

---

Tija Milutinović

## Bioinformatička i eksperimentalna evaluacija potencijalnog inhibitora $\alpha$ -glukozidaze

---

Enzim  $\alpha$ -glukozidaza katalizuje hidrolizu neredukujuće terminalne  $\alpha$ -1,4-glikozidne veze kako u intracelularnoj tako i u ekstracelularnoj sredini. Inhibitori  $\alpha$ -glukozidaze koriste se u oralnoj terapiji hroničnog metaboličkog oboljenja Diabetes mellitus tip 2. Usled neželjenih efekata komercijalnih antidijabetika, ispituju se novi inhibitori  $\alpha$ -glukozidaze. Poznato je da piridoksin i njegovi derivati pokazuju veći inhibicioni efekat u odnosu na komercijalni terapeutik akarbozu. Cilj ovog rada bio je da se ispita da li novosintetisani derivat piridoksina sa palmitinskom kiselinom ima inhibitorno dejstvo prema  $\alpha$ -glukozidazi, kao i da se uradi biološka evaluacija na model sistema kancerskih ćelija i ex vivo svinjskom crevnom modelu. Bioinformatička docking analiza je pokazala vezivanje piridoksin-monopalmitata za aminokiseline aktivnog centra intracelularne i ekstracelularne  $\alpha$ -glukozidaze. Eksperimentalnim metodama inhibicioni efekat piridoksin-monopalmitata nije utvrđen.

---

### Uvod

Diabetes mellitus tip 2 (DM2) je hronično metaboličko oboljenje u čijoj je patogenezi nedovoljna sekrecija insulina iz  $\beta$ -ćelija pankreasa i/ili nedovoljna osetljivost ciljnih ćelija na insulin (WHO 1999). Od četiri klasifikaciona tipa diabetes mellitus-a (insulin-zavisni, insulin-nezavisni, gestacijski, drugi tipovi) insulin-nezavisni DM2 ima najvišu incidencu u opštoj populaciji (WHO 2016; Solis-Herrera *et al.* 2018). Oboleli od DM2 su u većem riziku od aterosklerotičnih kar-

diovaskularnih oboljenja sa makrovaskularnim i mikrovaskularnim komplikacijama (Solis-Herrera *et al.* 2018). Do sada, razvijeno je nekoliko grupa lekova u terapiji DM2. Enzim  $\alpha$ -glukozidaza jeste glukozidza koja se nalazi u pankreasu i hidrolizuje 1,4- $\alpha$ -glikozidnu vezu i razlaže skrob i disaharide do glukoze. Enzim  $\alpha$ -glukozidaza je pogodan ciljni molekul za antidijabetike, jer se inhibicijom enzima usporava razgradnja skroba i drugih polisaharida, te dolazi do smanjenja koncentracije glukoze u krvi i organizam se nalazi u stanju sličnom hiperglikemiji, hipersulinemiji i hipertrigliceridemiji.

Dejstvo većine poznatih antidijabetika zasnovano je na mehanizmu kompetitivne inhibicije. Inhibitori pankreasne  $\alpha$ -glukozidaze, čiji su predstavnici akarboza i miglitol, predstavljaju jednu od grupa oralnih antidijabetika (Rosak i Mertes 2012). Akarboza je strukturno slična oligosaharidnim supstratima  $\alpha$ -glukozidaze, a njen afinitet ka  $\alpha$ -glukozidazi veći je  $10^4$ – $10^5$  puta nego afinitet oligosaharida (Rosak i Mertes 2012). Akarboza reverzibilno inhibira  $\alpha$ -glukozidazu. Mehanizam dejstva je kompetitivna inhibicija, i zasniva se na uspostavljanju vodoničnih veza preko hidroksilnih grupa koje se nalaze na aktivnom mestu enzima (Kim *et al.* 2014). Cilj inhibicije  $\alpha$ -glukozidaze je smanjenje koncentracije prostih ugljenohidratnih produkata, nastalih enzimskom katalizom u toku varenja složenih ugljenohidrata iz hrane. Aspartat 518 predstavlja katalitičku bazu  $\alpha$ -glukozidaze (Hermans *et al.* 1991). Aspartat 518 katalizuje raskidanje 1,4-glikozidne veze po principu kovalentne katalize i kisele katalize i funkcioniše kao nukleofilni reaktant koji je potreban za

---

Tija Milutinović (2000), Beograd - Stari grad, učenica 4. razreda Prve beogradske gimnazije

MENTORI:

Nemanja Stanojević, student V godine Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Mihajlo Filep, master student Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

formiranje intermedijara tokom reakcije (Hermans *et al.* 1991).

