

Uticaj ekstrakta čuvarkuće (*Sempervivum tectorum*) na aktivnost tirozinaze

U ovom radu ispitivana je inhibicija tirozinaze iz običnog šampinjona (*Agaricus bisporus*) ekstraktom čuvarkuće (*Sempervivum tectorum*). Aktivnost enzima određena je spektrofotometrijski. Dobijeni rezultati pokazali su da ekstrakt ima inhibitorno dejstvo na enzim, koje raste sa porastom koncentracije ekstrakta u uzorku.

Uvod

Povećano stvaranje melanina, kao i njegova akumulacija, uzrokuju razna kožna oboljenja koja uključuju stečenu hiperpigmentaciju. Hiperpigmentacija može da zavisi od aktivnosti enzima koji učestvuju u melanogenezi. UV zračenje, hronične inflamacije i trljanje kože, kao i prekomerno otpuštanje hormona koji stimuliše α -melanocit (α -MSH) su okidači za ove poremećaje (Briganti *et al.* 2003).

Tirozinaza je enzim koji se javlja kod različitih mikroorganizama, biljaka i životinja, a ključna je za stvaranje melanina u melanocitima. Melanociti su visoko specijalizovane ćelije koje se nalaze u koži, kosi i očima i zaduženi su za stvaranje pigmenta. Tirozinaza sadrži dva jona bakra i katalizator je u oksidaciji tirozina u 3,4-dihidroksifenilalanin (DOPA) i njegovom prevođenju u DOPAhinon. DOPAhinon se dalje lako prevodi u DOPAhrom, što je crveno – naranđasti pigment, iz koga dalje nastaju crno – smeđi pigmenti melanina. Inhibicijom tirozinaze može se smanjiti nastajanje melanina, a samim tim i uticati na hiperpigmentaciju (Smith *et al.* 2009)

Naučna literatura pokazuje da su rađeni mnogi radovi koji su za cilj imali pronalaženje prirodnih

supstanci za depigmentaciju. Između ostalih, ispitivano je i dejstvo supstanci iz zelenog čaja i pokazalo se da su (-)-epigalokatehin-3-galat (EGCG), (-)-epigalokatehin (EGC), (-)-katehin (C), (-)-galokatehingalat (GCG) i (-)-epikatehingalat (ECG), koje ekstrakt zelenog čaja poseduje, vrlo jaki inhibitori. EGCG, EGC, C, GCG i ECG su flavonoli. Postavlja se pitanje da li i druge biljke koje poseduju flavonole deluju inhibitorno na tirozinazu (Sato i Toriyama 2009).

Sempervivum tectorum, u narodu poznata kao čuvarkuća, biljka je sa debelom lisnom rozetom. Visine je 10-30 cm, uglavnom je zelena, a vrhovi listova su izrazito crveni. Raste na kamenju, starim zidovima, odžacima i krovovima. U narodnoj medicini koristi se za lečenje opekotina i rana. U njoj su pronađeni kampferol, kvercetin, miricetin i herbacetin, jedinjenja koja spadaju u grupu flavonola (Alberti *et al.* 2008). Iz tog razloga se ispituje da li i ona inhibitorno deluje na tirozinazu.

Cilj ovog rada jeste ispitivanje uticaja ekstrakta *Sempervivum tectorum* na aktivnost tirozinaze.

Materijal i metode

U ovom ispitivanju korišćena je tirozinaza gljive *Agaricus bisporus*, zbog toga što je bila najdo-
stupnija.

Izolovanje enzima. 200 g šampinjona je isec-
kano, potopljeno acetonom i stavljeno u zamrzivač.
Nakon 4 sata uz pomoć Bihnerovog levka smeša je
procedena, a zatim je aceton odstranjen otparava-
njem. Šampinjoni su homogenizovani u blenderu u
Tris-HCl puferu (C = 25 mM, pH 8.5). Nakon toga
je homogenat centrifugiran, 15 min na 2500 g.
Zatim je sakupljen talog i stavljen na magnetnu me-
šalicu, dodajući (NH₄)₂SO₄ do zasićenja od 70%
(na V = 138 mL dodavano je postepeno 66.53 g).
Smeša je ostavljena u frižider preko noći, a sledeći
dan je centrifugirana 15 min, 2500 g. Talog je ras-
tvoren u Na-fosfatnom puferu i dijalizovan prema
vodi, a nakon toga centrifugiran 5 min na 13400
rpm (Bouchilloux *et al.*).

