

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SAŠA JOŠT
MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SAŠA JOŠT

**OPTIMIZACIJA METODE ZA SPEKTROFOTOMETRIČNO DOLOČANJE
ZAVIRANJA PANKREASNE LIPAZE Z RASTLINSKIMI IZVLEČKI**

**OPTIMIZATION OF THE METHOD FOR SPECTROPHOTOMETRIC
DETERMINATION OF THE INHIBITION OF PANCREATIC LIPASE WITH
PLANT EXTRACTS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom prof. dr. Sama Krefta, mag. farm.

Zahvala

Ob tej priložnosti se iskreno zahvaljujem prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. za vso strokovno pomoč, prijaznost in usmerjanje pri izdelavi magistrske naloge.

Zahvaljujem se tudi članicama komisije za pregled magistrske naloge.

Hvala staršema, ki sta mi omogočila ta dan, ter ostalim mojim najbližjim, ki ste mi nudili oporo in naredili študijska leta še bolj raznolika in zabavna. Brez vas ta dan ne bi bil tako lep!

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Sama Krefta, mag. farm.

Saša Jošt

VSEBINA

VSEBINA	I
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD	1
1.1 Debelost	1
1.1.1 Uravnavanje in zdravljenje debelosti	2
1.1.1.1 Dieta in telesna vadba	4
1.1.1.2 Zdravljenje z zdravili	4
1.1.1.3 Kirurško zdravljenje debelosti	7
1.2 Maščobe in regulacija metabolizma maščob	7
1.3 Pankreasna lipaza in njena inhibicija	9
1.3.1 Sintezni zaviralci	11
1.3.2 Polsintezni zaviralci.....	11
1.3.3 Naravni zaviralci	11
1.4 Določanje inhibicije pankreasne lipaze	13
2 NAMEN DELA	16
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 Materiali	17
3.1.1 Rastlinski material	17
3.1.2 Kemikalije	18
3.1.3 Aparature	19
3.2 Metode	19
3.2.1 Priprava reagentov in izvlečkov	19
3.2.1.1 Priprava Tris-HCl pufra	19
3.2.1.2 Priprava raztopine substrata	20
3.2.1.3 Priprava raztopine encima.....	20
3.2.1.4 Priprava raztopine zaviralca	20
3.2.1.5 Priprava rastlinskih izvlečkov	20
3.2.2 Uporaba reagentov, izvlečkov in aparaturn	21
3.2.2.1 Spektrofotometrična metoda	21
3.2.2.2 Uporaba izvlečkov za preverjanje čistosti s TLC.....	23
3.2.3 Optimizacija metode.....	24
3.2.3.1 Poskus 1	24
3.2.3.2 Poskus 2	25
3.2.3.3 Poskus 3	26
3.2.3.4 Poskus 4	26
3.2.3.5 Poskus 5	26
3.2.3.6 Poskus 6	27
3.2.3.7 Poskus 7	28
3.2.3.8 Poskus 8	28
3.2.3.9 Poskus 9	29
3.2.3.10 Poskus 10	30
3.2.3.11 Poskus 11	31

3.2.3.12	Poskus 12	31
3.2.4	Dokazovanje zaviralcev.....	31
3.2.4.1	Poskus 13	31
3.2.4.2	Poskus 14	32
3.2.4.3	Poskus 15	32
3.2.4.4	Poskus 16	32
3.2.4.5	Poskus 17	33
4	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	34
4.1	Optimizacija metode.....	34
4.1.1	Poskus 1.....	34
4.1.2	Poskus 2.....	36
4.1.3	Poskus 3.....	39
4.1.4	Poskus 4.....	41
4.1.5	Poskus 5.....	42
4.1.6	Poskus 6.....	43
4.1.7	Poskus 7.....	44
4.1.8	Poskus 8.....	45
4.1.9	Poskus 9.....	47
4.1.10	Poskus 10	48
4.1.11	Poskus 11	50
4.1.12	Poskus 12	52
4.2	Dokazovanje zaviralcev	53
4.2.1	Poskus 13.....	53
4.2.2	Poskus 14.....	54
4.2.3	Poskus 15.....	55
4.2.4	Poskus 16.....	56
4.2.5	Poskus 17.....	56
5	SKLEP	58
6	LITERATURA	60

Kazalo slik

Slika 1: Model energijske bilance. Povzeto po (12).....	3
Slika 2: Prebava maščob. Povzeto po (32).	8
Slika 3: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 1	34
Slika 4: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 2, kjer je bil kot zadnja komponenta reakcijske zmesi dodan encim (vrstni red 2). Prikazane so absorbance po odštetju slepih vzorcev.	37
Slika 5: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 2, kjer je bil kot zadnja komponenta reakcijske zmesi dodan substrat (vrstni red 3). Prikazane so absorbance po odštetju slepih vzorcev.	38
Slika 6: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 3, kjer je bil kot zadnja komponenta reakcijske zmesi dodan encim (vrstni red 2). Prikazane so absorbance po odštetju slepih vzorcev.	39
Slika 7: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 3, kot zadnja komponentna reakcijske zmesi je bil dodan substrat (vrstni red 3). Prikazane so absorbance po odštetju slepih vzorcev.	40
Slika 8: Fotografija razvite TLC plošče rastlinskih vzorcev poskusa 5 z MF 1.....	42

Slika 9: Fotografija razvitih TLC plošč rastlinskih vzorcev poskusa 6. Na levi strani TLC plošča razvita z MF 2, na desni strani TLC plošča razvita z MF 3.	44
Slika 10: Fotografija razvitih TLC plošč rastlinskih vzorcev poskusa 6 pod UV lučjo 366 nm. Na levi strani TLC plošča razvita z MF 2, na desni strani TLC plošča razvita z MF 3.	44
Slika 11: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 7.....	45
Slika 12: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 8.....	46
Slika 13: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 9 brez DMSO	47
Slika 14: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 9 z DMSO	48
Slika 15: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 10 kontrole 1	49
Slika 16: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 10 kontrole 2	50
Slika 17: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 11 kontrole 1	51
Slika 18: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 11 kontrole 2	51
Slika 19: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 12, kjer smo pri zadnem koraku pipetiranja reakcijsko zmes premešali s pipeto. Prikazane so absorbance po odštetju slepih vzorcev.	52
Slika 20: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 12, kjer je bila koncentracija dodane raztopine substrata polovico nižja in kjer smo pri zadnem koraku pipetiranja reakcijsko zmes premešali s pipeto. Prikazane so absorbance po odštetju slepih vzorcev.....	53
Slika 21: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 13.....	54

Kazalo preglednic

Preglednica I: Zdravila proti debelosti, ki so bila na seznamu odobrenih zdravil s strani Evropske agencije za zdravila (EMA) in Ameriškega vladnega urada za zdravila in prehrano (FDA) oktobra 2015 (4,26,27)	5
Preglednica II: Vrste rastlinskega materiala.....	18
Preglednica III: Prikaz sestave reakcijskih zmesi. Vsak stolpec predstavlja posamezno reakcijsko zmes v svoji vdolbinici mikrotitrne ploščice.....	21
Preglednica IV: Postopek dodajanja raztopin in topil v vdolbinice mikrotitrne ploščice - vrstni red 1	24
Preglednica V: Vrstni red dodajanja raztopin in topil v vdolbinice mikrotitrne ploščice - vrstni red 2.....	25
Preglednica VI: Vrstni red dodajanja raztopin in topil v vdolbinice mikrotitrne ploščice - vrstni red 3	25
Preglednica VII: Vrstni red dodajanja raztopin in topil v vdolbinice mikrotitrne ploščice - vrstni red 4	29
Preglednica VIII: Vrstni red dodajanja raztopin in topil v vdolbinice mikrotitrne ploščice - vrstni red 5	29
Preglednica IX: Vrstni red dodajanja raztopin in topil v vdolbinice mikrotitrne ploščice - vrstni red 6.....	30
Preglednica X: Vrstni red dodajanja raztopin in topil v vdolbinice mikrotitrne ploščice - vrstni red 7.....	30
Preglednica XI: Rezultati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 1	36
Preglednica XII: Rezultati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 2, kjer je bil kot zadnja komponenta dodan encim (vrstni red 2).....	37

Preglednica XIII: Rezutati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 2, kjer je bil kot zadnja komponenta dodan substrat (vrstni red 3).....	38
Preglednica XIV: Rezutati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 3, kjer je bil kot zadnja komponenta dodan encim (vrstni red 2).....	40
Preglednica XV: Rezutati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 3, kjer je bil kot zadnja komponenta dodan substrat (vrstni red 3).....	41
Preglednica XVI: Rezutati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 4	41
Preglednica XVII: Zaporedje TLC nanosa ter rezutati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 5	42
Preglednica XVIII: Rezutati naklonov pri poskusu 6.....	43
Preglednica XIX: Rezutati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 8	46
Preglednica XX: Rezutati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 13.....	54
Preglednica XXI: Rezutati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 14	55
Preglednica XXII: Rezutati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 15	55
Preglednica XXIII: Rezutati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 16.....	56
Preglednica XXIV: Rezutati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 17	57

Kazalo enačb

Enačba 1: Enačba za izračun naklonov krivulj.....	23
Enačba 2: Enačba za izračun odstotka inhibicije.....	23

POVZETEK

Debelost dandanes predstavlja problem, ki dosega epidemične razsežnosti, zato je vedno večji poudarek na iskanju in raziskovanju novih učinkovin za zdravljenje in uravnavanje debelosti. Eden izmed najbolj proučevanih mehanizmov za določevanje potencialne učinkovitosti naravnih proizvodov kot sredstev proti debelosti je inhibicija pankreasne lipaze. Pri optimizaciji spektrofotometrične metode merjenja zaviranja pankreasne lipaze smo kot osnovo za merjenje aktivnosti pankreasne lipaze uporabili metodo iz literature ter kot izhodiščnega zaviralca tega encima učinkovino orlistat. Metodo smo skušali optimizirati z uporabo različnih topil, s prilagajanjem koncentracij reagentov in izvlečkov, različnimi zaporedji dodajanja le-teh v reakcijske zmesi, z uporabo različnih pipet in različnih nastavitev mikrotitrskega čitalca z namenom testiranja rastlinskih izvlečkov. Z izboljšanimi metodami smo nato izvedli meritve za dokazovanje zaviralcev v rastlinskih materialih graha, koruze, lipe, vednozelenega gornika in bele jelke. Optimizirano metodo je predstavljala uporaba naslednjih spremenjenih parametrov: kontinuirano merjenje (izvajanje meritev vsako minuto, 25 minut), zmanjšanje koncentracije raztopine encima na 1,25 g/L, vrstni red dodajanja 2, kjer v reakcijsko zmes v zadnjem koraku dodamo raztopino encima, uporaba 8-kanalne pipete pri pipetiranju zadnjega koraka, časovno kontrolirano raztapljanje pankreasne lipaze pri pripravi raztopine encima (17 minut), dodatek dimetil sulfoksida direktno v raztopino s substratom, ročno mešanje reakcijskih zmesi s pipetami po pipetiranju zadnjega koraka. Nekatere od teh sprememb metode so omogočile tudi boljši vpogled v dogajanje v reakcijskih zmesih in hitrost poteka reakcij. Pri dokazovanju zaviralcev v rastlinskih materialih se je za najobetavnejšega izkazal zamrznjen grah Ledo, medtem ko so druge zamrznjene vrste graha dajale različne rezultate, kar kaže na to, da metoda še ni dovolj robustna. Ostali rastlinski materiali niso izkazali inhibicijske aktivnosti, oziroma so meritve kazale celo na aktivacijo, kar pa je verjetno posledica nekih neidentificiranih interakcij med komponentami reakcijske zmesi in ne dejanske povečane encimske aktivnosti. Za potrditev zaviralnega delovanja graha bi bilo potrebno izvesti nadaljne raziskave s pH-stat metodo, ki velja za referenčno.