Poremećaj hepatograma, nauzeja, vomitus i poremećaji varenja česti su neželjeni efekti primene akarboze (Rosak i Mertes 2012). U cilju smanjenja neželjenih efekata, te povećanja efikasnosti enzimske inhibicije, ispituju se novi inhibitori ovog enzima. U prethodnim istraživanjima pokazano je da razni prirodni produkti; flavoni, polifenoli, flavonoidi inhibiraju  $\alpha$ -glukozidazu (Tadera *et al.* 2006). Kim i saradnici pokazali su inhibitorski efekat piridoksina i njegovih derivata; piridoksala i piridoksamina na pankreasnim enzimima koji učestvuju u varenju ugljenih hidrata, među njima i na  $\alpha$ -glukozidazu. Inhibitorski efekat piridoksina i piridoksala bio je veći u odnosu na konvencionalni terapeutik akarbozu (Kim *et al.* 2018). Mehanizam delovanja piridoksina, piridoksala i piridoksamina nije poznat.

Cilj ovog rada je da se ispita da li novosintetisani derivat piridoksina sa palmitinskom kiselinom ima inhibitorsko dejstvo prema  $\alpha$ -glukozidazi, kao i da se izvrši biološka evaluacija na model sistemu kancerskih ćelija i *ex vivo* svinjskom crevnom modelu.

## Materijal i metode

Najpre je urađena doking analiza kako bi se utvrdilo da li piridoksin-monopalmitat može da inhibira  $\alpha$ -glukozidazu, i koje su energije vezivanja piridoksin-monopalmitata. Nakon toga je urađena sinteza piridoksin-monopalmitata. Enzim  $\alpha$ -glukozidaza je izolovan iz svinjskog pankreasa i urađeni su eseji za merenje aktivnosti enzima. Urađen je *Ex vivo* crevni model kako bi se utvrdilo da li piridoksin-monopalmitat inhibira druge enzime, pored  $\alpha$ -glukozidaze, koji se nalaze u tankom crevu i takođe razlažu polisaharide do glukoze. MTT testom vijabilnosti ispitano je da li piridoksin-monopalmitat ima citotoksično dejstvo. Takođe je urađen esej za aktivnost, kao i inhibicioni esej intracelularne  $\alpha$ -glukozidaze iz ćelijskih lizata.

**Doking analiza i alignment.** Molekularna doking analiza je izvršena u programu Schrödinger Glide, dok je za minimizaciju korišćen program Schrödinger Epic, a za vizualizaciju

Maestro 11.8. Određene su energije vezivanja za intracelularnu humanu  $\alpha$ -glukozidazu kao i humanu intracelularnu glukoamilazu, čije su aminokiselničke sekvence preuzete iz baze SwissProt. Kao aktivno mesto korišćene su sledeće amino kiseline: D404, D518, R600, D616 i H674.

Određene su energije vezivanja piridoksin-monopalmitata za aktivna mesta  $\alpha$ -glukozidaze kao i glukoamilaze. Izvršeno je poređenje sekvence aktivnih centara dva tipa glukozidaze bez posttranslacionih modifikacija kako bi se utvrdila homologija ova dva enzima.

**Sinteza piridoksin-monopalmitata.** Reakcionu smešu činili su hloroform (4.864 mL), piridin (6.080 mL) i piridoksin hidrohlorid (0.2493 g). U reakcionu smešu je ukapavan rastvor palmitoil hlorida brzinom 1 kap/min. Nakon ukapavanja palmitoil hlorida smeša je mešana 48 h. Nakon toga u reakcionu smešu dodato je 100 mL dH<sub>2</sub>O i 50 mL 1 M HCL. Odvojena je organska faza i osušena anhidrovanim natrijum sulfatom. Na vakuum uparivaču uparen je hloroform. Kristalizacija piridoksintripalmitata izazvano je dodavanjem 15 mL izopropanola. Dobijeni kristali su profiltrirani na Bihnerovom levku. Prinos je iznosio 0.4142 g.

