

# Ispitivanje inhibicije aktivnosti butirilholinesteraze ekstraktima štavelja, medunike, kupine i vrbičice

---

*U radu je ispitana inhibicija butirilholinesteraze ekstraktima biljaka koje sadrže polifenolna jedinjenja. Aktivnost butirilholinesteraze određena je spektrofotometrijski. Ekstrakt štavelja pokazao je jako inhibitorno dejstvo na butirilholinesterazu. Ekstrakti medunike i kupine takođe inhibiraju enzim, dok ekstrakt vrbičice ne poseduje antiholinesteraznu aktivnost. Stepen inhibicije enzima povećava se sa povećanjem koncentracije ekstrakata. Utvrđeno je da inhibicija delimično potiče od galne i elaginske kiseline. Neophodno je detaljnije ispitivanje ostalih polifenolnih komponenti ovih ekstrakata kako bi se utvrdilo koja jedinjenja su inhibitori butirilholinesteraze i da li postoji sinergističko dejstvo prilikom inhibicije.*

---

## Uvod

Acetilholinesteraza (AChE) i butirilholinesteraza (BChE) su enzimi iz grupe holinesteraza. Ovi enzimi imaju 65% identičnu sekvencu aminokiselina (Soreq i Zaku 1993), zbog čega BChE takođe hidrolizuje acetilholin, ali sa manjim afinitetom nego AChE. Primenom selektivnih inhibitora BChE povećava se nivo acetilholina (Giacobini 2000), što predstavlja značajan podatak u terapiji poremećaja udruženih sa smanjenim stvaranjem acetilholina. Na ovaj način povećava se efikasnost holinergičke neurotransmisije, jer se sprečava hidroliza oslobođenog acetilholina i time obezbeđuje više ovog neurotransmitera u holinergičkoj sinapsi.

Butirilholinesteraza ima važnu ulogu u razvoju Alchajmerove bolesti. Pored esterazne aktivnosti, BChE poseduje i peptidaznu aktivnost (Chattonet i Masson 1986). Ovaj enzim uključen je u produkciju  $\beta$ -amiloidnog proteina iz prekursora amiloidnog proteina. Agregacija  $\beta$ -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).

---

Goran Tomić (1988),  
učenik 4. razreda  
Medicinske škole  
"Stevica Jovanović"  
u Pančevu

Jelena Vaslić (1989),  
učenica 3. razreda  
Ekonomiske škole  
"Svetozar Miletić" u  
Novom Sadu

Utvrđeno je da ekstrakti zelenog i crnog čaja koji sadrže polifenole imaju inhibitorno dejstvo na acetilholinesterazu i butirilholinesterazu (Okello *et al.* 2004). Galna kiselina i p-kumarinska kiselina, fenolne kiseline koje su široko zastupljene u prirodnim proizvodima, takođe poseduju antiholinesterazna svojstva (Tomić 2006). Zahvaljujući ovim saznanjima otvoreno je pitanje antiholinesterazne aktivnosti drugih biljnih ekstrakata koji sadrže polifenolne komponente. Ekstrakti štavelja, kupine, medunike i vrbičice sadrže visok ideo polifenolnih jedinjenja. Uticaj ekstrakata ovih biljaka na aktivnost butirilholinesteraze do sada nije ispitana.

**Cilj** ovog rada je utvrđivanje inhibitornog dejstva ekstrakata štavelja, kupine, medunike i vrbičice na aktivnost butirilholinesteraze.