Dijana Kljajić (1992), *Apatin, Blok 112, S-9, 1/11, učenica 3. razreda Gimnazije „Nikola Tesla” u Apatinu*

Tabela 1. Sastav uzoraka, kontrola i slepe probe

| Komponenta | Zapremina [μL] | | | | |
|---|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|
| Ekstrakt / H ₂ O u kontroli | 1 | 5 | 10 | 20 | 30 |
| L-DOPA (C = 9.3 mM) | 70 | 70 | 70 | 70 | 70 |
| Pufer | 879 | 875 | 870 | 860 | 850 |
| Enzim / H ₂ O u slepoj probi | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |

Priprema ekstrakta čuvarkuće. Ekstrakt je pripremljen metodom opisanim u literaturi (Stojičević *et al.* 2008). 20 g iseckanog lišća stavljeno je u erlenmajer u 100 mL metanola i ostavljeno 1 h da odstoji. Zatim je ekstrakt stavljen na vakuum filtraciju, a čvrsti ostatak ispiran sa 20 mL metanola, dva puta. Filtrat je uparavan na vakuum uparivaču na temperaturi od 40°C. Upareni uzorak je rastvoren u DMSO. Dobijeno je približno 8 mL ekstrakta. Obezbojavanje ekstrakta obavljeno je dodavanjem aktivnog uglja i centrifugiranjem 5 min na 13400 rpm, kako bi se sprečilo uticanje njegove boje na merenje apsorbancije.

Aktivnost tirozinaze određena je spektrofotometrijski na $\lambda = 475$ nm, a reakcija je započeta dodavanjem 70 μL supstrata (L-DOPA, C = 9.3 mM). Svi rastvori pripremljeni su u fosfatanom puferu (C = 50 mM, pH = 7.0).

Ispitivanje inhibicije tirozinaze ekstraktom čuvarkuće. Inhibicija je ispitivana pri različitim koncentracijama ekstrakta, dobijenim dodavanjem 1, 5, 10, 20 i 30 μL supstance. Za svaku od ovih koncentracija merena je apsorbancija na 20, 30, 40, 60, 80 i 90 sekundi (pri čemu su merenja ponavljana 4 puta), na osnovu čega je dobijena brzina promene apsorbance za tu koncentraciju.

Slepa proba za svaku koncentraciju ekstrakta napravljena je sa 50 μL H₂O umesto enzima, a kontrola umesto ekstrakta sadrži H₂O (tabela 1).

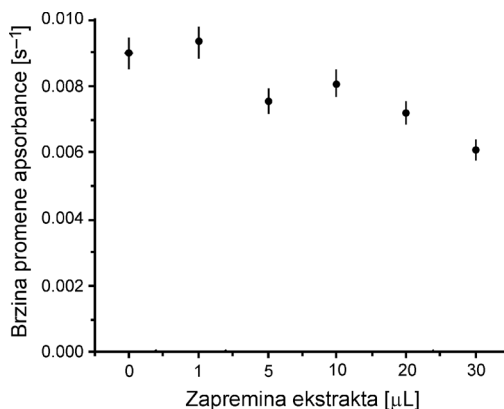
Rezultati i diskusija

Izolovanje tirozinaze postupkom navedenim u radu dobijen je enzim čija je aktivnost 14420 U/mL, pri čemu je jedna enzimska jedinica definisana kao promena apsorbancije na trećoj decimali u jednom minutu.

Sa grafika (slika 1) se vidi da brzina promene apsorbancije opada sa porastom koncentracije ekstrakta, na osnovu čega se dolazi do zaključka da eks-

trakt čuvarkuće ima inhibitorno dejstvo na aktivnost enzima tirozinaze. Određivanje relativne promene brzine reakcije pokazalo je da uzorak sa 30 μL ekstrakta najviše smanjuje brzinu reakcije (za 32%).

