

Uticaj geraniola i citrala na inhibiciju α -amilaze

U ovom radu ispitivan je uticaj geraniola i citrala na inhibiciju pljuvačne α -amilaze. Pokazan je inhibitorski efekat citrala već pri niskim koncentracijama, dok geraniol, i pored velike strukturne sličnosti sa citralom, nije pokazao inhibitorski efekat na aktivnost α -amilaze. Mogući mehanizam inhibicije najverovatnije uključuje formiranje Šifove baze između aldehidne grupe citrala i amino grupa u aktivnom centru enzima. Jedinjenja koja inhibiraju α -amilazu razmatraju se kao potencijalni terapeutici za dijabetes tipa 2, budući da inhibicijom razgradnje složenih šećera dovode do smanjenja relativne koncentracije glukoze u krvi. Dalja istraživanja koja bi rasvetlila tačan mehanizam inhibicije značajno bi doprinela pronalasku adekvatnih inhibitora.

Uvod

Diabetes mellitus tip 2 je hronična bolest koja nastaje zbog toga što ćelije egzokrinog pankreasa ne proizvode dovoljno insulina ili zbog neosetljivosti ciljnih ćelija na insulin (WHO 1999). U 2014. je zabeleženo da je broj obolelih od dijabetesa na svetu oko 422 miliona. Od ukupnog broja obolelih, 90% je obolelo od dijabetesa tipa 2, ostalih 10% čine oboleli od dijabetesa tipa 1 i od gestacijskog dijabetesa (WHO 2016). Postoji nekoliko grupa lekova koji se koriste u terapiji dijabetesa tipa 2. Među njima su i lekovi koji inhibiraju pankreasnu α -amilazu.

Alfa amilaza je enzim koji hidrolizuje 1-4 glikozidne veze, odnosno enzim koji razgrađuje

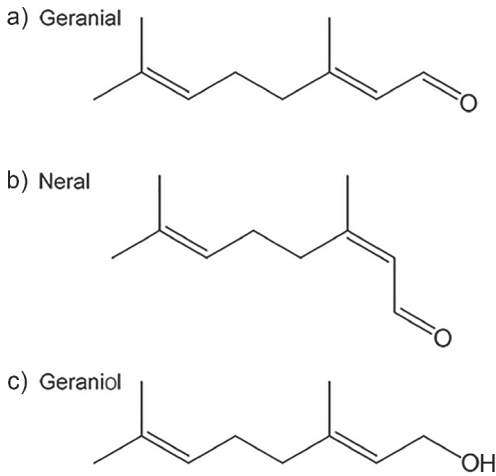
polisaharide, poput skroba i glikogena, na disaharide. U našem organizmu postoje dve izoforme α -amilaze. Jednu luče pljuvačne žlezde, dok drugu luči egzokrini pankreas. Aktivno mesto α -amilaze sačinjavaju ostaci tri amino kiseline: glutamat 233, aspartat 197 i aspartat 300, koje su sve negativno naelektrisane (MacGregor *et al.* 2001). Inhibicijom ovog enzima se usporava varenje skroba i posledično se smanjuje koncentracija glukoze u krvotoku. Problem kod lekova ovog tipa, koji su trenutno u upotrebi, su njihova mnogobrojna neželjena dejstva i ograničena dostupnost (Lebovitz 1997).

Sve je veći broj radova koji se bave uticajem etarskih ulja na α -amilazu. U jednom od radova (Jelenković *et al.* 2014) ispitivan je uticaj određenih terpena iz etarskih ulja na inhibiciju α -amilaze, od kojih je najveću inhibiciju pokazao citral. Citral (lemonal) je organsko jedinjenje iz grupe aldehida koje poseduje dva izomera; E i Z. E izomer je poznatiji kao geranial ili citral A (slika 1a), a Z izomer kao neral ili citral B (slika 1b). Nalaze se u etarskim uljima različitih biljaka, a neke od njih su: *Melissa officinalis*, *Eucalyptus staigeriana*, *Citrus limon*, *Backhousia citriodora*, *Ocimum gratissimum*, *Aloysia citrodora* i dr.