Ključne besede: Zaviranje aktivnosti pankreasne lipaze, spektrofotometrična metoda, optimizacija, grah

ABSTRACT

Obesity has become a problem of epidemic proportions. Therefore, there is an increasing emphasis on finding and researching of new agents for treatment and regulation of it. One of the most studied mechanisms for determining the potential effectiveness of natural products as anti-obesity agents is the inhibition of pancreatic lipase. For optimization of the spectrophotometric method for measuring pancreatic lipase inhibition, we used a method from the literature as the basis for measuring the activity of the pancreas lipase and the active ingredient orlistat as the starting inhibitor of this enzyme. We tried to optimize the method by using various solvents, by adjusting the concentrations of reagents and extracts, by varying the sequence of adding them to the reaction mixture, using various pipettes and various settings of microplate reader with the purpose of testing plant extracts. With improved methods, we then performed measurements to determine inhibitors in the plant materials of peas, maize, large leaved lime, bearberry and silver fir. The following parameters were modified for the optimized method: continuous measurement (measurements performed every minute for 25 minutes), enzyme solution concentration reduced to 1,25 g/L, the sequence 2 of adding reagents and extracts where the enzyme solution is added to the reaction mixture in the last step, use of the 8-channel pipette when pipetting the last step, time-controlled dissolution of pancreatic lipase in the preparation of the enzyme solution (17 minutes), addition of dimethyl sulfoxide directly to the substrate solution, manual mixing of the reaction mixtures with pipettes after the last step of pipetting. Some of these method changes also made it possible to get a better insight into the events in the reaction mixtures and the reaction velocity. When determining inhibitors in plant materials, the frozen peas Ledo proved to be the most promising, while other frozen pea varieties yielded different results indicating that the method is still not robust enough. Other plant materials did not show inhibition activity, or the measurements even indicated activation, which is probably the result of some unidentified interactions between the components of the reaction mixture, and not the actual increased enzymatic activity. To confirm the inhibitory activity of the peas, further research should be carried out using the pH-stat method, which is considered as a reference.

Keywords: Inhibition of pancreatic lipase activity, spectrophotometric method, optimization, peas

SEZNAM OKRAJŠAV

Okrajšava	Razlaga
A	absorbanca
%INH t_1-t_2	odstotek inhibicije v območju med meritvijo pri t_1 . minuti in meritvijo pri t_2 . minuti
DMSO	dimetil sulfoksid
EMA	Evropska agencija za zdravila
EtOH	etanol
FDA	Ameriški vladni urad za zdravila in prehrano
ITM	indeks telesne mase
LDL	lipoproteini nizke gostote (ang. <i>low-density lipoproteins</i>)
LFK	lizofosfatidna kislina
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MG	monoglicerid
N t_1-t_2	naklon v območju med meritvijo pri t_1 . minuti in meritvijo pri t_2 . minuti
PMK	proste maščobne kisline
PNP	p-nitrofenilpalmitat
Rastl. izvł.	rastlinski izvleček
Razt. encima	raztopina encima
Razt. zav.	raztopina zaviralca
Razt. PNP	raztopina substrata
t	čas
TG	trigliceridi
TLC	tankoplastna tekočinska kromatografija (ang. <i>thin layer chromatography</i>)
UZ kopel	ultrazvočna kopel

1 UVOD

1.1 Debelost

Globalne razsežnosti debelosti in njena oznaka epidemije sta bili uradno priznani s strani Svetovne zdravstvene organizacije leta 1997 (1). Že sam izraz "globesity", ki je skovanka angleških besed globalno in debelost, priča o stopnjevanju do svetovne pandemije, ki prizadeva tako razvite države kot države v razvoju (2,3). Dandanes se debelost tako že spreminja v bolj resen problem kot podhranjenost. V sodobnem svetu predstavlja izhodišče za splošno slabše zdravje zaradi zmanjševanja kakovosti življenja, večjega obolenja za številnimi boleznimi in skrajševanja življenjske dobe - ne samo pri odraslih, temveč tudi pri otrocih in mladostnikih po vsem svetu. Ocenjeno je, da je bilo v letu 2010 zaradi prekomerne telesne mase in debelosti 3,4 milijona smrtnih primerov (4).

Leta 2014 je imelo prekomerno telesno maso več kot 1,9 milijarde odraslih, od tega je bilo več kot 600 milijonov debelih (4). Poročilo Svetovne zdravstvene organizacije za leto 2015 kaže, da znaša odstotek splošne stopnje debelosti med odraslimi v evropski regiji 21,5 % pri moških in 24,5 % pri ženskah. Isto poročilo navaja, da znaša razširjenost prekomerne telesne mase pri otrocih mlajših od 5 let 12,4 % (4). Podatki za Slovenijo kažejo, da je bilo leta 2014 debelih 21,0 % moških in 17,4 % žensk (5). Glede na trenutne trende je predvideno, da bo do leta 2030 do 57,8 % svetovnega odraslega prebivalstva (3,3 milijarde ljudi) imelo prekomerno telesno maso oziroma bo debelih (6).

Debelost je kronična presnovna bolezen, za katero je značilno prekomerno kopičenje maščevja v telesu (7). Povezana je s številnimi ostalimi kroničnimi boleznimi in zapleti, kot so hiperlipidemije, diabetes tipa 2, hipertenzija, endotelijska disfunkcija, nealkoholna steatoza jeter, apneja in sindrom hipoventilacije, kardiovaskularni zapleti, reproduktivne motnje, nekateri karcinomi, ortopedske motnje (7,8).

V klinični praksi ocenjujemo debelost glede na indeks telesne mase (ITM) in količino visceralnega maščevja, ki ga je mogoče oceniti z meritvijo obsega pasu. Le-ta je znak večjega tveganja za razvoj metabolične bolezni, bolezni srca in ožilja ter sladkorne bolezni tipa 2 (4). Pri določanju ocene debelosti predvsem pri normalni ali zmanjšani telesni masi sta uporabni metodi merjenja prevodnosti kože in podkožja ter debeline kožne gube (7).

ITM predstavlja razmerje med telesno maso v kilogramih in kvadratom višine izraženim v m². Po mednarodni klasifikaciji vrednosti ITM med 18,50 in 24,99 kg/m² pomenijo

normalno hranjenost. Vrednosti ITM pod $18,50 \text{ kg/m}^2$ predstavljajo podhranjenost, vrednosti ITM $25,00 \text{ kg/m}^2$ ali več pa stanje prekomerne telesne mase. Vrednosti ITM od $30,00 \text{ kg/m}^2$ dalje predstavljajo debelost; pri vrednostih $30,00\text{-}34,99 \text{ kg/m}^2$ govorimo o debelosti prve stopnje, $35,00\text{-}39,99 \text{ kg/m}^2$ debelosti druge stopnje, če je vrednost ITM $40,00 \text{ kg/m}^2$ ali več pa o debelosti tretje stopnje (9).

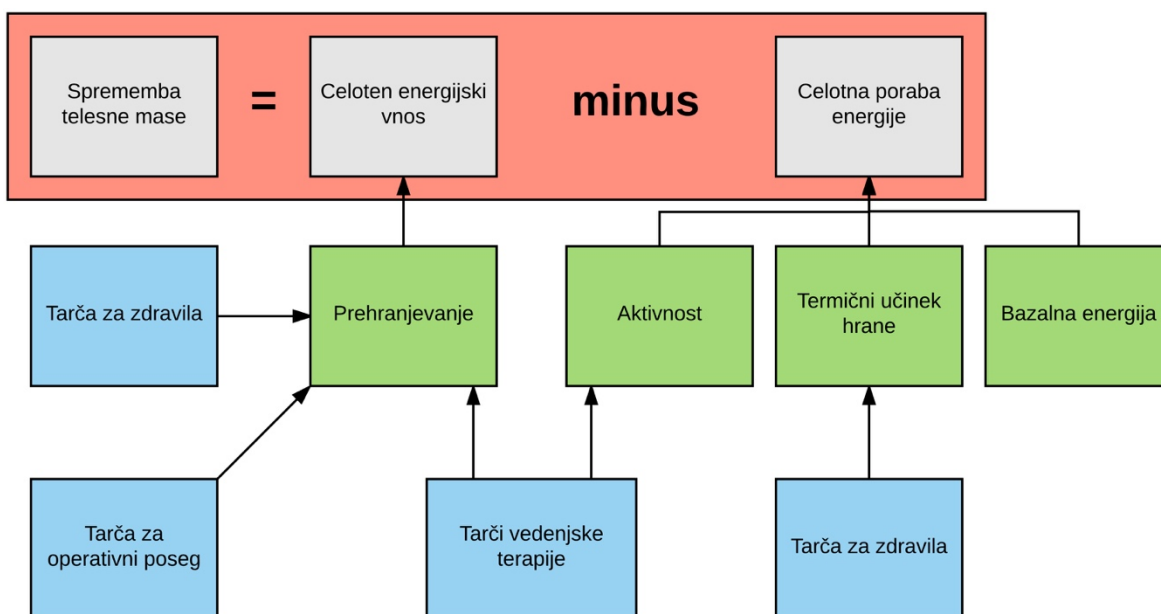
Za pojav debelosti je nujen pogoj pozitivna energijska bilanca, kar pomeni, da telo prejema več energije, kot je porabi (7). V regulaciji energijskega ravnotežja in zalog maščob so prepletene kompleksne povezave med biološkimi, vedenjskimi, socialnimi in okoljskimi dejavniki. Vzroki za pojav debelosti so raznoliki, v prvi vrsti jih gre pripisati sedečemu življenjskemu slogu, zmanjšani telesni aktivnosti, večjim obrokom hrane in preveliki zaužiti količini ogljikovih hidratov in maščob (4). Tudi revščina v povezavi z lažjo cenovno dostopnostjo energijsko bogate hrane ter slabša izobrazba vplivajo na večjo pojavnost prekomerne telesne mase in debelosti (10).

Čeprav je večina primerov povečane telesne mase povezana s povečanim vnosom kalorij in sedečim življenjskim slogom, poznamo tudi sekundarno debelost, pri kateri vzroki vplivajo na lakoto, presnovo, energetsko ravnovesje in porazdelitev maščob (11). Vzroki vključujejo endokrinološke in genetske motnje, sindromske debelosti ter debelost povezano z zdravili. Ti vzroki za nastanek debelosti so velikokrat neopaženi in nezdravljeni. Kljub vsemu je sekundarna debelost redka v primerjavi z najpogostejšo etiologijo, ki jo predstavljajo okoljski dejavniki na genetske predispozicije. Zato je sprememba življenjskega sloga, ki vključuje spremembe v prehrani in povečano telesno aktivnost, še vedno temelj pri upravljanju z debelostjo ter tudi pri večjih sekundarnih debelostih (11).