### Izolacija i prečišćavanje $\alpha$ -glukozidaze.

Enzim  $\alpha$ -glukozidaza izolovan je iz svinjskog pankreasa. Sa svinjskog pankreasa početne mase 2 kg uklonjeno je masno i vezivno tkivo. Eksperimenti su izvođeni na hladnom (T = 4°C). Tkivo, homogenizovano u blenderu, isprano je rastvorom EDTA-a (2 mM) sa dodatkom PMSF-om (fenilmetilsulfonil fluoird, 0.2 mM). Homogenizovano tkivo pankreasa potopljeno je u 1L Na-fosfatnog pufera (pH 6.8) i ostavljeno da odstoji na hladnom (T = 4°C) 24 h. Za podešavanje pH vrednosti homogenata na 4, korišćena je 0.5 M HCl. Homogenat je zatim centrifugiran na 4°C na 10 000 × g 10 minuta. Dekantovani supernatant je filtriran. Taloženje proteina vršeno je metodom desaltacije amonijum sulfatom i sukcesivnim centrifugiranjem (10 min 10 000 × g, 4°C). Odvojeni supernatant je sačuvan za dalje eksperimente.

**Određivanje koncentracije proteina.** Koncentracija proteina je određena metodom po Bredfordu (Bradford 1976). Konstrukcija stan-

dardne prave izvedena je serijom razblaženja albumina iz goveđeg seruma. Koncentracija proteina oznosi 284.24 mg/mL.

**Inhibicioni esej i esej za određivanje aktivnosti  $\alpha$ -glukozidaze.** Napravljene su dve reakcione smeše, jedna u kojoj se nalazi enzim i druga u kojoj nema enzima. Prva reakciona smeša je sadžala 500  $\mu$ L kalijum fosfatni pufer (67 mM, pH 6.8), 20  $\mu$ L glutationa (3 mM) i 20  $\mu$ L prečišćenog enzima. Druga reakciona smeša je sadržala 500  $\mu$ L kalijum fosfatni pufer (67 mM, pH 6.8), 20  $\mu$ L glutationa (3 mM) i 20  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. Reakcione smeše su inkubirane 5min na 37°C. Nakon inkubacije u svaku reakcionu smešu dodato je 50 $\mu$ L p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glukopranozida (1 mM) u obe reakcione smeše, nakon čega je usledila inkubacija na 37°C 20 min. Reakcije su prekinute dodatkom 800  $\mu$ L rastvora Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 mM). Aktivnost je određivana u alikvotu uzorka homogenizata (združene frakcije nakon hromatografije i supernatant ćelijskih lizata). Aktivnost enzima je kvantifikovana spektrofotometrijskom metodom očitavanjem apsorbance na 400 nm. Aktivnost je izračunata na osnovu formule:

$$C_c = \frac{R \times A \times V_{rs}}{t \times \varepsilon \times V_c} \quad (1)$$

gde je  $R$  – razblaženje,  $A$  – apsorbanca,  $V_{rs}$  – zapremina reakcione smeše,  $t$  – vreme reakcije u minutima,  $\varepsilon$  – molarni ekstincioni koeficijent i  $V_c$  – zapremina rastvora enzima (Price i Stevens 1982). Inhibicioni esej rađen je po principu esej za aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze. Specifična enzimaska aktivnost predstavlja količnik koncentracije enzimske aktivnosti i ukupne koncentracije proteina  $c_{prot}$ :

$$C_{sp} = \frac{C_c}{c_{prot}} \quad (2)$$

Specifična aktivnost enzima ukazuje na to koliko je enzim čist.

Koncentracije inhibitora su bile: 0.25  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 0.75  $\mu$ M, 1.0  $\mu$ M i 1.25  $\mu$ M.

*Ex vivo* svinjski crevni model. Svinjsko crevo je na ledu isprano fiziološkim rastvorom (0.9% NaCl), a zattim KRB puferom (D-glukoza 10 mM, MgCl 0.49 mM, NaCl 119.78 mM/L, KCl 4.56 mM/L, dinatrijum fosfat 0.7 mM/L,

mononatrijum fosfat 1.3 mM/L, natrijum bikarbonat 14.99 mM/L). Po 10 cm creva preneto je u sterilne petri šolje u kojima se nalazio medijum (15 mL) koji je sadržao (NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, NaCl 118 mM, KCl 4.7 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.2 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 0.7 mg/L, 100 mM maltozu i 200 mM saharozu). Dodato je po 125  $\mu$ L sintetisanog derivata ratvorenog u acetonu, u koncentracijama: 0.25  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 0.75  $\mu$ M, 1.0  $\mu$ M i 1.25  $\mu$ M. Kao pozitivna kontrola korišćena je akarboza (100  $\mu$ M). Jedan uzorak je tretiran sa 100  $\mu$ M acetona (rastvarač) da bi se proverilo da li aceton ima inhibitorno dejstvo. Nakon inkubacije na 37°C, izmerena je koncentracija D-glukoze u medijumu prethodno kalibrisanim aparatom za merenje glukoze.