Pokazano je da ekstrakti biljaka *Rosa damascena*, *Rosa centifolia*, *Cymbopogon martinii* i *Cymbopogon citratus*, bogatih citrakima, sadrže komponente koje inhibiraju α -amilazu (Conforti *et al.* 2007; Tundis *et al.* 2016). U tim ekstraktima se pored ostalih jedinjenja nalazi i geraniol (slika 1c), međutim, nije ispitivan uticaj samog geraniola na inhibiciju α -amilaze. Geraniol je alkohol, strukturno sličan citralu, te se smatra njegovim funkcionalnim izomerom. Stoga je cilj ovog rada ispitivanje inhibitorskih svojstava geraniola na enzim α -amilazu, kao i utvrđivanje mehanizma inhibicije, poređenjem sa citralom kao već poznatim inhibitorom α -amilaze.

Dragica Kalaba (1997), Novi Sad, Bulevar kneza Miloša 18, Novi Sad, učenica 4. razreda Medicinske škole „7. april” u Novom Sadu

MENTOR: Nemanja Stanojević, student Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu



Slika 1. a – Geranial (citral A); b – Neral (citral B); c – Geraniol.

Figure 1. a – Geranial (citral A); b – Neral (citral B); c – Geraniol.

Materijal i metode

Hemikalije. Geraniol i citral su nabavljeni kao komercijalni preparati (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Izolacija i prečišćavanje α -amilaze. Kao izvor α -amilaze korišćena je humana saliva. Uzorci salive prikupljeni su od polaznika i saradnika Istraživačke stanice Petnica, u periodima pre obroka, nakon temeljnog ispiranja usne duplje vodom. Prikupljeno je 156 mL salive, koja je zatim centrifugirana 35 minuta na 3000 rpm na 4°C. Supernatant je dekantovan i čuvan u frižideru na 4°C, kao i talog. Iz supernatanta je vršeno prečišćavanje enzima amonijum-sulfatnom precipitacijom, do 80% zasićenja. Zatim je vršeno centrifugiranje 10 minuta na 3000 rpm na 4°C, nakon čega se enzim nalazio u talogu. Po završetku centrifugiranja supernatant je odliven i sačuvan u frižideru na 4°C.

Izrada kalibracione krive sa D-glukozom za određivanje koncentracije redukujućih šećera. Napravljen je štok 20 mM D-glukoze, a zatim razblažen puferom do odgovarajućih koncentracija (10, 8, 6, 4, 2 i 1 mM). U mikrotube je dodato 500 μ L DNS (3,5-dinitrosalicilna kise-

lina) reagensa i inkubirane su na 60°C. Nakon inkubiranja na 60°C, rastvori su presuti u epruvete i razblaženi sa 4 mL fosfatnog pufera. DNS metoda se koristi za određivanje koncentracije šećera u rastvoru. DNS reagens reaguje sa slobodnom aldehidnom grupom redukujućih šećera, pri čemu ona prelazi u karboksilnu, a 3,5-dinitrosalicilna kiselina prelazi u 3-amino-5-nitrosalicilnu kiselinu sa maksimumom apsorpcije na 540 nm, te se na osnovu absorbance može pratiti nastajanje 3-amino-5-nitrosalicilne kiseline koje je proporcionalno koncentraciji šećera.

Određivanje aktivnosti resuspendovanog taloga. Pomoću DNS metode određena je enzimski aktivnost resuspendovanog taloga dobijenog amonijum-sulfatnom precipitacijom. Iz reakcione smeše (2 mL pufera i 2 mL 2% skroba u koje je dodato 1 mL resuspendovanog taloga i tada je uključena štoperica) u prvom, trećem, petom, sedmom i 10. minutu uzimano je po 500 μ L i sipano u mikrotube u koje je već prethodno sipano 500 μ L DNS-a. Sve mikrotube su inkubirane u termošejkeru 15 minuta na 60°C na 250 rpm. Apsorbanca je merena spektrofotometrijski na 540 nm. Na osnovu absorbance je izračunata je aktivnost α -amilaze i izražena u enzimskim jedinicama po mililitru (U/mL). Jedna enzimski jedinica (U) predstavlja količinu enzima koja katalizuje 1 μ mol supstrata u minuti.