1.1.1 Uravnavanje in zdravljenje debelosti

Ker je debelost rezultat daljše pozitivne razlike med energijskim vnosom in porabo energije, izguba telesne maščobe torej zahteva ravno obratno spremembo tega neravnovesja (12). Slika 1 prikazuje uravnavanje telesne mase v človeškem organizmu, s tem povezane procese in tarče za uravnavanje in zdravljenje debelosti. Enačba na sliki prikazuje, da je sprememba v telesni masi posledica razlike med celotnim energijskim vnosom in celotno porabo energije. Z zeleno so označena polja, ki so podenote sivih polj iz same enačbe. Z modrimi polji so nakazana mesta, kjer lahko terapevtsko vplivamo na

enačbo (12). Upravljanje in zdravljenje debelosti tako zajema nefarmakološke ukrepe, kot so dieta, telesna vadba ali v skrajnih primerih operativni poseg, in zdravljenje z zdravili, ki se vključujejo v proces uravnavanja telesne mase na različnih mestih in pri različnih procesih v organizmu (13).



Slika 1: Model energijske bilance. Povzeto po (12).

Glede na prepleten večfaktorski izvor debelosti je pri njegovem upravljanju potreben individualno prilagojen in celovit pristop. Celovito upravljanje debelosti je mogoče doseči le z multidisciplinarno ekipo strokovnjakov sposobnih za reševanje različnih vidikov debelosti in z njo povezanih bolezni. Raziskave kažejo, da so izgube telesne mase z multidisciplinarnim pristopom (5 % do 10 % začetne telesne mase) večje od tistih, ki so dosežene z običajno oskrbo in omejenim zagotavljanjem svetovanja (14). Ker so farmacevtski ukrepi pomemben del v strategiji upravljanja debelosti, se z udeležbo farmacevtov v multidisciplinarni skupini lahko močno poveča kakovost oskrbe pacientov (15).

Za odkrivanje debelosti so odgovorni zdravstveni delavci na vseh ravneh zdravstvenega varstva (16). Zdravljenje mora biti prilagojeno posamezniku, temeljiti na intervencijah, ki so podprte z dokazi, in v koraku z novimi odkritji ter osredotočeno na za posameznika dosegljive in dolgoročno vzdržljive cilje (17). Ustrezna urejenost pridruženih bolezni in

izboljševanje kvalitete življenja bolnikov s prekomerno maso prav tako predstavljata cilje zdravljenja (4).

1.1.1.1 Dieta in telesna vadba

Dandanes ljudje uživamo preveč maščob in enostavnih sladkorjev ter premalo vlaknin (18).

Zelo pomemben prvi ukrep pri zmanjševanju telesne mase je tako uravnotežena nizkokalorična prehrana in sprememba prehranskih navad z namenom zmanjšanja zdravstvenih tveganj (19,20).

Vključevanje stročnic v prehrano je lahko koristna strategija pri hujšanju, saj ima majhen pozitiven učinek na hujšanje tudi, ko dieta ni kalorično omejena (21), prav tako pa je priporočeno za preprečevanje kroničnih bolezni - med drugim debelosti. Generalna skupščina Združenih narodov je leto 2016 na podlagi takšnih koristi razglasila za »mednarodno leto stročnic« (22). S spontano izgubo telesne mase je povezano tudi omejevanje maščob v prehrani, saj je le-to učinkovita metoda za zniževanje zaužite energijske gostote (23).

Dodatni ukrep pri uravnavanju telesne mase predstavlja aerobna vadba, ki je optimalen način vadbe za zmanjševanje količine telesnih maščob (4). Kratkoročno gledano je izgubljanje telesne mase enako učinkovito ob prilagoditvi diete same v primerjavi s kombinacijo diete in telesne vadbe, medtem ko je v daljšem obdobju hujšanje bolj učinkovito pri kombinaciji diete in telesne vadbe. Programi, ki so osnovani samo na fizični aktivnosti, pa so manj učinkoviti od združenih programov tako pri kratkoročnih kot tudi pri dolgoročnih rezultatih (20).

1.1.1.2 Zdravljenje z zdravili

Farmakološko zdravljenje je potrebno obravnavati kot del celovite strategije obvladovanja bolezni. Zdravljenje z zdravili lahko pomaga bolnikom pri vzdrževanju stabilne telesne mase, pri izboljšanju z debelostjo povezanih zdravstvenih tveganj in kvaliteti življenja (4). Debelost je kronično zdravstveno stanje in podobno kot pri drugih kroničnih obolenjih (npr. diabetes, hipertenzija) se po prenehanju jemanja zdravil ponavadi povrne začetno stanje (24).

Trenutna farmakološka terapija je priporočljiva pri bolnikih z ITM nad 30 kg/m² ali nad 27 kg/m² pri bolnikih s pridruženimi boleznimi. Zdravila je potrebno uporabljati v skladu z

njihovimi navodili in omejitvami ter njihovo učinkovitost oceniti po 3 mesecih uporabe. Če izguba telesne mase doseže zadovoljivo vrednost (več kot 5 % začetne telesne mase pri nediabetičnih in več kot 3 % pri diabetičnih bolnikih), se s takšnim zdravljenjem nadaljuje. Zdravljenje z zdravili je potrebno prekiniti pri bolnikih brez odziva na le-to (4).

Skupine zdravil za zdravljenje debelosti glede na delovanje ločimo v naslednje skupine:

- centralno delujoča zdravila, ki vplivajo na regulacijo vnosa hrane, oziroma zaviralci apetita
- periferno delujoča zdravila, ki vplivajo na absorpcijo hranil, oziroma preprečevalci absorpcije hranil
- zdravila, ki povečajo porabo energije, oziroma povečevalci presnove (24,25).

Preglednica I: Zdravila proti debelosti, ki so bila na seznamu odobrenih zdravil s strani Evropske agencije za zdravila (EMA) in Ameriškega vladnega urada za zdravila in prehrano (FDA) oktobra 2015 (4,26,27)

SKUPINA DELOVANJA	UČINKOVINA	MEHANIZEM DELOVANJA	TRAJANJE ZDRAVLJENJA	EMA/FDA
Preprečevalci absorpcije hranil	Orlistat	Zaviralec pankreasne lipaze	Dolgotrajno	Da/Da
Zaviralci apetita	Lorkaserin	Agonist serotonin-2C receptorja	Dolgotrajno	Ne/Da
Zaviralci apetita	Fentermin in topiramet	Simpatikomimetik in GABA modulator	Dolgotrajno	Ne/Da
Zaviralci apetita	Fentermin	Simpatikomimetiki	Kratkotrajno	Da/Da
Zaviralci apetita	Dietilpropion	Simpatikomimetiki	Kratkotrajno	Da/Da
Zaviralci apetita	Benzfetamin	Simpatikomimetiki	Kratkotrajno	Da/Da
Zaviralci apetita	Fendimetrazin	Simpatikomimetiki	Kratkotrajno	Da/Da
Zaviralci apetita	Liraglutid	GLP-1 R agonist	Dolgotrajno	Da/Da
Zaviralci apetita in povečevalci presnove	Bupropion in naltrekson	Zaviralec dopamina in ponovnega privzema noradrenalina in mu-opioidni antagonist	Dolgotrajno	Da/Da

Med preprečevalce absorpcije maščob spada orlistat, ki je zaviralec гастриčne in pankreasne lipaze. Orlistat je na voljo brez recepta (Alli®) v 60 mg odmerku in kot zdravilo na recept (Xenical®) v 120 mg odmerku. Režim jemanja je med ali do 1 uro po obroku, ki vsebuje maščobe. Njegova učinkovitost ni odvisna od sistemske absorpcije. Pri uporabi orlistata je možna zmanjšana absorpcija nekaterih v maščobah topnih vitaminov (A, D, E, K) in beta karotena, zato je priporočljiva uporaba vitaminskih pripravkov. Pri odmerku 120 mg 3-krat dnevno je jemanje kapsul Xenical® pogosto povezano z

gastrointestinalnimi neželenimi učinki kot so napenjanje, mastno blato, povečana pogostnost odvajanja in blatna inkontinenca. Pogosto so ti neželeni učinki posledica bolnikovih zmotnih prepričanj, da lahko na račun orlistatove inhibicije absorpcije maščob zauživajo večjo količino le-teh. Pomembno je, da bolnikom svetujemo, naj v izogib tem neželenim učinkom zmanjšajo količino zaužite maščobe med terapijo z orlistatom. Zdravilo Alli® je povezano z manjšo pojavnostjo neželenih učinkov, a tudi z manjšo učinkovitostjo pri zmanjševanju telesne mase (24).

Zaviralci apetita z učinkom na centralni živčni sistem so indicirani za zmanjšanje telesne mase in ohranjanje znižane telesne mase v povezavi z dieto. Adrenergični agonisti, ki sproščajo tkivne zaloge noradrenalina in posledično stimulirajo alfa- in/ali beta-adrenergične receptorje, kažejo ugodne vplive pri bolnikih z debelostjo. Agonisti receptorja GLP-1 so se izkazali kot učinkoviti pri zmanjševanju telesne mase tako pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2 kot tudi pri tistih brez. Liraglutid je analog glukagonu podobnem peptidu 1, ki je fiziološki regulator apetita in kaloričnega vnosa, in torej zaviralec apetita (24). Od drugih zdravil se razlikuje tudi po načinu uporabe, in sicer se injicira subkutano enkrat dnevno neodvisno od časa zaužitja obrokov (28). Zaviralec dopaminskega privzema bupropion in antagonist opioidnih receptorjev naltrekson sinergistično zavirata apetit ter povečujeta porabo energije z zvečano aktivnostjo nevronov proopiomelanokortina (24).

Marsikatera zdravila za zdravljenje debelosti so bila zaradi varnosti v farmakovigilančnih postmarketinških raziskavah umaknjena s tržišča zaradi slabega razmerja med tveganjem in koristjo za bolnika, med zadnjimi npr. sibutramin (tveganje za večje srčno-žilne dogodke) in rimonabant (možnost pojava depresije, samomorilnosti) (8).

Glede na razmerje med učinkovitostjo in varnostjo je učinkovina orlistat zdravilo prvega izbora pri zdravljenju debelosti. Hkrati izkazuje ugodne učinke tudi na koncentracijo celokupnega holesterola in holesterola lipoproteinov nizke gostote (LDL, ang. *low-density lipoproteins*) ter izboljšuje krvni tlak pri bolnikih s pridruženo hipertenzijo (26).

Pri zdravilih, ki so indicirana za zdravljenje drugih bolezni, se lahko znižanje telesne mase pojavi kot stranski učinek, ki je lahko želen ali pa ne. Običajno je želen pri antidiabetikih, in sicer lahko znižata telesno maso npr. metformin in eksenatid. Tudi nekateri antidepresivi (npr. venlafaksin, fluoksetin) in nekateri antiepileptiki (npr. topriamat) lahko povzročijo zmanjšanje telesne mase (29).