## Materijal i metode

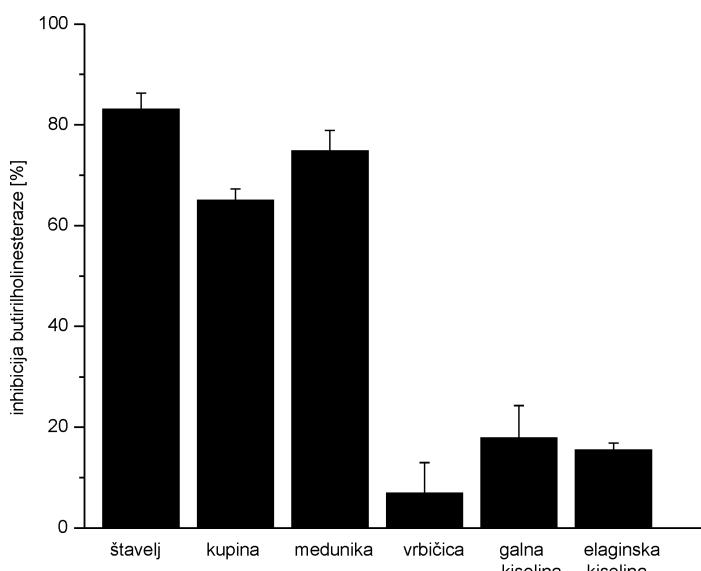
Za ispitivanje inhibicije korišćen je metanolni ekstrakt ploda štavelja (*Rumex obtusifolius*), metanolni ekstrakt cveta medunike (*Filipendula ulmaria*), acetonsko-vodeni ekstrakt semena kupine (*Rubus fruticosus*) i acetonsko-vodeni ekstrakt lista vrbičice (*Lythrum salicaria*). Korišćeni su Butirilholinesteraza iz seruma konja, Butiriltioholin jodid, DTNB (5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzojeva kiselina)), Galna kiselina i Elaginska kiselina (Sigma Chemical Co.).

**Određivanje aktivnosti butirilholinesteraze.** Enzimska aktivnost određena je spektrofotometrijski, korišćenjem butiriltioholin jodida kao supstrata za enzim. Svi rastvori pripremljeni su u fosfatnom puferu (0.067 M, pH 7.4). U kivetu je dodato 60 µL rastvora DTNB (0.01 M), 30 µL metanolnog odnosno acetonsko-vodenog ekstrakta inhibitora, 1000 µL rastvora butiriltioholin jodida (0.925 mM) i 1000 µL fosfatnog pufera. Reakcija je započeta dodavanjem 150 µL rastvora butirilholinesteraze (1 U/mL). Apsorbanca 5-tio-2-nitrobenzoata, proizvoda reakcije, merena je na talasnoj dužini od 414 nm (Cintra 10 UV/VIS Spectrophotometer, GBC Spectral, Melbourne) svakih 5 sekundi u periodu od 2 minuta (Ellman *et al.* 1961; Hillhouse *et al.* 2004). Neenzimska hidroliza supstrata eliminisana je pripremom probe kojoj nije dodat rastvor enzima. Rastvor metanola, odnosno rastvor aceton:voda (1:1), korišćen je kao kontrola za inhibitor. Osnovni rastvori inhibitora su razblaživani do sledećih koncentracija: 10 mg/mL, 7.5 mg/mL, 5 mg/mL, 2.5 mg/mL i 1.25 mg/mL. Koncentracija inhibitora u finalnoj zapremini menjana je od 0.017 mg/mL do 0.268 mg/mL.

**Statistička analiza.** Rezultati predstavljaju srednju vrednost SD četiri merenja kojima je ispitivan stepen aktivnosti inhibitora i dva merenja koja su vršena radi sastavljanja krivi inhibicije.