**Ispitivanje citotoksičnosti.** Za utvrđivanje citotoksičnosti sintetisanog derivata korišćena je ćelijska linija humanog adenokarcioma A549. Ćelije su gajene u RPMI medijumu sa dodatkom 10% goveđeg fetalnog seruma i 1% antibiotika, na 37°C uz 5% CO<sub>2</sub>.

Ćelije su zasađene u mikrotitar ploče sa 96 bunarića u gustini  $1.2 \times 10^6$  12 po 1 mL i nakon 72 sata tretirane sintetisanim derivatom u koncentracijama 0.25  $\mu$ M, 0.5  $\mu$ M, 0.75  $\mu$ M, 1.0  $\mu$ M i 1.25  $\mu$ M. Nakon 24 h, medijum koji je sadržao sintetisani derivat u odgovarajućim koncentracijama je odliven i zamenjen rastvorom 50  $\mu$ L MTT u medijumu u koncentraciji 4 mg/mL. Nakon inkubacije od 3 h medijum je zamenjen izopropanolom i apsorbanca je izmerena na talasnoj dužini od 570 nm. MTT esej za merenje vijabilnosti ćelija zasniva se na činjenici da dehidrogenaze aktivnih mitohondrija u živim ćelijama cepaju tetrazolijumski prsten MTT (3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium bromid) pri čemu nastaju nerastvorni kristali formazana. Rastvaranjem formazana u izopropanolu dobija se ljubičasto obojenje čiji je intenzitet proporcionalan broju živih ćelija.

## Rezultati

### Molekularna doking analiza

Molekularna doking analiza je izvršena u programu Schrödinger Glide, dok je za minimizaciju korišćen program Schrödinger Epic, a za

vizualizaciju Maestro 11.8. Dobijene su sledeće energije vezivanja: energija vezivanja piridoksina za  $\alpha$ -glukozidazu iznosi  $-4.83$  kcal/mol, energija vezivanja piridoksin-1-palmitata iznosi  $-1.94$  kcal/mol.

## Aktivnost prečišćene $\alpha$ -glukozidaze

Aktivnost enzima, izražena u IU (internacionalnim jedinicama) je ona količina enzima koja u standardnim uslovima merenja transformiše 1  $\mu$ mol supstrata u proizvod (nagrada 1  $\mu$ mol proizvoda) za 1 minut. Srednja vrednost apsorbance slepe probe iznosi 0.021, dok srednja vrednost apsorbance  $\alpha$ -glukozidaze iznosi 0.087. Oduzimanjem apsorbance slepe probe od apsorbance enzima dobija se apsorbancu uzorka koja ulazi u formulu (1) za izračunavanje aktivnosti  $\alpha$ -glukozidaze. Koncentracija enzimske aktivnosti prečišćenog enzima  $\alpha$ -glukozidaze iznosi 33.97 IU/mL, što predstavlja količinu enzima po jedinici zapremine rastvora enzima. Ukupna koncentracija proteina iznosi 284.24 mg/mL. Specifična aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze je izračunata na osnovu formule (2) i iznosi 119.51 IU/mg.

## Inhibicioni esej $\alpha$ -glukozidaze iz supernatanta

Dobijene vrednosti enzimske aktivnosti  $\alpha$ -glukozidaze iz supernatanta prečišćenog enzima tretirane akarbozom (100  $\mu$ M) i različitim

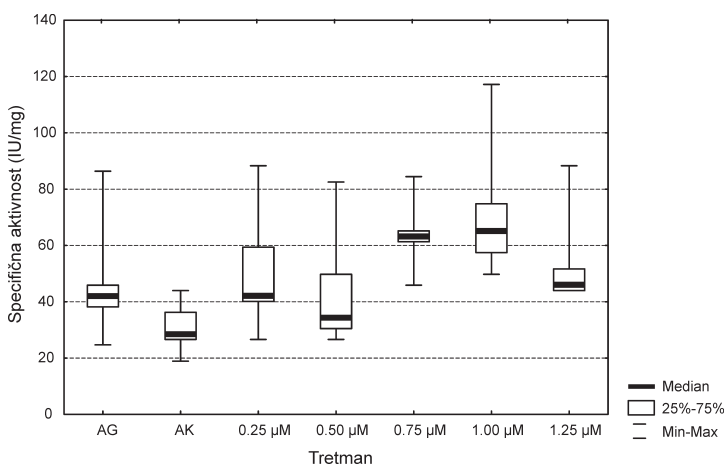
koncentracijama piridoksin-monopalmitata prikazane su na slici 1 (prikazana specifična aktivnost). Sa grafika se može uočiti da nije došlo do smanjenja aktivnosti  $\alpha$ -glukozidaze pri tretmanima piridoksin-monopalmitatom. Akarboza predstavlja pozitivnu kontrolu i to se uočava, jer je najmanja aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze kod tretmana akarbozom. Očekivano je da se aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze smanjuje sa povećanjem koncentracije piridoksin-monopalmitata, ali zbog neidealnih uslova (temperatura, pH vrednost, greške pri pipetiranju itd.) dobijeni su rezultati prikazani na grafiku.