Zaradi naraščajočega problema debelosti je še vedno poudarek na iskanju in raziskovanju novih učinkovin za zdravljenje in uravnavanje debelosti. Zdravila v kliničnih študijah so npr. leptin, peptid YY in agonisti melanokortin-4 receptorja (26). Z namenom, da bi našli nove učinkovine, ki bi bile bolj učinkovite od orlistata ter z manj neželenimi stranskimi učinki, se izvajajo raziskave tudi z novimi spojinami izoliranimi iz rastlinskih materialov. Pri ugotavljanju potencialnega učinka na zdravljenje debelosti le-teh se v veliki meri uporablja aktivnost inhibicije pankreasne lipaze (8).

1.1.1.3 Kirurško zdravljenje debelosti

Kirurški poseg je najbolj učinkovita oblika zdravljenja pri morbidni debelosti s ciljem dolgoročne izgube telesne mase, vendar predstavlja enega zadnjih ukrepov in je rezerviran za bolnike stare med 18 in 60 let z vrednostjo ITM nad 40,00 kg/m², oziroma med 35,00-39,99 kg/m² pri bolnikih s pridruženo boleznijo (npr. diabetes tipa 2 ali druge metabolične bolezni) pri katerih je mogoče po kirurškem zdravljenju pričakovati izboljšanje nadzora in vodenja pridružene bolezni (4).

1.2 Maščobe in regulacija metabolizma maščob

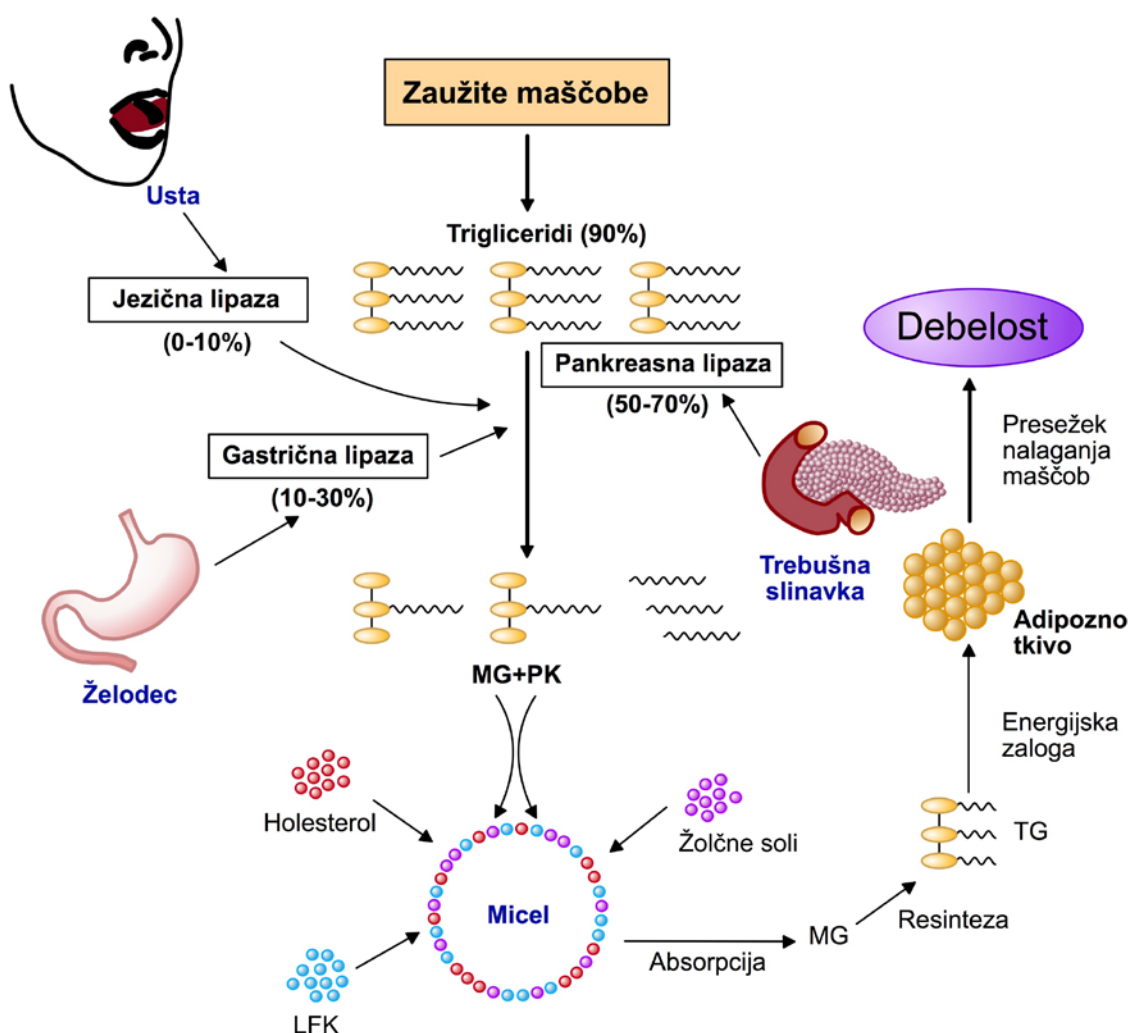
Maščobni depoji predstavljajo daleč največje zaloge energije v telesu. Glede na to, da telesna masa osebe v glavnem variira na račun maščobnih zalog, je očitno, da je energijska homeostaza sinonim za uravnavanje telesne mase. Pretiran vnos energijsko bogate hrane vodi do povečanja telesne mase in debelosti (30).

Za dosego zmanjšane energijskega vnosa lahko vplivamo na zmanjšano prebavo in absorpcijo hranil. Ker imajo maščobe večji prispevek k seštevku neželenih kalorij kot beljakovine ali ogljikovi hidrati, lahko smatramo inhibicijo absorpcije maščob za najpogostejšo tarčo pri doseganju cilja zmanjševanja energijskega vnosa (8).

Maščobe so pomemben energijski vir hrane v zahodnem svetu in predstavljajo 30-40 % dnevne količine zaužitih kalorij (31). Organizem lahko pretvarja v maščobe tudi aminokisliline in monosaharide, tako da je okrog 90 % vseh energijskih zalog v telesu prav v obliki maščob (7). Več kot 90 % zaužitih maščob predstavljajo trigliceridi (TG), preostali del pa fosfolipidi, maščobne kisline, holesterol in vitamini topni v maščobah (31).

Najpomembnejša funkcija prebavnega trakta je, da hrano pretvori na takšen način, da jo telo lahko absorbira in uporablja kot energijski vir. Absorpcija pomeni prenos substratov iz

vodnega medija intestinalnega lumna skozi pregrado mukoznih celic v kri ali limfatični sistem. Ta proces je tesno povezan s prebavo in fizikalno-kemično pretvorbo hranilnih snovi, saj so navadno zaužite kot makromolekularni agregati (škrob, trigliceridi, proteini), uporabni metabolni substrati, ki so nato transportirani iz črevesja do tkiv, pa so monomeri (glukoza, aminokisljine) ali rekonstruirani agregati (hilomikroni) (31). Maščobe so slabo topne v vodi, zato so v gastrointestinalnem traktu za njihovo prebavo v vodnem okolju in nadaljnjo absorpcijo in transport v plazmi potrebni posebni mehanizmi (30).



Slika 2: Prebava maščob. Povzeto po (32).

Prvi korak v presnovi maščob je povečanje površine, kjer lahko delujejo lipaze, z mehanskim emulgiranjem maščob (30) in nato emulzifikacijo v dvanajstniku pod vplivom žolča (33). Lipaze tj. encimi, ki razgrajujejo maščobe, se izločajo iz jezičnih žlez,

želodčnega svoda in trebušne slinavke. Približno 10-30 % vnosa maščob hidrolizira v želodcu, preostalih 70-90 % pa v dvanajstniku in zgornjem delu jejunuma (30).

Jezična lipaza, ki se s slino prenese v želodec, tam prebavi manj kot 10 % količine zaužitih trigliceridov (33). V želodcu je prisotna še gastrična lipaza, ki hidrolizira 10-30 % trigliceridov (34), za 50-70 % hidrolizo pa je odgovorna pankreasna lipaza (32). Optimalna vrednost pH za jezično in gastrično lipazo je nižja od 7, medtem ko je optimalna vrednost pH pri pankreasni lipazi okoli vrednosti 8.

Pankreasna lipaza se aktivira v prisotnosti kolipaze in razgradi trigliceride na 2-monoacilglicerole (MG) in proste maščobne kisline (PK). Fosfolipaza A2 cepi fosfolipide, nespecifična karboksilesteraza pa holesterolne estre, esterske vezi vitaminov A, D in E ter tudi trigliceride. Dolgoverižne proste maščobne kisline in 2-monoacilgliceroli skupaj s fosfolipidi, holesterolom in žolčnimi solmi tvorijo micelle nanometrskih velikosti. Ti miceli omogočajo tesen stik med produkti presnove maščob in steno tankega črevesa in so torej bistvenega pomena za absorpcijo lipidov. Lipidni produkti v takšni obliki vstopajo v epiteljske celice, žolčne soli pa se reciklirajo nazaj v jetra (30). Po vstopu v epiteljske celice maščobne kisline in monogliceride prevzame gladek endoplazmatski retikulum, ki jih porabi za sintezo novih trigliceridov, ki se nato sprostijo v obliki hilomikronov skozi dno epiteljske celice preko limfnega sistema v sistemski krvni obtok (33).

Kratkoverižne maščobne kisline so bolj polarne ter se lahko absorbirajo in transportirajo v jetra preko portalne vene. Tudi jetra sintetizirajo trigliceride s privzemom prostih maščobnih kislin iz plazme ali s sintezo iz glukoze. Da ne bi prišlo do zamaščenosti jeter, se ti trigliceridi odstranjujejo s krvjo vezani na lipoproteine zelo nizke gostote do maščobnih in mišičnih tkiv (30). Tudi hilomikroni po krvnem obtoku potujejo do kapilar, kjer se aktivira lipoprotein lipaza, ki povzroči, da se ponovno sprostijo proste maščobne kisline, ki jih v glavnem absorbirajo miociti in maščobne celice, hilomikronski ostanki pa se absorbirajo nazaj v jetra (30). Znoraj maščobnih celic se sintetizirajo novi trigliceridi, ki predstavljajo zalogo energije (33).