## Rezultati i diskusija

Ekstrakt štavelja doveo je do  $83 \pm 4\%$  inhibicije butirilholinesteraze. Ekstrakt medunike inhibirao je  $75 \pm 5\%$  enzimske aktivnosti, dok je inhibicija enzima ekstraktom kupine iznosila  $65 \pm 3\%$ . Ekstrakt vrbičice nije pokazao veći stepen inhibicije (slika 1). Koncentracije svih inhibitora iznose  $0.268 \text{ mg/mL}$  u finalnoj zapremini

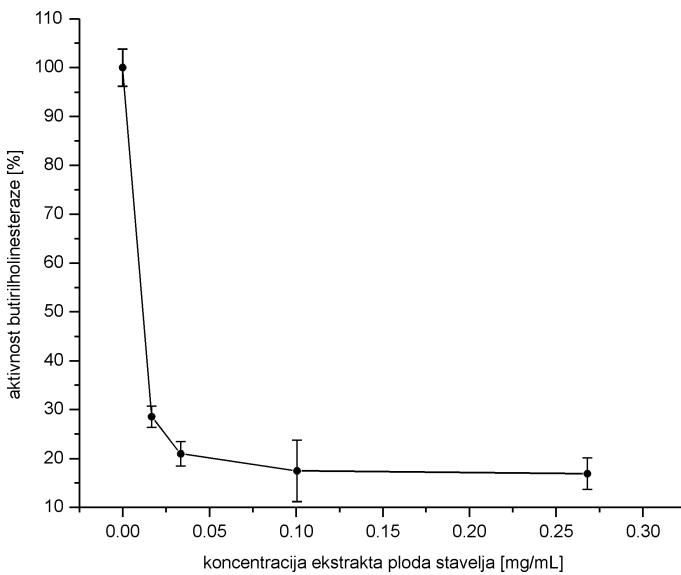


Slika 1.  
Inhibicija  
butirilholinesteraze  
različitim ekstraktima,  
galnom i elaginskom  
kiselinom

Figure 1.  
Butyrylcholinesterase  
inhibition caused by  
bitter dock,  
blackberry,  
meadowsweet and  
purple loosestrife  
extracts, and gallic  
and ellagic acid

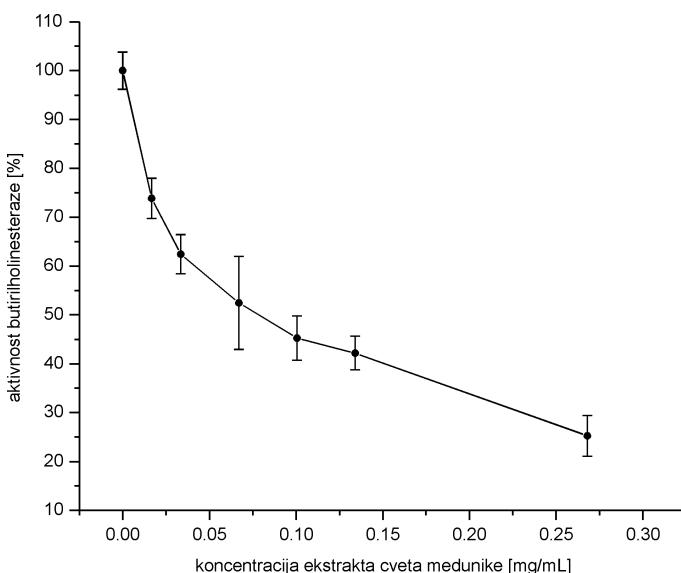
Kao inhibitori, u istoj koncentraciji korišćene su galna i elaginska kiselina koje su zastupljene u korišćenim ekstraktima. Na ovaj način provereno je da li inhibitorna svojstva ekstrakata potiču od ovih kiselina. Inhibicija enzima galnom kiselinom iznosila je  $18 \pm 7\%$ , a elaginskom kiselinom  $15 \pm 2\%$ . Rezultati pokazuju da galna i elaginska kiselina nisu jedine aktivne komponente pri inhibiciji butirilholinesteraze, i upravo je zato stepen inhibicije ekstrakata štavelja, medunike i kupine znatno jači. Pošto su u ovim ekstraktima prisutne i druge polifenolne komponente, verovatno je da one doprinose inhibiciji butirilholinesteraze, ili čak ispoljavaju sinergističko dejstvo sa galnom i elaginskom kiselinom. Stepen inhibicije biljnim ekstraktima je više puta veći od stepena inhibicije ispitanim fenolnim kiselinama.

