

Inhibicija aktivnosti butirilholinesteraze kvercetinom i miricetinom

Ispitivana je inhibicija enzima butirilholinesteraze flavonolima, kvercetinom i miricetinom. Inhibicija je određivana spektrofotometrijski, merenjem koncentracije 5-tio-2-nitrobenzoata, koji je proizvod u reakcionoj smeši. Rezultati pokazuju da aktivnost butirilholinesteraze opada srazmerno sa povećanjem koncentracije kvercetina i miricetina. 200 μM kvercetin pokazao je inhibiciju od 73%, a 170 μM miricetin 71%. Dobijene IC_{50} vrednosti ukazuju na jače inhibitorno delovanje miricetina u odnosu na kvercetin. Dalja ispitivanja bi mogla pokazati sinergističko dejstvo ova dva inhibitora, kao i sinergizam sa drugim polifenolnim jedinjenjima.

Uvod

Butirilholinesteraza (BChE) je enzim iz grupe esteraza koji ima sposobnost katalizovanja reakcije hidrolize acetilholina. Strukturno je veoma sličan enzimu acetilholinesteraza (AChE) (Soreq i Zakut 1993). Butirilholinesteraza, pored esterazne aktivnosti, poseduje i peptidaznu aktivnost, što uslovljava razvoj i napredovanje Alchajmerove bolesti (Chattonet i Masson 1986). Ovaj enzim uključen je u stvaranju β -amiloidnog proteina iz prekursora amiloidnog proteina. Agregacija β -amiloidnog proteina predstavlja važan momenat u nastanku, progresiji i patogenezi Alchajmerove bolesti (Selkoe 2001). Sprečavanje stvaranja ovih agregata može se postići selektivnom inhibicijom BChE (Guillozet *et al.* 1997).

Polifenoli su hemijska jedinjenja zastupljena u biljkama, koja se sastoje od više fenolnih grupa u molekulu. Utvrđeno je da polifenoli iz zelenog i crnog čaja, kao i fenolne kiseline, galna i p-kumarin-

ska kiselina, inhibitorno deluju na acetilholinesterazu i butirilholinesterazu (Okello *et al.* 2004). Ispitivan je i inhibitorni uticaj različitih ekstrakata bogatih polifenolima, kao što su ekstrakt štavolja, medunike i kupine (Tomić i Vaslić 2007). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je stepen inhibicije ekstraktima veći nego čistim supstancama, galnom i elaginskom kiselinom. To ukazuje na mogućnost postojanja i drugih polifenolnih jedinjenja prisutnih u tim ekstraktima koja pojedinačno ili sinergistički inhibiraju enzim. Ovi podaci otvaraju pitanje uticaja različitih polifenolnih jedinjenja na butirilholinesterazu.

Flavonoli predstavljaju podgrupu velike klase polifenolnih jedinjenja. U saglasnosti sa sličnošću u hemijskoj strukturi sa već ispitivanim jedinjenjima, kvercetin i miricetin (koji spadaju u polifenole) odabrani su za rad radi detaljnijeg ispitivanja jedinjenja prisutnih u ekstraktima, a zaslužnih za antiholinesteraznu aktivnost.

Cilj ovog rada je ispitivanje inhibicije aktivnosti butirilholinesteraze kvercetinom i miricetinom.

Materijal i metode

U radu su korišćeni butirilholinesteraza iz seruma konja, butirilthioholin jodid, 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoeva kiselina) (DTNB), kvercetin i miricetin (Sigma Chemical Co.).

Određivanje aktivnosti butirilholinesteraze.