1.3 Pankreasna lipaza in njena inhibicija

Daleč najpomembnejši encim pri prebavi trigliceridov je pankreasna lipaza (33). Je glavni lipolitični encim, ki ga izloča trebušna slinavka, in igra najpomembnejšo vlogo v učinkoviti prebavi trigliceridov, od katerih z α in α' pozicij odcepi maščobne kisline, tako

da kot lipolitični produkti nastanejo β -monogliceridi in dolgoverižne nasičene in nenasičene proste maščobne kisline (32). Pankreasna lipaza je polipeptid iz 449 aminokislin (31), spada v skupino karboksilesteraz in izkazuje interfacialno aktivnost (35), kar pomeni, da se njena aktivnost močno poveča na medpovršini lipid–voda (36). Sestavljena je iz dveh domen z aktivno katalitično triado serin 152, aspartat 176, histidin 263 v N-terminalnem delu. Aktivno mesto je navadno prekrito z zanko in se odkrije, ko se encim veže na medfazno površino. Za popolno aktivnost pankreasne lipaze v fizioloških razmerah je potrebna prisotnost koencima – kolipaze, ki ga izloča trebušna slinavka (32). Žolčne kisline nad koncentracijo kritične micelske koncentracije namreč inhibirajo aktivnost pankreasne lipaze, zato je pomembna prisotnost kolipaze, ki lipazi omogoči pritrditev na medfazo lipid–voda obdano z žolčnimi kislinami (36). Optimalna vrednost pH za njeno delovanje je med 8 in 9 (36). Proizvajajo jo acilarne celice trebušne slinavke, od koder se izloča v dvanajstnik in je odgovorna za hidrolizo 50-70 % vseh zaužitih maščob (8). Po maščobni hidrolizi in odcepitvi maščobnih kislin se le-te vgradijo v micelle z žolčnimi kislinami, se tako absorbirajo skozi membrano tankega črevesa in nato vstopijo v krvni obrok v obliki hilomikronov. Iz tega sledi, da oviranje maščobne hidrolize vodi v zmanjšano uporabnost prehrabnih maščob, in da inhibicija lipaze zmanjšuje absorpcijo maščob (8).

Inhibicija pankreasne lipaze je eden izmed najbolj proučevanih mehanizmov za določevanje potencialne učinkovitosti naravnih proizvodov kot sredstev proti debelosti. Kljub temu, da je orlistat dokazan zaviralec pankreasne lipaze in eno najbolj prodajanih zdravil po vsem svetu, ima določene neprijetne stranske učinke. Uspešnost orlistata je spodbudila nadaljnje raziskave za identifikacijo novih zaviralcev pankreasne lipaze, ki ne bi imeli teh neprijetnih neželenih učinkov (32). Naravni proizvodi na podlagi tradicionalnih zdravilnih rastlin in mikrobnih virov so vedno predstavljali zanimivo priložnost za razvoj novih zdravil. Vsaj polovica vseh sestavin, ki so bile v zadnjih 20 letih uspešne v kliničnih raziskavah, ima naraven izvor. Kljub temu podatku je trenutno v klinični uporabi samo orlistat kot polsintetični derivat naravnega lipstatina. Ti podatki jasno kažejo na to, da potencial narave v boju proti debelosti še ni bil popolnoma raziskan, in da še vedno obstaja možnost odkritja novih spojin vodnic iz naravnih virov. Kljub temu, da so bile raziskave opravljene že na veliko rastlinskih in mikrobnih produktih, so ostale na

akademski ravni ter niso dosegle stopenj kliničnih raziskav. Vidimo lahko, da so nujno potrebne posodobitve študij na znanih zaviralcih kot tudi raziskave novih naravnih virov z namenom, da bi v celoti ugotovili njihov potencial na delovanje pankreasne lipaze ter iz njih razvili nova zdravila za zdravljenje debelosti (32).

1.3.1 Sintezni zaviralci

Kot potencialni zaviralci so bile že preizkušene tudi sintezne spojine. Pogosto uporabljena strategija je sinteza analogov, ki temeljijo na strukturi naravnih substratov pankreasne lipaze tj. trigliceridov, ali njenih naravnih zaviralcih. Kljub temu se sintetični lipazni zaviralci razlikujejo v strukturi in nekateri ne vsebujejo β -laktonskega obroča (37). Preučevani so bili etilheksilklorofosfonati in njihovi analogi (38), α -keto amidi, 2-okso amidi, triestri glicerola in 2-metilglicerola, analogi trioleina ter dihidroksi benzomakrolid (37). Samo ena sintezna zdravilna učinkovina je uspešno dokončala klinične študije, in sicer cetilistat, ki je trenutno registriran za uporabo samo na Japonskem. V kliničnih raziskavah je dokazal primerljivo zmanjševanje telesne mase kot orlistat, vendar tudi podobne stranske učinke (37).

1.3.2 Polsintezni zaviralci

Orlistat ali tetrahidrolipstatin, ki je močan zaviralec gastrične in pankreasne lipaze, je hidrogeniran derivat lipstatina, katerega proizvajajo bakterije *Streptomyces toxytricini*. Z aktivnim serinskim mestom lipaze tvori kovalentno vez in jo tako onesposobi za hidrolizo zaužitih maščob (37). Je zdravilo prve izbire pri zdravljenju bolnikov z debelostjo, ki so kandidati za farmakološko zdravljenje (26).

1.3.3 Naravni zaviralci

Lipstatin, spojina vodnica za orlistat, je bil prvi odkriti zaviralec pankreasne lipaze iz mikrobnih virov. Orlistat je nato postal prva spojina, ki je pridobila FDA odobritev na področju zdravljenja debelosti. To je navdihnilo raziskovalce po celem svetu k raziskovanju mikrobne flore, z namenom odkritja učinkovite spojine za zdravljenje debelosti (37). Lipstatin je bil izoliran iz kulture bakterije *Streptomyces toxytricini*. V svojo strukturo ima vgrajen β -laktonski obroč, s katerim je pogojena njegova sposobnost

inhibicije. Inhibicija je nepovratna, od odmerka odvisna, z vrednostjo srednje zaviralne koncentracije 0,14 μ M.

Iz *Streptomyces toxytricini* so izolirali še panclikine A-E, ki so se izkazali kot malo slabši nepovratni zaviralci kot lipstatin (37). Učinkovita zaviralca pankreasne lipaze sta tudi ebelaktona A in B, naravna produkta izolirana iz seva povezanega z vrsto *Streptomyces aburaviensis*. Spojine izolirane iz mikrobnih virov, ki so pokazale inhibicijo, so še valilakton (*S. albolongus*), esterastin (*S. lavendulae*), vibralakton (*B. vibrans*) (32). Pri rešetanju izvlečkov iz morskih alg je največjo obojetnost pokazala *Caulerpa taxifolia* iz katere so izolirali kaulerpenin, ki kompetitivno inhibira lipazno aktivnost (39).

Druga zelo pomembna in dobro proučevana skupina fitokemičnega rešetanja so saponini (37), ki se delijo na dva glavna razreda: triterpenoidne in steroidne sponine. Nekatere rastline bogate s triterpeni so pogosta hrana zaužita pri t.i. mediteranski dieti, kar lahko predstavlja povezavo s pozitivnimi učinki takšne prehrane na telesno maso (40).

S saponini bogate frakcije *Acanthopanax sessiliflorus* (sesilozid in hisanozid), *Acanthopanax senticosus* (silfiozid F, kopterozid B), *Cyclocarya paliurus* (ciklokariozid A), *Platycodin grandiflorum* (platikodin D), *Panax japonicas* (hikusetsusaponin III), *Panax quinquefolium* (ginsenzozidi Rb1, Rb2, Rc, Rd), *Aesculus turbinata* (escini), *Scabiosa tschiliensis* (skabiosaponin E-G, prosapogenin 1b), *Dioscorea nipponica Makino* (dioscin), *Ilex paraguariensis*, *Gypsophila oldhamiana* (gipsosaponini A, B, C) izkazujejo zaviralno delovanje na pankreasno lipazo (37). Inhibicijo podobno kot polifenoli kažejo tudi saponini iz zelenega, oolong in črnega čaja (*Camellia sinensis*), t.i. čajni saponini (40). Med terpeni so zaviralno aktivnost pokazali krocini in njegov metabolit krocetin iz izvlečka *Gardenia jasminoides* ter karnozinska kislina iz listov žajblja (*Salvia officinalis*), in sicer kot kompetitivni zaviralci (37).

Polifenoli predstavljajo največjo skupino zaviralcev pankreasne lipaze. Na encim se vežejo s polivalentnimi mesti. Zaviralno aktivnost so pokazali mnogi polifenoli vključno s flavoni, flavonoli, tanini in halkoni (40). Eden izmed flavonoidov s takšno aktivnostjo je hesperidin pridobljen iz lupin *Citrus unshiu*. *Camellia sinensis* ali čajevca (zeleni, oolong in črni čaj) je verjetno ena najpogostejše uporabljenih rastlin pri iskanju novih zaviralcev pankreasne lipaze. Vsebuje več kot šestdeset polifenolov, od katerih so nekateri pokazali zaviralni učinek. Največji delež polifenolov v čajevcu predstavljajo katehini, skodelica čaja pa vsebuje zmerno do veliko flavonoidov in/ali taninov. V čaju so polifenoli z

najmočnejšim inhibicijskim učinkom flavan-3-ol digaladni estri. Primer polifenolov z inhibicijskim delovanjem so tudi proantocianidini iz užitnih zelišč kot npr. CT-II iz *Cassia mimosoides* (40).

Ekstrakti bogati s polifenoli, ki so pokazali zaviralno aktivnost na pankreasno lipazo so izvleček semen grozdja (*Vitis vinifera*), indijskega lotusa (*Nelumbo nuctifera*), *Salacia reticulata*, lupin arašidov (*Arachis hypogaea*), jabolk (*Malus domestica*) in listov ter stebelnega lubja manga (*Magnifera indica*) (37).

Proantocianidini, znani tudi kot kondenzirani tanini, so najpogostejša skupina flavonoidov v zahodni prehrani, med drugim jih vsebujejo stročnice. Te spojine aktivno zmanjšajo plazemske trigliceride z zaviranjem absorpcije prehranskih lipidov (40).

V presejalnem testu 132 izvlečkov iz 106 vrst živil in zdravilnih rastlin so se kot najbolj aktivni pri inhibiciji pankreasne lipaze izkazali grah (*Pisum sativum*), vednozeleni gornik (*Arctostaphylos uva-ursi*), navadna smreka (*Picea abies*) in navadna lipa (*Tilia platyphyllos*). Meritve so bile opravljene še po odstranitvi polifenolov iz omenjenih izvlečkov, po čemer so se kot najobetavnejši viri za funkcionalno hrano proti debelosti ali izolacijo aktivnih učinkovin izkazali grah, vednozeleni gornik in navadna lipa (41).

1.4 Določanje inhibicije pankreasne lipaze

Kot pri vseh reakcijah, ki jih katalizirajo encimi, lahko meritve aktivnosti izvedemo z uporabo različnih fizikalno-kemijskih metod, bodisi s spremljanjem izginotja substrata iz reakcijske zmesi, bodisi s spremljanjem sproščanja produkta encimske reakcije. V uporabi so tudi imunološke metode, ki so pogosto uporabljene za kvantitativno določanje prisotnosti lipaz v bioloških medijih, neodvisno od njihove lipolitične aktivnosti, zato z njimi ne moremo ugotavljati inhibicije (42). Metode lahko bolj podrobno razdelimo na (43):

- Volumetrične
- Spektrometrične
 - o Kolorimetrične
 - o UV-VIS spektrofotometrične
 - o IR-spektrofotometrične
 - o Fluorometrične
 - o Turbidimetrične in nefelometrične

- Radiološke
- Imunološke
- Konduktometrične
- Kromatografske
- Metode, ki temeljijo na biosenzorjih
- Druge

Glede na literaturo nobena od naštetih metod v celoti ne izpolnjuje analitskih zahtev in je zato potrebno najprimernejšo metodo izbrati na podlagi namena analize, razpoložljive laboratorijske opreme in kvalificiranega osebja (43), se pa zaradi relativno enostavnega rokovanja in nizke dovzetnosti za motnje zelo pogosto uporabljajo spektrofotometrične metode (44). Tako smo tudi v naši nalogi uporabili metodo, ki je bila uporabljena že v dveh diplomskih nalogah (45,46), in sicer UV-VIS spektrofotometrično metodo.