Obezbojavanjem ekstrakta uklonjen je samo deo pigmenta. Ekstrakt je izgubio zelenu boju i postao crvenkast. Postoji mogućnost da je to uticalo na merenje apsorbancije.



Slika 1. Zavisnost brzine promene apsorbance od količine dodatog ekstrakta

Figure 1. The dependence of the velocity of change of the absorbance due to the amount of the extract added

Zaključak

Dobijeni rezultati su pokazali da ekstrakt čuvarkuće (*Sempervivum tectorum*) ima inhibitorno dejstvo na enzim tirozinazu iz običnog šampinjona (*Agaricus bisporus*). Ovo dejstvo raste sa porastom koncentracije ekstrakta u uzorku. Postavlja se i pitanje da li flavonoidne i polifenolne komponente ekstrakta čuvarkuće imaju sinergističko dejstvo prilikom inhibicije ili samo pojedinačna jedinjenja deluju inhibitorno na tirozinazu. Iz ovih razloga dalje istraživanje je neophodno.

Literatura

Alberti A., Blazics B., Kery A. 2008. Evaluation of *Sempervivum tectorum* L. Flavonoids by LC and LC-MS. *Chromatographia*, **68** (1): 107.

Bouchilloux S., McMahon P., Mason H. S. 1963. The multiple forms of mushroom tyrosinase. *Journal of Biological Chemistry*, **238**: 1699.

Briganti S., Camera E., Picardo M. 2003. Chemical and Instrumental Approaches to Treat Hyperpigmentation. *Pigment Cell Research*, **16**: 101.

Smith N., Vicanova J., Pavel S. 2009. The Hunt for Natural Skin Whitening Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, **10**: 5326.

Sato K., Toriyama M. 2009. Depigmenting Effect of Catechins. *Molecules*, **14**: 4425.

Stojičević S., Stanisavljević I., Veličković D., Veljković V., Lazić M. 2008. Comparative screening of the anti-oxidant and antimicrobial activities of *Sempervivum marmoratum* L. extracts obtained by various extraction techniques. *J. Serb. Chem. Soc.*, **73** (6): 597.

Dijana Kljajić

Effect of Houseleek (*Sempervivum tectorum*) Extract on Tyrosinase Activity

In this paper the inhibition of tyrosinase by houseleek extract was tested.

Tyrosinase is an enzyme present in various microorganisms, plants and animals and it is important in the production of melanin in melanocytes. It catalyzes the oxidation of L-tyrosine to L-DOPA and its conversion to DOPAquinone, which is easily con-

verted to DOPAchrome. Its inhibition can reduce the production of melanin. Many papers have researched natural substances for depigmentation. Among others, the influence of green tea has been tested and the results showed that flavonols from this extract have an inhibitory influence on tyrosinase.

Houseleek (*Sempervivum tectorum*) is a plant which is often used in folk medicine and it is known that it consists of flavonols, which was the reason for the assumption that it can have an inhibitory effect on tyrosinase.

Agaricus bisporus tyrosinase was used in this research, because of its accessibility. The spectrophotometric method was used for the measurement of enzyme activity. Measurements were done on $\lambda = 475$ nm, and the reaction was started by adding 70 μ L of substrate (L-DOPA, C = 9.3 mM). All solutions were made in a phosphate buffer (C = 50 mM, pH = 7.0).

Inhibition was tested with different concentrations of the extract and the total volume of the sample was 1 mL. The conversion of L-DOPA to DOPAchrome was followed in periods of 90 s, at 20, 30, 40, 60, 80 and 90 s. The activity of the enzyme isolated with the method mentioned in this paper was 14420 U/mL, where one unit of enzyme activity is defined as the increase of absorption per minute at $\lambda = 475$ nm.

It can be seen in the graph in Figure 1 that the velocity of the change of the absorbency decreases with the increase of the concentration of the extract. The sample with 30 μ L of extract reduces the velocity of the reaction by 32%. The question whether this inhibition happens due to the synergetic influence of all the components of the extract or due to just one of them stays open. Further research is needed.