Enzimaska aktivnost butirilholinesteraze određena je spektrofotometrijski, merenjem koncentracije 5-tio-2-nitrobenzoata koji nastaje u reakcionoj smeši. ApSORBANCA 5-tio-2-nitrobenzoata merena je na talasnoj dužini 414 nm. Merenja su vršena na spektrofotometru Cintra 10 UV/VIS, GBC Spectral, Melbourne. Svi rastvori, sem rastvora inhibitora, pripremljeni su u 0.067 M fosfatnom puferu pH 7.4. U kivetu je dodato 60 μL 0.01 M rastvora DTNB, 30 μL metanolnog rastvora inhibitora, 1000 μL

Milica Đokić (1991), Leskovac, Jovana Cvijića 37, učenica 3. razreda Medicinske škole u Leskovcu

MENTOR: Goran Tomić, student Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

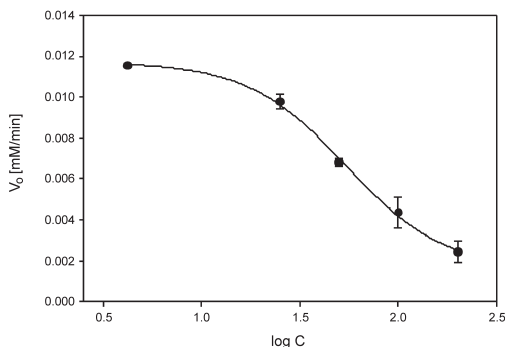
0.925 mM rastvora butiriltioholin jodida, 1000 μL 0.067 M fosfatnog pufera pH 7.4. Kao kontrola za inhibitor rastvor metanola. Proba koja se sastojala od svih reagenasa, sem enzima, izvedena je kako bi se u rezultatima eliminisala neenzimska hidroliza supstrata.

Reakcija je započeta dodavanjem 150 μL 1 U/mL rastvora butirilholinesteraze (Tomić i Vaslić 2007). Finalna zapremina reakcione smeše, nakon dodavanja enzima, iznosila je 2240 μL .

Koncentracije kvercetina i miricetina u reakciji bile su 200, 100, 50, 25 i 4.2 μM i 170, 85, 42.5, 21.25, 3.5 i 1.75 μM , respektivno.

Rezultati i diskusija

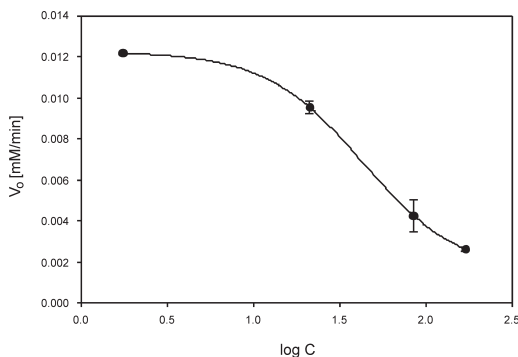
Ispitivanja su pokazala da kvercetin i miricetin inhibiraju butirilholinesterazu. Aktivnost butirilholinesteraze smanjuje se pri povećanju koncentracije inhibitora. Dobijeni rezultati su u skladu sa utvrđenom antiholinesteraznom aktivnošću ekstrakata bogatih polifenolima, što ukazuje na to da su ova jedinjenja jedna od glavnih komponenti odgovnih za inhibiciju holinesteraza.



Slika 1. Kriva inhibicije aktivnosti butirilholinesteraze kvercetinom

Figure 1. Curve of butyrylcholinesterase activity inhibition caused by quercetin

Kvercetin u koncentraciji od 200 μM izazvao je inhibiciju butirilholinesteraze od 73%, a 170 μM miricetin 71% inhibiciju. Iz rezultata se može zaključiti i to da kvercetin i miricetin, kao jedinjenja iz grupe polifenola, imaju mnogo jaču antiholinesteraznu aktivnost u odnosu na galnu i p-kumarinsku kiselinu,