Spektrofotometrične metode za določanje aktivnosti lipaze uporabljajo sintetične substrate lipaze, ki se po encimsko katalizirani hidrolizi pretvorijo v produkte, ki jih je možno sprektrofotometrično zaznati. Prevladujoči substrati, ki se uporabljajo, so p-nitrofenilni in naftilni estri maščobnih kislin z dolgimi verigami in tioestri. Lipoliza p-nitrofenilnih estrov (palmitatov, lavratov, oleatov) povzroči nastanek rumeno obarvanega p-nitrofenola, ki ga zaznamo pri 405-410 nm. Slabost te metode je povezana z odvisnostjo koeficienta absorpcije p-nitrofenola od vrednosti pH ter odsotnostjo absorpcije pri kislih pH vrednostih (43). Problematična je lahko še nespecifičnost substrata (42). Najpogosteje uporabljen substrat pri spektrofotometrični metodi so kljub temu p-nitrofenilni estri, ki kljub prej omenjenim omejitvam omogočajo zelo občutljivo metodo. Največja prednost sprektrofotometrične metode je v tem, da je direktna in hitra, ne zahteva obdelave vzorca in omogoča kontinuirane teste lipazne aktivnosti. Prednosti najdemo tudi v možni avtomatizaciji meritev na mikrotitrskih ploščicah z 96 vdolbinicami, ki omogočajo hkratno testiranje več vzorcev, ter možni uporabi majhnih volumnov (47).

V predhodni diplomski nalogi (46) so uporabili enostavno UV-VIS spektrofotometrično metodo z meritvijo v eni točki, pri čemer predstavlja veliko pomanjkljivost dejstvo, da pri vsaki posamezni meritvi ne moremo biti prepričani, da se le-ta nahaja v linearnem območju krivulje pozitivne kontrole. Meritve pri omenjeni metodi so bile izvedene z uporabo mikrotitrskih ploščic, zaradi česar obstaja verjetnost, da je inkubacija do izvedene točkovne meritve v začetnih vdolbinicah potekala daljši čas in je – zaradi računanja

inhibicije direktno iz enotočkovnih rezultatov meritv namesto iz naklona krivulj – lahko pripeljala do napačnih sklepanj o rezultatih.

2 NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je optimizirati spektrofotometrično metodo določevanja zaviranja encima pankreasne lipaze, saj predstavlja zaviranje absorpcije maščob tarčo pri zdravljenju debelosti.

Pri optimizaciji metode bomo na začetku uporabili metodo iz literature ter se lotili spreminjanja posameznih parametrov kot so uporaba različnih topil, prilagajanje koncentracij reagentov in izvlečkov, različna zaporedja dodajanja le-teh v reakcijske zmesi, uporaba različnih pipet in različnih nastavitev mikrotitrskega čitalca. Nato bomo s primerjavo rezultatov meritev z mikrotitrskim čitalcem ugotavljali, katere spremembe parametrov so najprimernejše pri testiranju zaviranja pankreasne lipaze z rastlinskimi izvlečki.

Želimo tudi razviti metodo, ki bi omogočala boljši vpogled v dogajanje v reakcijskih zmesih in hitrost poteka reakcij. Za doseg tega namena bomo prav tako spreminjali posamezne parametre metode.

V nadaljevanju bomo z optimirano metodo preverili prisotnost substanc z zaviralnim učinkom v različnih rastlinskih izvlečkih, ki so bili v preteklosti prepoznani kot potencialni zaviralci pankreasne lipaze in predstavljajo izhodišče za nova zdravila za zdravljenje debelosti.

3 MATERIALI IN METODE

Pri optimizaciji spektrofotometrične metode merjenja zaviranja pankreasne lipaze smo kot osnovo za merjenje aktivnosti pankreasne lipaze uporabili metodo iz literature (46) ter kot izhodiščnega zaviralca tega encima učinkovino orlistat (pripravek Alli®). Metodo smo skušali optimizirati z namenom testiranja različnih rastlinskih izvlečkov, pri čemer smo kot model uporabili izvlečke graha in koruze. Koruzni izvleček je služil kot negativna kontrola, saj pankreasne lipaze naj ne bi inhibiral, izvlečki graha pa kot potencialni zaviralci pankreasne lipaze (45,46). Za primerjavo smo uporabljali pozitivne kontrole, ki so pomenile aktivnost encima ob odsotnosti zaviralcev (100 % aktivnost encima), slepe vzorce in slepe vzorce rastlinskih izvlečkov (0 % aktivnost encima).

Spektrifotometrično metodo smo skušali izboljšati z uporabo različnih topil, s prilagajanjem koncentracij reagentov in izvlečkov, različnimi zaporedji dodajanja le-teh v reakcijske zmesi, z uporabo različnih pipet in različnih nastavitev mikrotitrskega čitalca.

Z izboljšanimi metodami smo na enak način izvedli še meritve za dokazovanje zaviralcev v rastlinskih materialih graha, koruze, lipe, vednozelenega gornika in bele jelke.

3.1 Materiali

3.1.1 Rastlinski material

V trgovini oziroma lekarni smo kupili pet vrst zamrznjenega graha različnih proizvajalcev, tri vrste konzerviranega graha različnih proizvajalcev, eno vrsto zamrznjene in eno vrsto konzervirane koruze, lipov čaj in čaj vednozelenega gornika. Za rastlinski material smo uporabili še suhi vodni izvleček lesa bele jelke, ki je bil na zalogi na Katedri za farmacevtsko biologijo. Vrsto in značilnosti posameznih vzorcev prikazuje preglednica II.

Preglednica II: Vrste rastlinskega materiala

Latinsko ime rastline	Oznaka / Opis	Poreklo	Proizvajalec
GRAH (semena)			
Pisum sativum	Hitro zamrznjen grah Natureta	Madžarska	ETA Kamnik d.o.o.
Pisum sativum	Hitro zamrznjen grah Ardo	EU	ARDO SLOVENIA S.R.O.
Pisum sativum	Hitro zamrznjen grah Ledo	Belgija	LEDO d.o.o.
Pisum sativum	Hitro zamrznjen grah Iglo		Nomad Foods Europe Ltd.
Pisum sativum	Hitro zamrznjen grah Mercator	Madžarska	ETA Kamnik d.o.o.
Pisum sativum	Steriliziran grah Bonduelle	EU	Bonduelle SAS
Pisum sativum	Steriliziran grah Natureta		ETA Kamnik d.o.o.
Pisum sativum	Steriliziran grah Valfrutta	Italija	VALFRUTTA CONSERVE ITALIA - Soc. Cop. Agricola
KORUZA (semena)			
Zea mays	Hitro zamrznjena koruza Natureta	Srbija	ETA Kamnik d.o.o.
Zea mays	Sterilizirana koruza Natureta	Slovenija	ETA Kamnik d.o.o.
VEDNOZELENI GORNIK (listi)			
Uvae ursi	Vednozeleni gornik, zdravilni čaj		CELJSKE LEKARNE JAVNI ZAVOD Galenski laboratorij
LIPA (cvetovi)			
Tilia platyphyllos	Lipa, naravni zeliščni čaj 1001 cvet		ŽITO d.o.o.
BELA JELKA (les)			
Abies alba	Suhi vodni izvleček lesa bele jelke		Fakulteta za farmacijo, UL

3.1.2 Kemikalije

- Substrat: p-nitrofenilpalmitat (4-Nitrophenyl palmitate, Sigma-Aldrich)
- Encim: lipaza iz prašičje trebušne slinavke (Lipase from porcine pankreas, Type II, 100-400 units/mg protein, Sigma-Aldrich)
- Zaviralec: orlistat (Alli® 60 mg trde kapsule, Glaxo Group Limited)
- Tris baza (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane, Serva)
- Prečiščena voda (Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani)
- Klorovodikova kislina (37 % HCl, Carlo Erba)
- Metanol (J.T.Baker)
- Dimetil sulfoksid (Dimethyl sulfoxide puriss. P.a., ACS reagent, Sigma Aldrich)
- 96 % etanol (Ethanol Absolute ACS, Carlo Erba)
- 50 % etanol
- 1-butanol (Merck)
- Aceton (Pancreac)
- Etilacetat (Carlo Erba)

- Petroleter (Sigma-Aldrich)
- Dietil eter (Sigma-Aldrich)
- Acetonitril (J.T.Baker)
- Diklorometan (Sigma-Aldrich)
- Žveplova VI kislina (Sigma-Aldrich)
- Amoniak (Ammonia solution 32 %, Merck)
- Ocetna kislina (Merck)

3.1.3 Aparature

- Analitska tehtnica
- Precizna tehtnica
- Centrifuga
- Ultrazvočna kopel
- Hladilnik (4 °C)
- Zamrzovalnik (-20 °C)
- Mikrotitrski čitalec (GENios, Tecan, program Magellan)
- Mikrotitrski čitalec (Synergy H4, BioTek, program Gen5/203)
- Avtomatske pipete
- Mikrotitrške ploščice
- Vodna kopel
- Ploščice za tankoplastno tekočinsko kromatografijo (TLC, ang. *thin layer chromatography*), silikagel 60
- TLC grelna plošča
- UV svetilka

3.2 Metode

3.2.1 Priprava reagentov in izvlečkov

Reagente in izvlečke smo pripravljali po vzoru literature (46), vendar vsak dan sproti in zatorej v manjših količinah.

3.2.1.1 Priprava Tris-HCl pufra

$c = 0,075 \text{ g/L}$, $m \text{ (Tris baza)} = 4,54 \text{ g}$, $V \text{ (Tris-HCl pufer)} = 500 \text{ mL}$, $\text{pH} = 8,5 \text{ (} 25 \text{ °C)}$

Natehtali smo 4,54 g Tris baze ter jo raztopili v 200 mL prečiščene vode. Nato smo v raztopino dodajali 0,1 g/L HCl do pH 8,5. S prečiščeno vodo smo dopolnili do 500 mL.

0,1 g/L HCl smo predhodno pripravili iz 37 % HCl, in sicer smo 8,3 mL 37 % HCl razredčili s prečiščeno vodo na 1 L.

Pufer smo hranili v zaprti stekleni 500 mL bučki na sobni temperaturi.

3.2.1.2 Priprava raztopine substrata

$c = 1,26 \text{ g/L}$ oziroma $c = 0,63 \text{ g/L}$

V plastično epruveto smo natehtali 3,78 mg substrata p-nitrofenilpalmitata (PNP) ter s polnilnima pipetama dodali 1 mL oziroma 2 mL acetonitrila in 2 mL oziroma 4 mL 96 % etanola. Raztopino smo ročno stresali ter nato segreli na 40 °C v vodni kopeli, da se je PNP raztopil.

Raztopino smo pripravili vsak dan sproti.

