Grafik pada absorbanca ekstrakta hepatopankreasa puževa.

Figure 1. Curve of absorbance fall of snails liver extract



Slika 2. promena koncentracije vodonik peroksida po grupama

Figure 2. The change of hydrogen peroxide concentration in different groups

1. Prvi mehanizam inhibicije uključuje reakciju olova sa tiolnom grupom bočnog niza cisteina, što za posledicu ima stvaranje merkaptida, i tako remeti disulfidne mostove. Ovo je posledica velikog afiniteta olova prema sumporu, te je ovaj mehanizam i najviše proučavan.

2. Drugi mehanizam se bazira na elektronegativnosti olova. Joni olova, tj, teških metala uopšte, mogu da poremete elektrostatičke interakcije između suprotno naelektrisanih aminokiselina. Ovo se dešava zato što joni metala imaju veliku neto pozitivnu šaržu, te se kompetitivno vezuju za negativno naele-

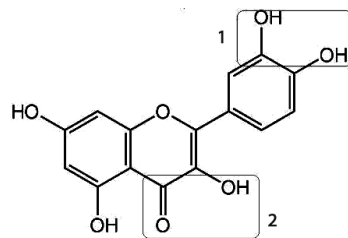
ktrisanu komponentu iz te interakcije, i tako je neutrališu i destabilizuju (Petrović i Velimirović 2006)

Ovim mehanizmima su destrukuirane 2 od 4 vrste interakcija koje učestvuju u stabilizaciji terciarne strukture proteina. Oba mehanizma za posledicu imaju parcijalnu denaturaciju polipeptida, čineći ga podložnim agregaciji.

Ne može se sigurno tvrditi da olovo nije indukovalo oksidativni stres bez merenja lipidne peroksidacije, ili merenja aktivnosti još nekog enzima oksidativnog stresa (SOD, peroksidaza). Olovo je jak prooksidans, kao i svi teški metali, pa je vrlo verovatno da je olovo indukovalo oksidativni stres, ali i inhibiralo enzim katalazu.

Iz posmatranja grafika nameće se pitanje zašto grupa 2 koja je primila istu koncentraciju olova kao i grupa 3 nije bila podložna inhibiranju katalaze olovom. Ova pojava se može objasniti interakcijom kvercetina i olova. Po nekim autorima, deo aktivnost svih flavonoida, i samim tim i kvercetina se zasniva na mogućnosti da reaguje sa jonima metala, gradeći komplekse sa njima (Bors *et al.* 1990). Afinitet flavonoida prema jonima metala počiva na činjenici da u svakom molekulu flavonoida postoje hemijske grupe koji mogu reagovati sa jonima metala. U slučaju kvercetina to mogu biti:

- 3',4' dihidroksi grupe na B prstenu (zaokružene okvirom 1 na slici 3)
- 3-hidroksi ili 5-hidroksi sa 4-karbonilnom grupom na C prstenu (zaokružene okvirom 2 na slici 3)

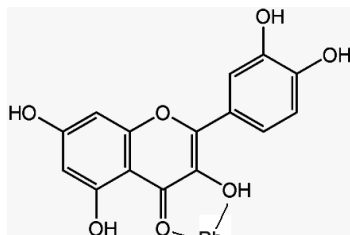


Slika 3. Struktura kvercetina

Figure 3. Structure of quercetin

Oba zaokružena dela mogu reagovati sa jonima metala, mada je češće rasprostranjeno mišljenje da je u pitanju deo na C prstenu nego orto-orjentisane

hidroksilne grupe na B prstenu, što pokazuju podaci dobijeni IR spektroskopijom (Maleševi Kuntić 2007). Prema dosadašnjim rezultatima dobijenim in vitro ispitivanjima najverovatniji izgled kompleksa kvercetina sa olovom je (slika 4):



Slika 4. Struktura kvercetin-olovo kompleksa.

Figure 4. Structure of quercetin-Pb complex

Pravljenjem kompleksa sa metalima flavonoidi sprečavaju generaciju slobodnih radikala od strane metala, te tako štite žive organizme od moguće štete izazvane slobodnim radikalima. Kostyuk i saradnici su pokazali da su kompleksi rutina, dihidrokvercetina i epikatehina u kombinaciji sa Fe(II), Fe(III), Cu(II) or Zn(II) mnogo efikasniji u direktnoj reakciji sa slobodnim radikalim nego sami flavonoidi, najverovatnije zbog dodatog superoksid dismutaznog centra (Kostyuk *et al.* 2001). Potvrđeno je takođe da Fe(II) i Cu(II) kompleksi sa rutinom smanjuju produkciju slobodnih radikala od strane ksantin oksidaze (Afanas'ev *et al.* 2001). Ovim se može objasniti manja aktivnost katalaze u grupi 2 nego u kontrolnoj grupi. Odatle možemo zaključiti da inhibiranje ksantin oksidaze, posrednim uticajem, preko smanjivanja koncentracije vodonik peroksida, u određenom postotku smanjuje i aktivnost katalaze.