Određivanje inhibitornog dejstva citrala na enzim α -amilazu. U mikrotube je unapred sipan DNS. U epruvetama su pripremljene reakcione smeše (2 mL 2% rastvora skroba, 1 mL 50 mM fosfatnog pufera i 1 mL odgovarajuće koncentracije inhibitora). Korišćene su koncentracije inhibitora: 0.25, 0.5, 1, 1.25, 2.5 i 3.75 mM. Potom je u epruvetu sa najnižom koncentracijom dodato 500 μ L rastvora enzima. Postupak je ponovljen sa svim epruvetama. Po završetku, sve mikrotube su inkubirane u termošejkeru 15 minuta na 60°C na 250 rpm. Apsorbanca je merena spektrofotometrijski na 540 nm.

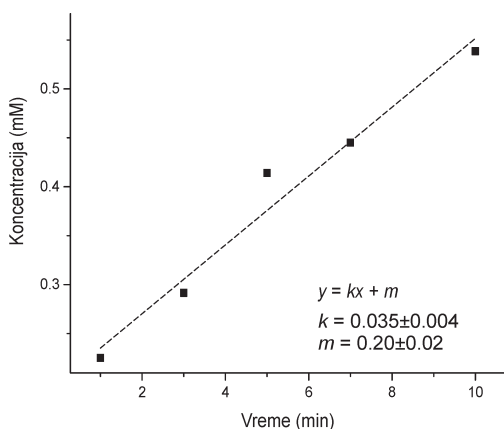
Određivanje inhibitornog dejstva geraniola na enzim α -amilazu. Inhibicija geraniolom je rađena po istom principu kao i inhibicija citralom. Koncentracije inhibitora koje su korišćene su sledeće: 0.25, 0.5, 1, 1.25, 2.5 i 3.75 mM. Po završetku, sve mikrotube su inkubirane u termošejkeru, 15 minuta na 60°C na 250 rpm. Apsorbanca je merena na 540 nm na spektrofotometru.

Rezultati i diskusija

Na osnovu izmerenih apsorbanaci rastvora poznate koncentracije, napravljena je kalibraciona kriva i određena je jednačina prave. Parametri prave su dalje korišćeni za određivanje koncentracije redukujućih šećera nakon zaustavljanja reakcije. Na osnovu tih podataka, pravljeni su grafici zavisnosti koncentracije redukujućih šećera od vremena i izračunata je aktivnost α -amilaze bez inhibitora, kao i njena aktivnost pri svakoj od koncentracija inhibitora koje smo koristili.

Određivanje aktivnosti resuspendovanog taloga

Nakon merenja apsorbanace za svaki od rastvora zaustavljene reakcije smeše u različitim vremenima, bez prisustva inhibitora, na osnovu jednačine prave dobijene preko kalibracione krive, izračunata je koncentracija redukujućih šećera u izabranim vremenima. Izračunate koncentracije smo koristili za izradu grafika i izračunavanje aktivnosti α -amilaze (slika 2). Dobijenu vrednost aktivnosti koristili smo za poređenje sa aktivnošću α -amilaze pri prisustvu različitih koncentracija izabranih inhibitora.