Ekstrakt štavelja poseduje najizraženije antiholinesterazno svojstvo. Kriva inhibicije pokazuje da ekstrakt štavelja već pri koncentraciji od  $0.017 \text{ mg/mL}$  dovodi do jake inhibicije butirilholinesteraze od  $71 \pm 3\%$ , koja se povećava do  $83 \pm 4\%$  pri koncentraciji od  $0.268 \text{ mg/mL}$  (slika 2).



Slika 2.  
Kriva inhibicije  
butirilholinesteraze  
različitim  
koncentracijama  
ekstrakta šavelja  
(*Rumex obtusifolius*)

Figure 2.  
Curve of  
butyrylcholinesterase  
inhibition caused by  
different  
concentrations of  
bitter dock (*Rumex  
obtusifolius*) extract



Slika 3.  
Kriva inhibicije  
butirilholinesteraze  
različitim  
koncentracijama  
ekstrakta medunike  
(*Filipendula ulmaria*)

Figure 3.  
Curve of  
butyrylcholinesterase  
inhibition caused by  
different  
concentrations of  
meadowsweet  
(*Filipendula ulmaria*)  
extract

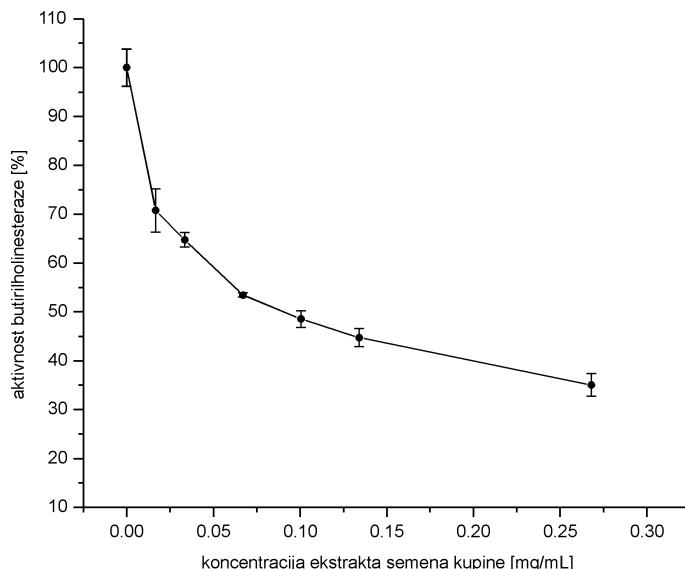
Ekstrakt šavelja sadrži katehin, epikatehin, epikatehin galat, procianidine i polimere procijanidina sa galoil grupama (Spencer *et al.* 2006). Ove polifenolne komponente mogle bi biti odgovorne za inhibiciju butirilholinesteraze ekstraktom šavelja, jer je u prethodnim istraživanjima utvrđeno da ekstrakt polifenola zelenog čaja inhibira acetilholinesterazu (Tomić 2005).

Kriva inhibicije butirilholinesteraze ekstraktom medunike pokazuje da ovaj ekstrakt dovodi do postepene inhibicije enzimske aktivnosti (slika 3).

Aktivnost enzima postepeno opada sa povećanjem koncentracije ekstrakta medunike, za razliku od ekstrakta štavelja, koji već pri nižim koncentracijama dovodi do visokog stepena inhibicije.

Ekstrakt medunike sadrži oko 20 fenolnih kiselina, od kojih su najzastupljenije galna i p-kumarinska kiselina (Krasnov i Raldugin 2006). Pošto galna i p-kumarinska kiselina poseduju antiholinesterazna svojstva (Tomić 2006) može se pretpostaviti da inhibitorna aktivnost ispitanog ekstrakta delimično potiče od ovih kiselina. U ekstraktu su prisutni i flavonoidi kao što su kvercetin, rutin i njihovi glikozidi (Lamaison *et al.* 1992). Ova jedinjenja mogu posedovati antiholinestrazna svojstva (Jung i Park 2007), ali je ovu pretpostavku neophodno detaljnije ispitati.