## Inhibicioni esej $\alpha$ -glukozidaze iz ćelijskih lizata

Kako bi se utvrdilo da li piridoksin-monopalmitat inhibira intracelularnu  $\alpha$ -glukozidazu urađen je inhibicioni esej  $\alpha$ -glukozidaze iz ćelijskih lizata. Dobijene vrednosti enzimske aktivnosti  $\alpha$ -glukozidaze iz ćelijskih lizata tretiranih akarbozom piridoksin-monopalmitatom prikazane su na slici 2 (prikazana specifična aktivnost). Kao i kod inhibicionog eseja za  $\alpha$ -glukozidazu iz supernatanta, takođe može da se uoči da nije došlo do inhibicije enzima tretiranog različitim koncentracijama piridoksin-monopalmitata.

## Ex vivo svinjski crevni model

Ex vivo svinjski crevni model je urađen kako bi se utvrdilo da li piridoksin-monopalmitat,

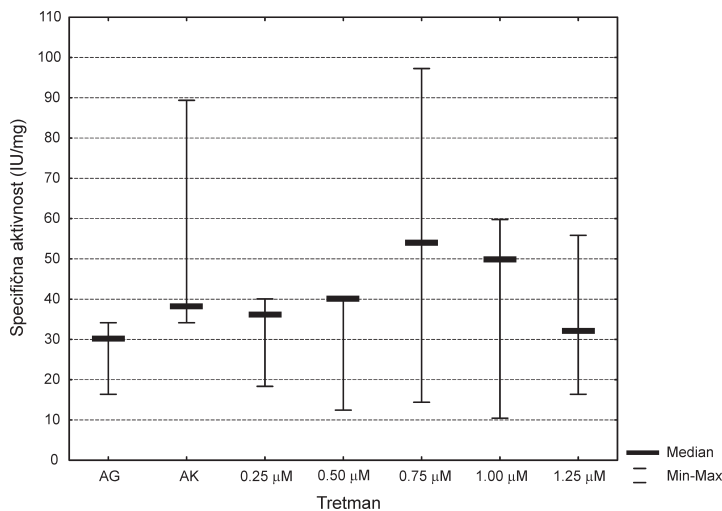


Slika 1. Vrednosti inhibicionog eseja  $\alpha$ -glukozidaze iz supernatanta (specifična aktivnost):

AG –  $\alpha$ -glukozidaza  
AK – akarboza 100  $\mu$ M  
0.25–1.25  $\mu$ M – koncentracije piridoksin-monopalmita

Figure 1. Values of  $\alpha$ -glucosidase inhibition assay from supernatant (specific activity):

AG –  $\alpha$ -glucosidase  
AK – acarbose 100  $\mu$ M  
0.25–1.25  $\mu$ M – concentrations of synthesized pyridoxine

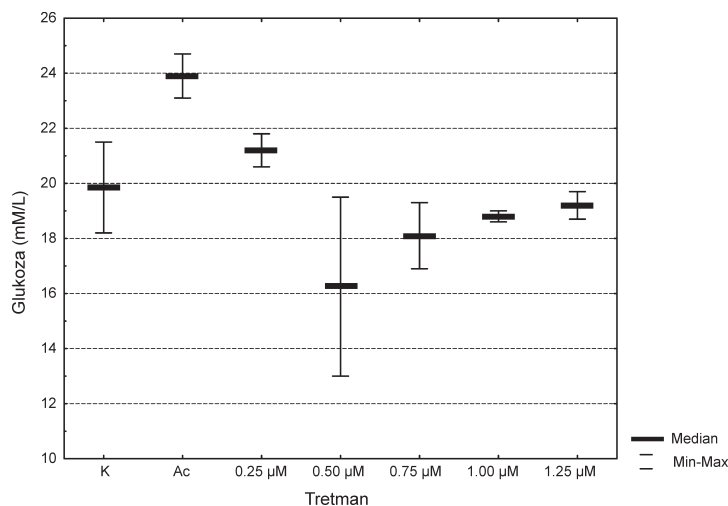


Slika 2. Vrednosti inhibicionog eseja  $\alpha$ -glukozidaze iz ćelijskih lizata (specifična aktivnost):