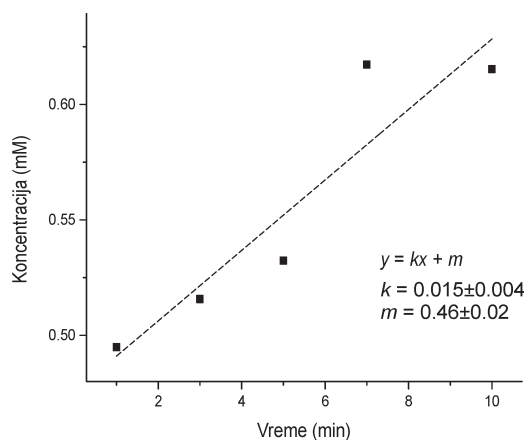
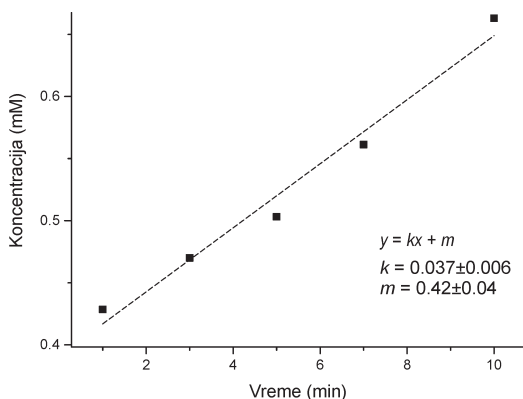


Slika 2. Promena koncentracije redukujućih šećera sa vremenom bez prisustva inhibitora

Figure 2. Change in the concentration of reducing sugars without inhibitors

Određivanje inhibitornog dejstva citrala na enzim α -amilazu

Aktivnost α -amilaze u prisustvu različitih koncentracija citrala kao inhibitora izračunata je na isti način kao i aktivnost α -amilaze bez prisustva inhibitora. Citral je pokazao najveću sposobnost inhibicije α -amilaze pri koncentracijama od 0.25 i 0.5 mM (slika 3).

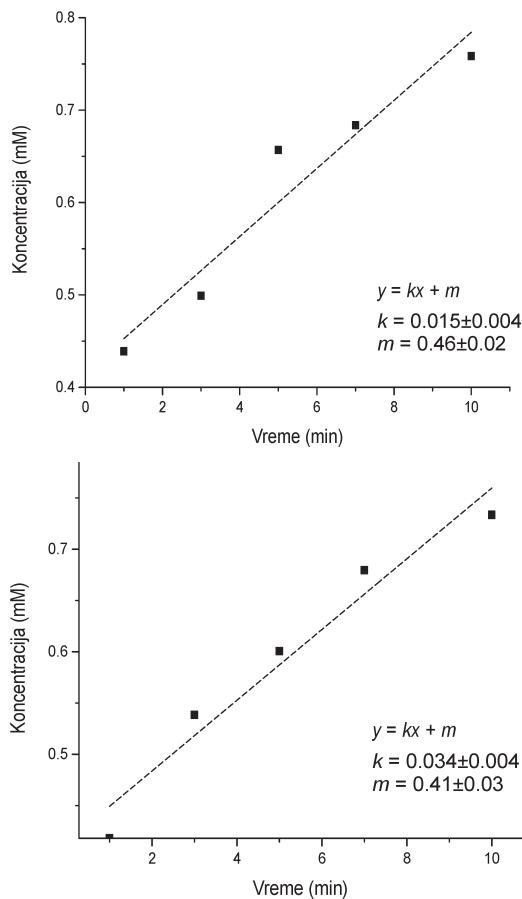


Slika 3. Promena koncentracije redukujućih šećera sa vremenom u prisustvu citrala kao inhibitora – koncentracija citrala 0.25 mM (gore) i koncentracija citrala 0.5 mM (dole)

Figure 3. Change in the concentration of reducing sugars in the presence of citral as an inhibitor – 0.25 mM citral (above) and 0.5 mM citral (below)

Određivanje inhibitornog dejstva geraniola na enzim α -amilazu

Aktivnost α -amilaze u prisustvu različitih koncentracija geraniola kao inhibitora izračunata je na isti način kao i aktivnost α -amilaze bez prisustva inhibitora, kao i u prisustvu citrala kao inhibitora. Geraniol je pokazao najveću sposobnost inhibicije α -amilaze pri 0.25 i 2.5 mM koncentraciji (slika 4).