Aktivnost butirilholinesteraze smanjuje se u prisustvu ekstrakta kupine. Enzimska aktivnost opada sa povećanjem koncentracije ekstrakta kupine u reakcionoj smeši (slika 4).



Slika 4.  
Kriva inhibicije  
butirilholinesteraze  
različitim  
koncentracijama  
ekstrakta kupine  
(*Rubus fruticosus*)

Figure 4.  
Curve of  
butyrylcholinesterase  
inhibition caused by  
different  
concentrations of  
blackberry (*Rubus  
fruticosus*) extract

Inhibitorna aktivnost ekstrakta kupine može se objasniti visokom koncentracijom elagitanina, glavnih polifenolnih komponenti u semenu ove biljke.

Ispitani ekstrakti pokazuju različit stepen inhibicije butirilholinesteraze pri istim koncentracijama. Razlika u inhibitornoj aktivnosti verovatno je posledica različitog sadržaja polifenolnih komponenti u ekstraktima. Na osnovu prethodnih istraživanja o sadržaju ispitanih biljaka i inhibitornih svojstava jedinjenja prisutnih u ovim biljkama, može se pretpostaviti da su potencijalne antiholinesterazne komponente ovih ekstrakata procijanidini i katehini (štavelj), fenolne kiseline i flavonoidi, kvercetin i rutin (medunika) i elagitanini (kupina).

## Zaključak

Ispitana je inhibicija butirilholinesteraze ekstraktima štavelja, medunike, kupine i vrbičice. Ispitani ekstrakti pokazali su visok stepen inhibicije, sem ekstrakta vrbičice, koji nije inhibirao enzimsku aktivnost. Najizraženije antiholinesterazno svojstvo poseduje ekstrakt štavelja, inhibirajući  $71\pm3\%$  enzimske aktivnosti, pri koncentraciji od 0.017 mg/mL. Stepen inhibicije ovim inhibitorom postignut najvećom korišćenom koncentracijom od 0.268 mg/mL iznosio je  $83\pm4\%$ . Krive inhibicije pokazuju da aktivnost butirilholinesteraze opada sa povećanjem koncentracije ekstrakata. Ispitani ekstrakti pokazali su veći stepen inhibicije u poređenju sa galnom i elaginskom kiselinom, fenolnim kiselinama koje su prisutne u ekstraktima. Na osnovu ovog rezultata, može se zaključiti da galna i elaginska kiselina nisu jedini inhibitori u ekstraktima. Analizom sadržaja biljaka na osnovu ranijih istraživanja, zaključuje se da su potencijalni inhibitori prisutni u ovim ekstraktima procijanidini, polimeri procijanidina i katehini (štavelj), fenolne kiseline i flavonoidi, kvercetin i rutin (medunika) i elagitanini (kupina). Budući da je ovo prvo ispitivanje antiholinesteraznih svojstava štavelja, medunike i kupine, neophodna su detaljnija ispitivanja inhibitornih dejstava komponenata ovih biljaka kako bi se identifikovala jedinjenja sa jakom antiholinesteraznom aktivnošću i razjasnio mehanizam njihovog inhibitornog dejstva.

**Zahvalnost.** Autori rada se zahvaljuju Minji Jovanović za ekstrakte biljaka.

## Literatura

- 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.
- Giacobini E. 2000. *Cholinesterases and cholinesterase inhibitors*. London: Martin Dunitz.
- Guillozet A., Smiley J. F., Mash D. C., Mesulam M. M. 1997. Butyryl-cholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Annals of neurology*, **42**: 909.
- Ellman G. L., Courtney K. D., Andres B., Featherstone R. M. Jr. 1961. New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, **7**: 88.
- Hillhouse B. J., Ming D. S., French C. J., Towers G. H. N. 2004. Acetyl-choline Esterase Inhibitors in Rhodiola rosea. *Pharmaceutical Biology*, **42** (1): 68.
- Krasnov E. A., Ral'dugin V. A. 2006. Phenolic compounds from *Filipendula ulmaria*. *Chemistry of Natural Compounds*, **42** (2): 122.