Ovi kompleksi su veoma stabilni i imaju vema važnu ulogu u organizmu. Flavonoidi pravljenjem kompleksa ograničavaju ili potpuno suprimiraju toksičnost jona metala, kao što je slučaj u grupi 2. Ukupna antioksidantna aktivnost flavonoida se pripisuje direktnoj reakciji sa slobodnim radikalima u sinergiji sa mogućnošću kompleksiranja sa jonima metala, koji se u živim organizmima ponašaju kao prooksidanti. Kompleksiranje metala sa flavonoidima može zaustaviti proces proizvodnje slobodnih radikala od strane metala, te tako flavonoidi se mogu primenjivati kao tretman u trovanju teškim metalima.

Zaključak

Prema podacima koji su dobijeni pokazano je da kvercetin pravi komplekse sa olovom. Rezultati takođe pokazuju da inhibiranje ksantin oksidaze kompleksom kvercetin-olovo, posredno, u malom postotku menja aktivnost katalaze. Dalja istraživanja se mogu baviti sposobnostima kompleksiranja raznih flavonoida i teških metala u različitim in vivo model sistemima, kao i karakterizaciju raznih kompleksa, što bi dovelo do moguće terapijske primene flavonoida pri hroničnom trovanju teškim metalima.

Zahvalnost. Zahvaljujem se mom prijatelju i budućem kolegi Bojanu Petroviću, za podršku i pomoć pri pisanju rada. Takođe se zahvaljujem Marku Barošu, za pomoć pri tehničkoj realizaciji rada.

Literatura

- Anafas'ev I. B., Ostrakhovitch E. A., Mikhail E. V., Ibragimova G. A., Korkina L. G. 2001. *Biochem. Pharmacology*, **61**: 677
- Bindoli A., Valente M., Cavallini L. 1985. Inhibitory action of quercetin on xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase activity. *Pharmacol. Res. Commun.*, **17**: 831.
- Bors W., Heller W., Michel C., Saran, M. 1990. Flavonoids as antioxidant: Determination of radical-scavenging activities. *Methods in Enzymology*, **186**: 334.
- Džamić M. 1990. *Biohemija*. Beograd: Naučna knjiga
- Đorović Đ. 2006. Uticaj slobodnih radikala na aktivnost citohrom c oksidaze-protektivna dejstva zelenog čaja. *Petičke sveske*, 61: 303
- Hanaee J., Rashidi M., Delazar A., Piroozpanah S. 2004. Onion, a Potent Inhibitor of Xanthine Oxidase. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 4: 243.
- Lu J., Papp L., 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.
- Kostyuk V. A., Potapovich A. I., Vladykovskaya E. N., Korkina L. G., Afanas'ev I. B. 2001. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **385**: 129

Massó E. L., Corredor L., Antonio M. T. 2007. Oxidative damage in liver after perinatal intoxication with lead and/or cadmium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **21**: 210.

Malešev D., Kuntić V. 2007. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. *Journal of the Serbian Chemical Society*, **72**: 921.

Nowakowska A., Swiderska-Kolacz G., Rogalska J., Caputa M. 2009. Antioxidants and oxidative stress in *Helix pomatia* snails during estivation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **150**: 481.

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. *The Tokai journal of Experimental and Clinical Medicine*, **24**: 1.

Petrović J., Velimirović S. 2006. *Hemija za IV razred gimnazije*. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva

Pietta P. G. 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, **63**: 1035.

Soczynska-Kordala M., Bakowska A., Oszmianski J., Gabrielska J. 2001. Metal ion-flavonoid associations in bilayer phospholipid membranes. *Cellular & molecular biology letters*, **6**: 277.

Aleksej Drino

Effect of Quercetin on Catalase Activity in *In vivo* System of *Helix pomatia*

Quercetin belongs to flavonols, a subgroup of flavonoids. It is well known that flavonoids are antioxidants, and they also show signs of prohibitory and inhibitory action on some enzymes like xantin oxidase. Xantin oxidase is an important enzyme in our body, and it is essential in nucleic acid metabolism. It catalases the reaction of turning xantin into uric acid. In that reaction a big amount of hydrogen peroxide is released. Catalase is an enzyme that protects all living organisms from the effect of free radicals such as hydrogen peroxide.

The aim of this study was to determine if the inhibitory action of quercetin will significantly affect catalase activity in garden snail (*Helix Pomatia*).

We have studied catalase activity in snail's hepatopancreas homogenate. Twenty-one adult garden snails were used. After separation into three groups (control, quercetin and oxidative stress group) the snails in group two and group three were treated with the appropriate solutions of quercetin and lead-acetate. Snails were then frozen, dissected, and 0.5 gram samples of their liver were homogenized and centrifuged. Samples of supernatant were collected and stored in a fridge (5°C). Hydrogen peroxide was added in the supernatant sample and the change of absorbance was measured at 240 nm for three minutes.

It has been concluded that in group three lead has inhibited the enzyme. In group two, which received the same concentration, the enzyme was protected by chelating activity of quercetin. It has also been shown that quercetin, via his inhibitory effect on xanthine oxidase, does effect the catalase activity. Further research can study chelating activities of quercetin in different *in vivo* models, and could perform complete characterization of these complexes. This could lead to therapeutical usage of those flavonols in case of heavy metal poisoning. 