Slika 4. Promena koncentracije redukujuć šećera sa vremenom u prisustvu geraniola kao inhibitora – koncentracija geraniola 0.25 mM (gore) i koncentracija geraniola 2.5 mM (dole)

Figure 4. Change in the concentration of reducing sugars in the presence of geraniol as an inhibitor – 0.25 mM geraniol (above) and 2.5 mM geraniol (below)

Diskusija

Imajući u vidu strukturu aktivnog mesta α -amilaze, koje čine ostaci tri negativno naelektrisane amino kiseline (glutamat 233, aspartat 197 i aspartat 300), pretpostavljen je mehanizam delovanja inhibitora.

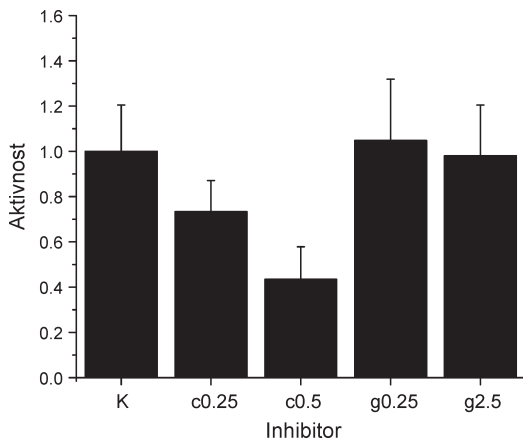
Inhibitori α -amilaze kao što je akarboza inhibiraju enzim tako što kiseonik iz karboksilne grupe ostataka aminokiselina (glutamat 233 i aspartat 300) nagradi vodonične veze sa „glikozidnom” NH grupom akarviozinske grupe (Qian *et al.* 1994).

Kod inhibitora kao što su citral ili geraniol nije ispitan mehanizam inhibicije. S obzirom na to da je citral jedinjenje iz grupe aldehida, pretpostavljeno je da će se parcijalno pozitivni ugljenik kovalentno vezati za parcijalno negativni kiseonik na aktivnom mestu amilaze i ostvariti ireverzibilnu inhibiciju. Imajući u vidu reaktivnost aldehydne grupe citrala, možemo pretpostaviti da će doći do formiranja Šifove baze sa enzimom. Šifova baza nastaje u reakciji karbnilnog ugljenika i amino grupe, koja je u našem slučaju amino grupa enzima.

Kod geraniola, koji je jedinjenje iz grupe alkohola, pretpostavljeno je da će parcijalno pozitivni vodonik nagraditi vodonične veze sa negativno naelektrisanim kiseonikom na aktivnom mestu amilaze i ostvariti kompetitivnu inhibiciju.

Najveći inhibitorni potencijal citral je pokazao u koncentracijama 0.25 i 0.5 mM. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim rezultatima (Jelenković *et al.* 2014). Tačan mehanizam inhibicije i dalje nije poznat, te bi dalja istraživanja podrazumevala ispitivanja kinetičkih parametara, utvrđivanje tipa inhibicije i tačnog mehanizma inhibicije.

Geraniol, za razliku od citrala, nije pokazao inhibiciju ili je ona pri određenim koncentracijama bila zanemarljiva (slika 5). Iz ovoga bi se moglo zaključiti da do inhibicije ne dolazi u odsustvu aldehydne grupe prisutne kod citrala. Stoga, uprkos velikoj strukturnoj sličnosti citrala i geraniola, geraniol ne poseduje značajna inhibitorna svojstva pri delovanju na α -amilazu. Ovaj podatak može biti od značaja u usmeravanju daljih istraživanja na pronalaženje inhibitora α -amilaze među onim jedinjenjima koja poseduju aldehydnu grupu.



Slika 5. Relativna aktivnost α -amilaze pri koncentracijama inhibitora koje pokazuju potentnost u inhibiciji:

c0.25 – citral u koncentraciji 0.25 mM

c0.5 – citral u koncentraciji 0.5 mM

g0.25 – geraniol u koncentraciji 0.25 mM

g2.5 – geraniol u koncentraciji 2.5 mM

Aktivnost je izražena u odnosu na aktivnost α -amilaze bez inhibitora (K) koja je uzeta za jedinicu.