3.2.1.3 Priprava raztopine encima

$c = 5,0 \text{ g/L}$ oziroma $c = 2,5 \text{ g/L}$ oziroma $c = 1,25 \text{ g/L}$

Natehtali smo 5 mg pankreasne lipaze, ji dodali 1 mL oziroma 2 mL oziroma 4 mL prečiščene vode in vsebino v zaprti plastični epruveti previdno ročno premešali. Nato smo jo centrifugirali 5 minut pri 4000 obratih/minuto ter supernatant uporabili pri pipetiranju v mikrotitrski ploščice. V času od centrifugiranja do pipetiranja smo raztopino hranili v ledeni kopeli.

Raztopino smo pripravljali vsak dan sproti.

3.2.1.4 Priprava raztopine zaviralca

V 1,5 mL mikrocentrifugirko smo prenesli zrnca iz dveh kapsul pripravka Alli® (skupaj 120 mg orlistata) ter dodali 1 mL 50 % metanola. Dobro smo pretresli, da so se zrnca raztopila, ter nato centrifugirali 5 minut pri 7000 obratih/minuto.

Mikrocentrifugirko smo shranili v zamrzovalniku ter jo pred vsakim poskusom ponovno centrifugirali in nato za pipetiranje uporabili supernatant.

3.2.1.5 Priprava rastlinskih izvlečkov

Izvlečki v topilu; 1 del rastline : 4 deli topila (m/v):

Natehtali smo 6 g rastlinskih delov, jih strli v terilnici ter kvantitativno prenesli s 25 mL topila v centrifugirko. Uporabili smo različna topila, kot je navedeno v poglavjih 3.2.3 in 3.2.4. Zmes smo premešali z desetkratnim obračanjem centrifugirke, nato pa jo postavili v ultrazvočno (UZ) kopel za pet minut. Centrifugirke z zmesjo smo pustili v omarici pri sobni temperaturi čez noč, naslednji dan pa smo jih spet premešali ter postavili v UZ kopel za pet minut.

Na tak način smo pripravili raztopine potencialnih zaviralcev pankreasne lipaze iz graha, lipe, vednozelenega gornika, in bele jelke ter raztopine negativne kontrole izvlečkov koruze v različnih topilih.

Za vsako od teh smo s pipeto prenesli 2 mL bistre raztopine v mikrocentrifugirko ter jo centrifugirali pet minut pri 4000 obratih/minuto, da smo dobili supernatant za uporabo pri nadaljnjem pipetiranju v mikrotitrski ploščice.

Izvlečke smo pripravljali vsak dan sproti.

3.2.2 Uporaba reagentov, izvlečkov in aparatur

3.2.2.1 Spektrofotometrična metoda

Pripravljene raztopine in reagente smo po vzoru literature (46) z avtomatskimi pipetami odpipetirali v vdolbinice mikrotitrski ploščice, nato pa mikrotitrsko ploščico vstavili v napravo za merjenje absorbance ter začeli z izvajanjem meritev.

Preglednica III: Prikaz sestave reakcijskih zmesi. Vsak stolpec predstavlja posamezno reakcijsko zmes v svoji vdolbinici mikrotitrski ploščice.

Slepi vzorec	Pozitivna kontrola	Vzorec z zaviralcem	Slepi vzorec rastlinskega izvlečka	Vzorec rastlinskega izvlečka
Pufer	Pufer	Pufer	Pufer	Pufer
Raztopina substrata	Raztopina substrata	Raztopina substrata	Raztopina substrata	Raztopina substrata
Topilo	Topilo	Raztopina zaviralca	Rastlinski izvleček	Rastlinski izvleček
Voda	Raztopina encima	Raztopina encima	Voda	Raztopina encima

Zmes za merjenje zaviralne aktivnosti vzorca rastlinskega izvlečka je bila sestavljena iz pufru, raztopine substrata, raztopine encima ter izvlečka rastline. Volumen in zaporedje dodajanja smo spreminjali, kot je navedeno v poglavjih 3.2.3 in 3.2.4. Včasih smo testirali en izvleček rastline, predvsem pri dokazovanju zaviralcev pa več – v tem primeru je to

pomenilo več reakcijskih zmesi za merjenje zaviralne aktivnosti in torej več uporabljenih vdolbinic mikrotitrne ploščice. Te vzorce smo primerjali s pozitivno kontrolo, kjer smo namesto izvlečka rastline dodali v vdolbinico mikrotitrne ploščice enako količino samega topila. Vzorec z zaviralcem (orlistata) smo pripravili tako, da smo v eno vdolbinico mikrotitrne ploščice namesto izvlečka rastline dodali raztopino zaviralca. Kadar smo izvajali meritve za slepi vzorec, smo namesto raztopine encima dodali enako količino vode ter namesto izvlečka rastline oziroma raztopine zaviralca enako količino samega topila.

Kadar smo izvajali meritve za slepe vzorce izvlečkov rastlin, pa smo samo namesto encima dodali enako količino vode.

Absorbanca slepega vzorca je pomenila ozadje za pozitivno kontrolo ter vzorec z zaviralcem, absorbanca slepih vzorcev izvlečkov rastlin pa ozadje pri meritvah rastlinskih vzorcev. Pozitivna kontrola je pomenila aktivnost encima ob odsotnosti zaviralcev, torej 100 % aktivnost encima, in je predstavljala referenčno vrednost pri računanju odstotkov inhibicije.

Optimizacijo metode smo začeli na mikrotitrskem čitalcu GENios, ki je bil uporabljen tudi v literaturi (46). Nato smo metodo preizkusili še na drugi napravi za merjenje absorbance Synergy H4 ter na podlagi rezultatov nadaljevali z optimizacijo na tej napravi. Dokazovanje zaviralcev smo izvajali na obeh napravah. Na obeh napravah je bila temperatura nastavljena na 37 °C, valovna dolžina pa na 405 nm.

GENios

Zaviralno aktivnost smo ugotavljali z merjenjem absorbance vzorcev v mikrotitrski ploščici z napravo GENios in programom Magellan. Nastavitve naprave smo najprej nastavili na šest meritev absorbance s pet-minutnimi presledki med meritvami, v nadaljevanju pa so se izvajale vsako minuto 25 minut s predhodnim tresenjem ploščice.

Synergy H4

Zaviralno aktivnost smo ugotavljali z merjenjem absorbance vzorcev v mikrotitrski ploščici z napravo Synergy H4 in programom Gen5/203. Meritve so se izvajale vsako minuto 25 minut s predhodnim tresenjem ploščice.

Pri obeh napravah smo dobljene vrednosti absorbanc nato uporabili v računalniškem programu Excel za risanje grafov in računanje naklonov ter odstotkov inhibicij. Za izračun naklonov smo uporabljali rezultate, kjer je bila krivuja pozitivne kontrole v linarnem območju.

$$N = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum(x - \bar{x})^2}$$

Enačba 1: Enačba za izračun naklonov krivulj

$N_{t_1 - t_2}$ – naklon regresijske krivulje, z t_1-t_2 smo označili območje krivulje za katerega smo računali naklon

x – čas meritve vzorca (v minutah)

y – izmerjena absorbanca vzorca

\bar{x} – povprečna vrednost x -ov uporabljenih v enačbi

\bar{y} – povprečna vrednost y -ov uporabljenih v enačbi

Dobljene vrednosti naklonov, ki ponazarjajo hitrosti reakcij, smo nato primerjali in uporabili še za izračun odstotkov inhibicije.

$$\%INH = \frac{N_{PK} - N_V}{N_{PK}} * 100\%$$

Enačba 2: Enačba za izračun odstotka inhibicije

$\%INH_{t_1 - t_2}$ – odstotek inhibicije vzorca, z t_1-t_2 smo označili naklone katerega območja krivulje smo uporabili pri računanju odstotka inhibicije

N_{PK} – naklon regresijske krivulje pozitivne kontrole

N_V – naklon regresijske krivulje vzorca

3.2.2.2 *Uporaba izvlečkov za preverjanje čistosti s TLC*

Pri poskusih 5 in 6, kjer nas je zanimalo, ali z uporabo različnih topil lahko pridemo do čistejšega vzorca z zaviralno aktivnostjo, smo vzorce analizirali s TLC. Topila vzorcev smo odparili z rotacijskim vakuumskim uparjevalnikom, nato pa suhim zaostankom dodali po 1 mL 50 % metanola (MeOH), da smo dobili raztopine, ki smo jih po 10 μ L s kapilarami prenesli na TLC ploščice. Za razvijanje TLC ploščic v nasičeni kadi smo najprej uporabili mobilno fazo (MF) 1, ki naj bi bila glede na literaturo najprimernejša (46). Če so imele kromatografske lise repe, smo analizo ponovili z novima TLC ploščicama in razvijanjem z mobilnima fazama 2 in 3. Kot neselektivni orositveni reagent

smo uporabili žveplovo VI kislino v etanolu (EtOH) in TLC ploščice segrevali na TLC grelni plošči pri 100 °C približno 5 minut. Rezultate smo opazovali tudi pod UV lučjo s 366 nm.

Sestava mobilnih faz:

MF 1: diklorometan : metanol = 5 : 2

MF 2: diklorometan : metanol : amoniak = 6,5 : 2,6 : 1

MF 3: diklorometan : metanol : očetna kislina = 6,5 : 2,6 : 1

3.2.3 Optimizacija metode

3.2.3.1 Poskus 1

Pri prvem poskusu smo za orientacijo uporabili vzorec rastlinskega izvlečka, ki se je izkazal kot najprimernejša surovina v predhodnem diplomskem delu (46), tj. zamrznjen grah Natureta. Za negativno kontrolo smo uporabili vzorec rastlinskega izvlečka zamrznjene koruze Natureta. Izvlečka sta bila pripravljena s 50 % MeOH.

Zaporedje dodajanja raztopin in topil ter sestavo končnih reakcijskih zmesi v vdolbinicah mikrotitrskih ploščic prikazuje spodnja preglednica. Stolpec pomeni posamezno vdolbinico mikrotitrskih ploščic (tj. posamezno reakcijsko zmes).

Preglednica IV: Postopek dodajanja raztopin in topil v vdolbinice mikrotitrskih ploščic - vrstni red 1

Korak	Volumen [μL]	Slepi vzorec	Pozitivna kontrola	Vzorec z zaviralcem	Slepi vzorec rastlinskega izvlečka	Vzorec rastlinskega izvlečka
1	162	Pufer	Pufer	Pufer	Pufer	Pufer
2	12	Voda	/	/	Voda	/
3	16	50 % MeOH	50 % MeOH	/	/	/
4	10	Razt. PNP	Razt. PNP	Razt. PNP	Razt. PNP	Razt. PNP
5	16	/	/	Razt. zav.	Rastl. izvl.	Rastl. izvl.
6	12	/	Razt. encima	Razt. encima	/	Razt. encima

Razt. PNP: raztopina substrata; Razt. encima: raztopina encima; Razt. zav.: raztopina zaviralca; Rastl. izvl.: rastlinski izvleček

Pri tem poskusu smo uporabili raztopino encima v koncentraciji 5,0 g/L. Po pipetiranju smo mikrotitrsko ploščico vstavili v napravo, kjer se je izvedlo šest meritev absorbance s pet-minutnimi presledki med meritvami.