AG –  $\alpha$ -glukozidaza  
 AK – akarboza 100  $\mu$ M  
 0.25–1.25  $\mu$ M – koncentracije piridoksin-monopalmita

Figure 1. Values of  $\alpha$ -glucosidase inhibition assay from cell lysates (specific activity):

AG –  $\alpha$ -glucosidase  
 AK – acarbose 100  $\mu$ M  
 0.25–1.25  $\mu$ M – concentrations of synthesized pyridoxine monopalmitate



Slika 3. Rezultati *ex vivo* svinjskog crevnog modela – dobijene vrednosti koncentracije glukoze:

K – kontrola  
 Ac – aceton 100  $\mu$ M  
 0.25–1.25  $\mu$ M – koncentracije piridoksin-monopalmita

Figure 3. Obtained results *ex vivo* of pig intestinal model – glucose concentrations:

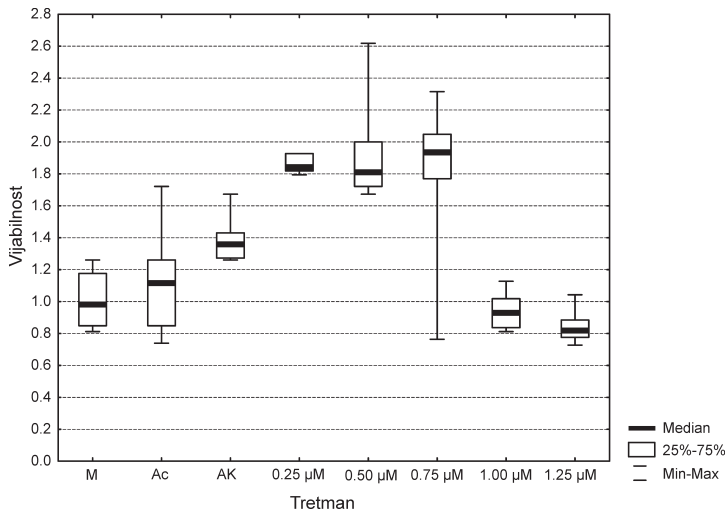
K – control  
 Ac – acetone 100  $\mu$ M  
 0.25–1.25  $\mu$ M – concentrations of synthesized pyridoxine monopalmitate

pored  $\alpha$ -glukozidaze, ima inhibiciono dejstvo na neke druge enzime (amilaza,  $\beta$ -glukozidaza, maltaza itd.) koji se nalaze u crevnom traktu i takođe razlažu disaharide i polisaharide do glukoze. Dobijeni rezultati *ex vivo* svinjskog crevnog modela su prikazani na slici 3. Iz rezultata se može zaključiti da je došlo smanjenja koncentracije glukoze, što ukazuje na to da je piridoksin-monopaalmitat potencijalni inhibitor ne samo  $\alpha$ -glukozidaze, već potencijalno i nekih drugih enzima koji razlažu disaharide i polisaharide do glukoze. Kod tretmana acetonom nije došlo do smanjenja koncentracije glukoze, što ukazuje da aceton koncentracije 100  $\mu$ M ne in-

hibira  $\alpha$ -glukozidazu, kao ni ostale enzime. Najveće smanjenje koncentracije glukoze je pri tretmanu piridoksin-monopalmitatom koncentracije 0.5  $\mu$ M. Kao i kod inhibicionih eseja, očekuje se smanjenje koncentracije glukoze sa povećanjem koncentracije piridoksin-monopalmitata što se na grafiku ne uočava. Razlog dobijenih rezultat može biti loše kalibrisan uređaj za merenje glukoze, promena temperature, promena pH vrednosti itd.

## Vijabilnost imortalizovanih ćelija

Dobijeni rezultati vijabilneta imortalizovanih ćelija linije A549 humanog adenokarcinoma



Slika 4. Vijabilnost imortalizovanih ćelija linije A549 humanog adenokarcinoma bazalnih epitelijalnih ćelija:

M – medijum  
Ac – aceton 100 µM  
AK – akarboza 100 µM  
0.25–1.25 µM – koncentracije piridoksin-monopalmita

Figure 4. Viability of immortalized cells of the A549 line of human basal epithelial cell adenocarcinoma:

M – medium  
Ac – acetone 100 µM  
AK – acarbose 100 µM  
0.25–1.25 µM – concentrations of synthesized pyridoxine monopalmitate

bazalnih epitelijalnih ćelija prikazani su na slici 4. Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da je došlo do porasta vijabilnosti ćelija pri tretmanima piridoksin-monopalmitatom, kao i akarbozom i acetonom. Pretpostavlja se da ćelije koriste piridoksin-monopalmitat kao suplement, i da je zbog toga došlo do povećanja vijabilnosti.