Figure 5. Relative activity of α -amylase at inhibitor concentrations which show significant inhibition:

c.025 – 0.25 mM citral

c0.5 – 0.5 mM citral

g0.25 – 0.25 mM geraniol

g2.5 – 2.5 mM geraniol

Dalja ispitivanja potentnosti amilaznih inhibitora trebalo bi da uključuju određivanje kinetičkih parametara i tipa inhibicije, kako bi se definitivno potvrdila pretpostavka da citral dovodi do ireverzibilne inhibicije. Takođe, koncentracije citrala treba uporediti sa nekim od komercijalno dostupnih lekova koji se koriste u terapiji dijabetes melitusa tipa 2, kako bi se sa sigurnošću znalo da li se citral može koristiti u terapiji ove široko rasprostranjene bolesti.

Zaključak

Rezultati ovog istraživanja potvrdili su prethodna saznanja da citral inhibira α -amilazu i doprineli razumevanju do sada nepoznatog mehanizma inhibicije. Naime, jedina strukturna razlika između geraniola i citrala je alkoholna, odnosno aldehidna grupa na istoj poziciji. Geraniol, za razliku od citrala, uprkos velikoj strukturnoj sličnosti ne pokazuje inhibitorna svojstva, čime je potvrđen značaj prisustva aldehidne grupe citrala za inhibiciju aktivnosti α -amilaze.

Zahvalnost. Zahvaljujem se svom mentoru Nemanji Stanojeviću na pomoći tokom razrade, realizacije i pisanja rada, Ivani Vujković Bukvin na pomoći oko teorijske razrade rada, kao i Milici Joksimović i Ivanu Milenkoviću na stručnom savetovanju i pomoći oko realizacije rada.

Literatura

Conforti F., Statti G. A., Tundis R., Loizzo M. R., Menichini F. 2007. *In vitro* activities of *Citrus medica* L. cv. diamante (*Diamante citron*) relevant to treatment of diabetes and Alzheimer's disease. *Phytotherapy Research*, **21**: 427.

Jelenković Lj., Stankov Jovanović V., Palić I., Mitić V., Radulović M. 2014. *In vitro* screening of α -amylase inhibition by selected terpenes from essential oils. *Tropical journal of pharmaceutical research*, **13** (9): 1421.

Lebovitz H. E. 1997. Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, **26** (3): 539.

MacGregor E. A., Janeček Š., Svensson B. 2001. Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1546: 1.

Qian M., Haser R., Buisson G., Duée E., Payan F. 1994. The Active Center of a Mammalian α -Amylase. Structure of the complex of a pancreatic α -amylase with a carbohydrate inhibitor refined to 2.2-Å resolution. *Biochemistry*, **33**: 6284.

Tundis R., Bonesi M., Sicari V., Pellicano T. M., Tenuta M. C., Leporini M., Menichini F., Loizzo M. R. 2016. *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.: Chemical composition, antioxidant properties and hypoglycaemic activity via the inhibition of

α -amylase and α -glucosidase enzyme. *Journal of functional foods*, **25**: 477.

WHO (World Health Organization) 1999. *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus*

WHO (World Health Organization) 2016. *Global report on diabetes*

Dragica Kalaba

Influence of Geraniol and Citral on the Inhibition of α -Amylase

In this paper geraniol and citral were tested for inhibitory effects on α -Amylase. Our results show that citral inhibits the enzyme even at lower concentrations, while geraniol showed no inhibitory effect. The mechanism of inhibition probably involves the formation of a Schiff base between citral's aldehyde group and the enzyme's amino groups. α -Amylase inhibitors are important for the supplementary therapy of diabetes, so there is a need for the discovery of novel inhibitors. Further research is necessary to determine the exact mechanism by which citral inhibits α -Amylase. 