Slika 2. Kriva inhibicije aktivnosti butirilholinesteraze miricetinom

Figure 2. Curve of butyrylcholinesterase activity inhibition caused by myricetin

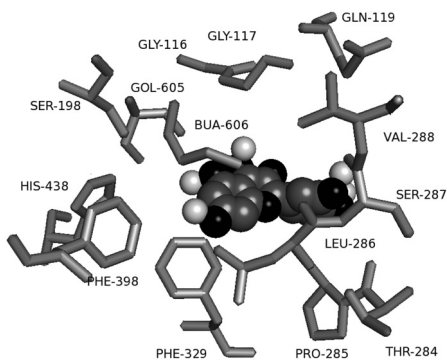
čije je inhibitorno dejstvo ranije ispitivano (Tomić 2006). Navedene kiseline korišćene su u koncentraciji od 83.6 mM, dok su kvercetin i miricetin bili 0.2 mM i 0.17 mM. Može se primetiti da su kvercetin i miricetin inhibirali butirilholinesterazu pri znatno nižim koncentracijama u odnosu na ispitivane kiseline.

Takođe, urađena je i kompjuterska simulacija vezivanja kvercetina i miricetina sa butirilholinesterazom koja prikazuje sa kojim su se aminokiselinskim ostacima vezali prilikom inhibicije.

Na osnovu izvedene simulacije može se zaključiti da kvercetin i miricetin ostvaruju hidrofobne interakcije sa Phe 329 i Leu 286, kao i elektrostatičke interakcije sa karbonilnim kiseonikom koji se nalazi u peptidnoj vezi između Pro 285 i Leu 286.

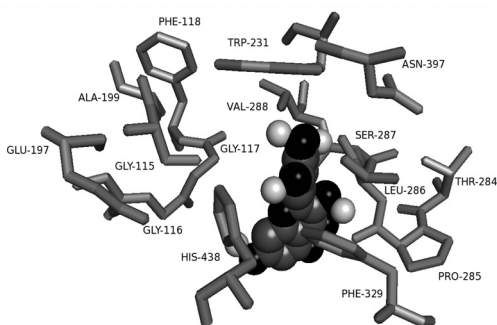
Cilj ove kompjuterske simulacije je da pruži uvid u pretpostavljenu prirodu interakcija inhibitora sa enzimom. Ona prikazuje vezivanje inhibitora za kristalnu strukturu vezivnog mesta butirilholinesteraze, tako da bi dalje simulacije trebalo izvesti na celom molekulu enzima. Pri tom bi bilo potrebno ispitati samu kinetiku inhibicije, kako bi se saznalo na koji način se inhibitor vezuje za enzim: da li je u pitanju vezivanje za aktivni centar enzima ili ugrađivanje u kompleks enzim-supstrat, ili pak neko drugo mesto na enzimu. Ovo je od značaja za razumevanje inhibicije i određivanje vrste inhibicije (da li je inhibicija kompetitivna, nekompetitivna, parcijalna ili mešovita).

Podaci dobijeni inhibicijom butirilholinesteraze kvercetinom i miricetinom iskorišćeni su za dobijanja



Slika 3. Interakcija kvercetina sa vezivnim mestom BChE

Figure 3. Interaction of quercetin with binding place of BChE



Slika 4. Interakcija miricetina sa vezivnim mestom BChE

Figure 4. Interaction of myricetin with binding place BChE

nje IC_{50} vrednosti za ove inhibitore tj. koncentracije inhibitora koja dovodi do smanjenja enzimske aktivnosti za 50%. Za kvercetin dobijena IC_{50} vrednost iznosi 54.5, a za miricetin 43.2 μM .

Prema dobijenim vrednostima i kvercetin i miricetin spadaju u grupu slabih inhibitora (Andersen i Markham 2006). Iz tabele se može primetiti da je IC_{50} vrednost nešto manja za miricetin u odnosu na kvercetin, što ukazuje na to da on ima jače inhibitoryno dejstvo na butirilholinesterazu. Mala razlika u IC_{50} vrednostima između ovih inhibitora može se

objasniti sličnošću u njihovim hemijskim strukturom, a samim tim i sličnim dejstvom.

Zaključak

Na osnovu rezultata može se reći da kvercetin i miricetin, kao aktivni principi prisutni u ranije ispitivanim biljnim ekstraktima, imaju ulogu u antiholinesteraznom dejstvu koje je kod ovih ekstrakata uočeno. Inhibicija enzima je veća pri povećanju koncentracije kvercetina i miricetina.