- Lamaison J. L., Petitjean-Freytet C., Carnat A. 1992. Principal flavonoids of aerial parts of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. subsp. *ulmaria* and subsp. *Denudata*. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, **68**: 218.
- Jung M., Park M. 2007. Acetylcholinesterase Inhibition by Flavonoids from *Agrimonia pilosa*. *Molecules*, **12**: 2130.
- 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., Zaku H. 1993. *Human cholinesterases and anticholinesterases*. New York: Academic Press
- Spencer P., Sivakumaran S., Fraser K., Yeap Foo L., Lane G. A., Edwards P. J. B., Meagher L. P. 2007. Isolation and Characterisation of Procyanolidins from *Rumex obtusifolius*. *Phytochemical Analysis*, **18** (3): 193.
- Tomić G. 2005. Ispitivanje kinetike inhibicije aktivnosti enzima acetilholinesteraze polifenolima zelenog čaja. *Petničke sveske*, **58**: 227.
- Tomić G. 2006. Ispitivanje antiholinesterazne aktivnosti galne i p-kumarinske kiseline, nepublikovani rad. Istraživačka stanica Petnica: Petnica

---

Goran Tomić and Jelena Vaslić

## Butyrylcholinesterase Inhibitory Activity of Bitter Dock, Meadowsweet, Blackberry and Purple Loosestrife Extracts

Polyphenols are natural compounds widely distributed in plants. It has been determined that polyphenols have anticholinesterase properties. The increase of the acetylcholine level, as a result of the application of reversible acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors, is seen as a potential therapy for diseases accompanied by a resulting acetylcholine level decline. Anticholinesterase activity of plant extracts rich in polyphenol, such as bitter dock (*Rumex obtusifolius*), meadowsweet (*Filipendula ulmaria*), blackberry (*Rubus fruticosus*) and purple loosestrife (*Lythrum salicaria*), has not been determined. Therefore, the aim of this study was to determine the butyrylcholinesterase inhibitory activity of these plants' extracts.

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 showed that bitter dock, meadowsweet and blackberry extracts inhibit butyrylcholinesterase, while the purple loosestrife extract had no anticholinesterase activity. The bitter dock extract inhibited butyrylcholinesterase by  $71\pm3\%$  at a concentration of 0.017 mg/mL, and by  $83\pm4\%$  at a concentration of 0.268 mg/mL. The meadowsweet extract showed a  $75\pm5\%$  inhibition, while the blackberry extract inhibited the enzyme by  $65\pm3\%$  when tested at 0.268 mg/mL (Figure 1). The curves of inhibition show that the enzyme inhibition by these extracts is dose dependent (Figures 2-4). The extracts inhibit enzyme activity significantly, when compared to gallic and ellagic acid. This result suggests that the gallic and ellagic acid in these extracts are only partly responsible for butyrylcholinesterase inhibition. There are other inhibitors in these extracts, such as procyanidins, procyanidin polymers, catechin, epicatechin and epicatechin gallate (bitter dock), phenolic acids and flavonoids such as quercetin and rutin (meadowsweet) and ellagitannins (blackberry) which need to be tested for anticholinesterase activity.

Bitter dock, meadowsweet and blackberry extracts inhibit butyrylcholinesterase in a dose-dependent manner. Inhibition is partly mediated by gallic and ellagic acid. Strong butyrylcholinesterase inhibitors are present in these extracts and synergy is likely. Further research is necessary in order to determine the inhibitors in these extracts and clarify the inhibition mechanism of these compounds.