## Diskusija

Decenijama unazad inhibitori  $\alpha$ -glukozidaze koriste se u oralnoj terapiji DM2. Pored nespecifičnih neželjenih efekata koje lekovi iz ove grupe oralnih antidijabetika pokazuju (Hollander 1992), istraživanja su pokazala da tokom primene akarboze dolazi do hipertrofije tankog i debelog creva i konzistentnog povećavanja širine crevnih kripti (Hollander 1992). Novija istraživanja ispituju nove potencijalne inhibitore  $\alpha$ -glukozidaze. Kim i saradnici pokazali su inhibitoryni efekat piridoksina i njegovih derivata na  $\alpha$ -glukozidazu i druge intestinalne enzime uključene u metabolizam ugljenih hidrata (Kim *et al.* 2018). Biodostupnost, fizičke i hemijske osobine piridoksina i njegovih derivata stavljaju ga u prednost u odnosu na komercijalne terapeutike.

Korišćenje derivata piridoksina sa palmitskom kiselinom može se objasniti vezivanjem piridoksina za aminokiseline aktivnog centra  $\alpha$ -glukozidaze, gde bi uloga masnokiselinskih

lanca palmitinske kiseline bila u smanjenju konstante disocijacije piridoksina hidrofobnim interakcijama sa mestom u blizini aktivnog centra, što bi dovelo do produžavanja inhibitorynog dejstva piridoksina.

Doking analiza je pokazala da se piridoksin-monopalmitat vezuje za aminokiseline aktivnog centra  $\alpha$ -glukozidaze. Aligment sekvence intracelularne i ekstravidi se da je grafik, adekvatniji tcelularne  $\alpha$ -glukozidaze pokazao je značajnu homologiju sekvenci ova dva enzima, te je s tim u vezi ispitivani inhibitoryni efekat na oba enzima.

Rezultati enzimske aktivnosti  $\alpha$ -glukozidaze izolovane iz svinjskog pankreasa i ćelijskih lizata u prisustvu piridoksin-1-palmitata kao potencijalnog inhibitora pokazali su da nije došlo do njihovog smanjenja. Smanjena aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze kod inhibicionih eseja može se objasniti time što je enzim dugo bio izložen sobnoj temperaturi, te je došlo do denaturacije enzima i samim time je smanjena aktivnost.

Promene enzimske i specifične aktivnosti  $\alpha$ -glukozidaze pri tretmanima piridoksin-monopalmitata koje nisu očekivane, smanjenje aktivnosti  $\alpha$ -glukozidaze sa povećanjem koncentracije piridoksin-monopalmitata, mogu se objasniti prekomernom esterifikacijom prilikom sinteze piridoksin-monopalmitata. Prilikom sinteze piridoksin-monopalmitata pretpostavlja se da je došlo do stvaranja polisesterifikovanih derivata, poput piridoksintripalmitata, koji zbog

svoje veličine, hidrofobnosti i sternih smetnji nije u mogućnosti da se veže za aktivno centar  $\alpha$ -glukozidaze. Zbog navedenih osobina nije došlo očekivane inhibicije enzimske aktivnosti  $\alpha$ -glukozidaze. Iz dobijenih rezultata može se uočiti da je došlo aktivacije enzima. Može se pretpostaviti da su se uspostavile vodonične interakcije između hidroksilnih grupa na piridoksinu i polarnih aminokiselinskih ostataka na aminokiselinama i da je time došlo do promene konformacije  $\alpha$ -glukozidaze. Pretpostavlja se da je ta konformacija dovela do toga da aktivno mesto postane pristupačnije supstratu i da je zbog toga došlo do blagog povećanja aktivnosti.

Pored petpostavljenog objašnjenja izostanka inhibitorne aktivnosti statistički neznčajna promena koncentracija glukoze u *ex vivo* svinjskom crevnom modelu može se objasniti starošću iskorišćenog tkiva, kao i mogućim interakcijama sa drugim molekulima. Male promene koncentracije glukoze u *ex vivo* svinjskom crevnom modelu mogu se objasniti nedovoljnom senzitivnošću aparature za merenje glukoze.