Dalje ispitivanje može biti nastavljeno u pravcu praćenja sinergističkog delovanja ova dva inhibitora ili u kombinaciji sa drugim inhibitorima iz grupe polifenola. Pretpostavka je da bi inhibicija bila veća od one izazvane pojedinačno sa svakim inhibitorom. Takođe, detaljnija kompjuterska simulacija inhibicije enzima kvercetinom i miricetinom predstavljala bi kompletniju analizu i objašnjenje same interakcije na molekularnom nivou.

Zahvalnost. Zahvaljujem se svom mentoru Goranu Tomiću, kao i Vladanu Martinoviću, studentima Hemijskog fakulteta u Beogradu, na pomoći i savetima tokom rada.

Literatura

- Andersen M., Markham K. 2006. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton: CRC
- Chattonet A., Masson P. 1986. Is peptidase activity of highly purified human plasma cholinesterase due to a specific cholinesterase isoenzyme or a contaminating dipeptidylaminopeptidase? *Biochimie*, **68**: 657.
- Guillozet A., Smiley J. F., Mash D. C., Mesulam M. M. 1997. Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Annals of neurology*, **42**: 909.
- 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.
- Selkoe J. D. 2001. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews*, **81**: 741.

Soreq H., Zakut H. 1993. *Human cholinesterases and anticholinesterases*. New York: Academic Press

Tomić G. 2006. Ispitivanje antiholinesterazne aktivnosti galne i p-kumarinske kiseline, *Petničke sveske*, 61: 310.

Tomić G., Vaslić J. 2007. Ispitivanje inhibicije aktivnosti butirilholinesteraze ekstraktima štavolja, medunike, kupine i vrbičice, *Petničke sveske*, 62: 247.

Milica Đokić

Butyrylcholinesterase Activity Inhibition Caused by Quercetin and Myricetin

Butyrylcholinesterase (BChE) is an enzyme from the esterase enzyme group which has the ability of catalyzing acetylcholine hydrolysis reactions. It is structurally very similar to acetylcholinesterase (AChE) (Soreq and Zakut 1993). Butyrylcholinesterase has an important role in the development of Alzheimer's disease (Chattonet and Masson 1986). This enzyme is involved in the production of the β -amyloid protein from protein precursors. Aggregation of β -amyloid protein is an important moment in the genesis, progression and pathogenesis of Alzheimer's disease (Selkoe 2001). Preventing the creation of these aggregates can be achieved by selective inhibition of BChE (Guillozet *et al.* 1997).

In accordance with the similarity in chemical structure with the tested compounds, quercetin and

myricetin (which belong to polyphenols) have been selected for a more detailed examination of compounds present in extracts, and behind anticholinesterase activity.

Therefore, the aim of this study was to determine the butyrylcholinesterase inhibitory activity of quercetin and myricetin.

Butyrylcholinesterase activity inhibition was evaluated according to the spectrophotometric method of Ellman, by measuring the production rate of the reaction product 5-thio-2-nitrobenzoate. Butyrylthiocholine iodide was used as the enzyme substrate.

Results show that quercetin and myricetin inhibit butyrylcholinesterase. Activity of butyrylcholinesterase decreases with the increase of inhibitor concentration. The results are in accordance with established anticholinesterase activity of extracts rich with polyphenols, which would indicate that these compounds are one of the main components responsible for cholinesterase inhibition.

It is noted that quercetin and myricetin inhibit butyrylcholinesterase in much lower concentrations in comparison to gallic and p-coumaric acid. The myricetin IC₅₀ value is lower than quercetin, which indicates that it has a stronger inhibitory effect on butyrylcholinesterase. Further investigation may be continued in order to monitor the synergistic effect of these two inhibitors, or those in combination with other inhibitors from the group of polyphenols. It is assumed that the inhibition would be greater than that caused individually with each inhibitor. Also, docking of enzyme and inhibitor would constitute a complete analysis and explanation of molecular interactions during the inhibition. 