Prividna proliferacija ćelija humanog karcinoma bazalnog epitela verovatno nastaje zbog izostanka inhibicije intracelularne  $\alpha$ -glukozidaze iz gore navedenih razloga. Dugi masnokiselinski niz na poliesterifikovanim derivatima piridoksina mogao je da dovede do ankoriranja u plazmolemu što je ove derivate učinilo dostupnim za druge intracelularne enzime.

U daljem istraživanju potrebno je optimizovati protokole za sintezu piridoksin-monopalmitata kao i protokol *ex vivo* svinjskog crevnog modela. Potrebno je bioinformatički i eksperimentalno ispitati inhibitorni efekat drugih derivata piridoksina na intracelularnu i ekstracelularnu  $\alpha$ -glukozidazu.

## Zaključak

Bioinformatička doking analiza pokazuje vezivanje piridoksin-monopalmitata za aminokiseline aktivnog centra intracelularne i ekstracelularne  $\alpha$ -glukozidaze. Eksperimentalnim metodama inhibitorni efekat piridoksin-monopalmitata nije pokazan, ali su potrebna su dalja istraživanja kako bi se utvrdilo da li piridoksin-

-monopalmitat ima ulogu kao potencijalni aktivator enzima  $\alpha$ -glukozidaze.

**Zahvalnost.** Zahvaljujem se svom mentoru Nemanji Stanojeviću na pomoći tokom razrade, realizacije i pisanja rada, Luki Velimirovu na pomoći oko bioinformatičke analize, Mihajlu Filepu i Draganu Bajkanoviću na pomoći oko biohemijske teorije i stručnom savetovanju. Posebno se zahvaljujem profesoru Milošu Petroviću sa katedre za Organsku hemiju na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na doniranju hemikalija za sintezu piridoksin-monopalmitata.

## Literatura

Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248.

Hermans M. M., Wisselaar H. A., Kroos M. A., Oostra B. A., Reuser A. J. 1991. Human lysosomal alpha-glucosidase. Characterization of the catalytic site. *Journal of Biological Chemistry*, **266** (21): 13507.

Hollander P. 1992. Safety Profile of acarbose, an  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. *Drugs*, **44**: 47.

Kim K. T., Rioux L. E., Turgeon S. L. 2014. Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry*, **98**: 27.

Kim H. H., Kang Y.-R., Lee J.-Y., Chang H.-B., Lee K. W., *et al.* 2018. The postprandial anti-hyperglycemic effect of pyridoxine and its derivatives using in vitro and in vivo animal models. *Nutrients*, **10** (3): 285.

Price N. C., Stevens L. 1982. *Fundamentals of enzymology*. Oxford University Press

Rosak C., Mertes G. 2012. Critical evaluation of the role of acarbose in the treatment of diabetes: patient considerations. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, **5**: 357.

Solis-Herrera C., Triplitt C., Reasner C., De Fronzo R. A., Cersosimo E. 2018. Classification of *Diabetes Mellitus*. U *Endotext* (ur. K. R. Feingold *et al.*). MD Text.com. Inc.

Tadera K., Minami Y., Takamatsu K., Matsuoka T. 2006. Inhibition of  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -Amylase

by Flavonoids. *Journal of Nutrient Science*, **52** (2): 149.

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

WHO (World Health Organisation) 2016. Global report on diabetes: executive summary. World Health Organisation

---

*Tija Milutinović*

## Bioinformatic and Experimental Evaluation of a Potential $\alpha$ -glucosidase Inhibitor

The  $\alpha$ -glucosidase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of non-reducing terminal

$\alpha$ -1,4-glycosidic bonds in both intracellular and extracellular environments.  $\alpha$ -glucosidase inhibitors are used in the oral therapy of chronic metabolic disease *diabetes mellitus* type 2. Due to the side effects of commercial antidiabetics, new  $\alpha$ -glucosidase inhibitors are being tested. Pyridoxine and its derivatives show a greater inhibitory effect than commercial acarbose therapeutics. The aim of this study was to investigate whether a newly synthesized palmitic acid pyridoxine derivative had  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity, and to perform a biological evaluation on a cancer cell system and *ex vivo* porcine intestinal model. Bioinformatic Docking analysis showed the binding of pyridoxine monopalmitate to the amino acids of the active center of intracellular and extracellular  $\alpha$ -glucosidase. The inhibitory effect of pyridoxine monopalmitate has not been established by experimental methods. 