3.2.3.2 Poskus 2

V poskusu 2 smo izvedli primerjavo dveh različnih vrstnih redov dodajanja raztopin, da bi ugotovili bolj smiselno zaporedje. Najprej smo zamenjali koraka 4 in 5 iz poskusa 1. Tako smo v zadnjih dveh korakih dodajali raztopino substrata in raztopino encima, kot prikazuje preglednica V.

Preglednica V: Vrstni red dodajanja raztopin in topil v vdolbinice mikrotitrne ploščice - vrstni red 2

Korak	Volumen [μL]	Slepi vzorec	Pozitivna kontrola	Vzorec z zaviralcem	Slepi vzorec rastlinskega izvlečka	Vzorec rastlinskega izvlečka
1	162	Pufer	Pufer	Pufer	Pufer	Pufer
2	12	Voda	/	/	Voda	/
3	16	50 % MeOH	50 % MeOH	/	/	/
4	16	/	/	Razt. zav.	Rastl. izvl.	Rastl. izvl.
5	10	Razt. PNP	Razt. PNP	Razt. PNP	Razt. PNP	Razt. PNP
6	12	/	Razt. encima	Razt. encima	/	Razt. encima

V drugem delu pa sta bila zadnja koraka obratna, in sicer smo najprej dodali raztopino encima ter po desetih minutah še raztopino substrata kot prikazuje preglednica VI.

Preglednica VI: Vrstni red dodajanja raztopin in topil v vdolbinice mikrotitrne ploščice - vrstni red 3

Korak	Volumen [μL]	Slepi vzorec	Pozitivna kontrola	Vzorec z zaviralcem	Slepi vzorec rastlinskega izvlečka	Vzorec rastlinskega izvlečka
1	162	Pufer	Pufer	Pufer	Pufer	Pufer
2	12	Voda	/	/	Voda	/
3	16	50 % MeOH	50 % MeOH	/	/	/
4	16	/	/	Razt. zav.	Rastl. izvl.	Rastl. izvl.
5	12	/	Razt. encima	Razt. encima	/	Razt. encima
Inkubacija 10 minut						
6	10	Razt. PNP	Razt. PNP	Razt. PNP	Razt. PNP	Razt. PNP

Uporabili smo enaka rastlinska materiala kot v poskusu 1, spremenili pa smo koncentracijo raztopine encima ($c = 2,5 \text{ g/L}$).

3.2.3.3 *Poskus 3*

Še za polovico smo znižali koncentracijo raztopine encima ($c = 1,25 \text{ g/L}$), da bi se izognili platoju pri krivuljah. Takšno koncentracijo encima smo nato uporabljali tudi pri vseh nadaljnjih poskusih.

S tem poskusom dalje smo uvedli optimizacijo dodajanja zadnjega koraka z 8-kanalno avtomatsko pipeto. To je skrajšalo čas med izvedbo zadnjega koraka dodajanja raztopin oziroma topil v vdolbinice ter prvo meritvijo absorbance ter tako povečalo primerljivost med rezultati vzorcev.

Spremenili smo tudi nastavitve v programu Magellan tako, da so se meritve absorbance opravljale pogosteje. Meritve so se opravljale vsako minuto petindvajset zaporednih minut. Pred vsako meritvijo se je mikrotitrna ploščica 5 sekund stresala in nato 2 sekundi mirovala.

Pod takšnimi pogoji smo ponovili obe variaciji zaporednih korakov dodajanja raztopin oziroma topil v vdolbinice (Preglednica V in Preglednica VI) – še vedno za zamrznjen grah Natureta in za zamrznjeno koruzo Natureta v 50 % MeOH.

3.2.3.4 *Poskus 4*

Ohranili smo pogoje poskusa 3 z vrstnim redom 2, s tem da smo poskus izvedli z rastlinskim materialom zamrznjenega graha Natureta pripravljenega v več različicah z naslednjimi topili:

- voda
- 50 % MeOH
- 50 % EtOH
- 96 % EtOH
- aceton
- 1-butanol

Za vsako topilo smo pripravili vzorec z njegovo pozitivno kontrolo.

3.2.3.5 *Poskus 5*

Pri tem poskusu smo uporabili šest različnih izvlečkov zamrznjenega graha Natureta, od tega smo štiri čistili pred raztapljanjem v končnem topilu.

Rastlinske izvlečke uporabljene pri tem poskusu smo torej pripravili na različne načine, pri vseh pa smo pripravo kot navadno začeli s tehtanjem rastlinskega materiala in njegovim trenjem v terilnici.

Dve paraleli smo nadaljnje pripravili po vzoru običajnega postopka 3.2.1.5 – pri eni smo grah kvantitativno prenesli v centrifugirko s 25 mL 50 % EtOH, pri drugi pa s 25 ml 96 % EtOH.

Drugi dve paraleli smo iz terilnic prenesli v bučki za rotavapiranje ter vsako premešali s 25 mL etilacetata, zadnji dve paraleli pa smo kvantitativno prenesli v bučke z 1-butanolom.

Centrifugirki in štiri bučke smo za 5 minut postavili v UZ kopel, nato pa jih shranili pri sobni temperaturi na temnem čez noč.

Naslednji dan smo po ponovnem raztapljanju v UZ kopel iz štirih bučk s pipetami odstranili toliko etilacetata oziroma 1-butanola, da še nismo zajeli usedlin. Preostanke etilacetata oziroma 1-butanola smo odparili z rotavaporjem. En suh zaostanek očiščen z etilacetatom smo s 25 mL 50 % EtOH kvantitativno prenesli v centrifugirko, drugega pa z 96 % EtOH. Enako smo naredili še z zaostankoma prečiščenima z 1-butanolom.

Tako smo skupaj s prvima paralelkama dobili šest centrifugirk, s katerimi smo ponovili postopek raztapljanja in maceracije čez noč.

Naslednji dan smo sledili metodi običajnega postopka, tako da smo zmesi še enkrat premešali in postavili v UZ kopel, nato pa mikrocentrifugirke s po 2 mL izvlečkov centrifugirali pet minut pri 4000 obratih/minuto, da smo dobili supernatante za pipetiranje v mikrotitrne ploščice. Dobljene supernatante vseh šestih paralel smo uporabili za merjenje absorbance.

Absorbance smo pomerili še za vzorec z zaviralcem v 50 % MeOH in njegovo slepo kontrolo ter pozitivni kontroli v 50 % EtOH in 96 % EtOH. Vrstni red pipetiranja je ostal enak kot v Preglednici V.

Pri tem poskusu smo preverjali še uspešnost čiščenja s postopkom opisanim v podpoglavju 3.2.2.2.

3.2.3.6 *Poskus 6*

Rastlinski izvleček graha smo pripravili po običajnem postopku (3.2.1.5) iz zamrznjenega graha Natureta s topilom 50 % EtOH s to razliko, da smo centrifugiranje izvedli kar s centrifugirko s celotno zmesjo. Nato smo celoten supernatant iz centrifugirke s pipeto

prenesli v bučko za rotavapiranje in raztopino rotavapirali tako dolgo, da je v bučki ostala slaba polovica začetnega volumna raztopine. To raztopino smo prenesli v lij ločnik, kjer je predstavljala vodno fazo, in jo ekstrahirali v naslednjem vrstnem redu z:

- 2-krat 30 mL petroletra
- 2-krat 30 mL dietil etra
- 2-krat 30 mL etilacetata
- 2-krat 30 mL 1-butanola

Faze smo združevali v posamezne čaše ter jih po končani celotni ekstrakciji uporabili za vzorce rastlinskih izvlečkov pri testiranju absorbance. Kot običajno smo testirali tudi vzorec zaviralca v 50 % MeOH ter njegov slepi vzorec. Pozitivno kontrolo smo izvedli s 50 % EtOH. Zaporedje pipetiranja je bilo ponovno enako kot v preglednici V.

Pri tem poskusu smo preverjali še uspešnost čiščenja s postopkom opisanim v podpoglavju 3.2.2.2.

3.2.3.7 *Poskus 7*

Poskus 7 in vse nadaljne poskuse (razen poskusa 14 pri podpoglavju Dokazovanje zaviralcev) smo izvedli na napravi Synergy H4. Parametri so enaki kot pri poskusu 3 z vrstnim redom 2, a na drugi napravi ter z rastlinskim materialom druge letine.

3.2.3.8 *Poskus 8*

Zaradi pomislekov o različno dolgem času raztapljanja lipaze v vodi in vplivu le-tega na hitrost encimskih reakcij smo naredili poskus ugotavljanja vpliva časa raztapljanja lipaze ter vpliva topila 50 % MeOH, ki je navadno prisoten v reakcijski zmesi. Pri tem smo raztopine encima pripravili tako, da smo prilagodili metodo 3.2.1.3 kot opisano spodaj. S tem smo dobili raztopine encima s tremi točno določenimi časi raztapljanja kar iz ene epruvete.

Natehti 5 mg lipaze smo v epruveto dodali 4 mL vode ter zmes ročno stresali 1 minuto in nato 5 minut centrifugirali pri 4000 obratih/minuto. Iz epruvete smo po nadaljni minuti odpipetirali 12 μ L bistre raztopine encima v prvo in nato 12 μ L še v drugo vdolbinico mikrotitrne ploščice v kateri smo predhodno že odpipetirali pufer.

Nato smo epruveto spet 1 minuto ročno stresali ter jo pred centrifugiranjem pustili še 3 minute mirovati, da se je encim raztapljal. Po 5 minutah na 4000 obratih/minuto ter

nadaljni 1 minuti mirovanja smo v predhodno napolnjeni vdolbinici s po 162 μL pufru odpipetirali po 12 μL raztopine lipaze, ki se je torej raztapljala v vodi 17 minut.

Ponovili smo postopek z 1 minutnim ročnim mešanjem, 3 minutnim mirovanjem, 5 minutnim centrifugiranjem na 5000 obratih/minuto, 1 minutnim mirovanjem ter odpipetirali v poslednji s pufrom napolnjeni vdolbinici po 12 μL raztopine lipaze, ki se je raztapljala približno 27 minut. V vsako prvo od teh vdolbinic smo dodali po 12 μL vode ter v vsako drugo po 12 μL 50 % MeOH. Zadnji korak dodajanja raztopine substrata smo izvedli z 8-kanalno avtomatsko pipeto.

Postopek izvajanja korakov prikazuje preglednica VII.

Preglednica VII: Vrstni red dodajanja raztopin in topil v vdolbinice mikrotitrne ploščice - vrstni red 4

Korak	Volumen [μL]	Lipaza	Lipaza in 50 % MeOH
1	162	Pufer	Pufer
2	12	Razt. encima	Razt. encima
3	16	Voda	50 % MeOH
4	10	Razt. PNP	Razt. PNP

3.2.3.9 Poskus 9

Vzporedno smo naredili naslednji meritvi: meritev po vzoru ustaljene metode s prirejenim vrstnim redom dodajanja raztopin in topil (Preglednica VIII) ter meritev pri dodatku dimetil sulfoksida (DMSO) (Preglednica IX).

Pri prvem delu (Preglednica VIII) smo v primerjavi z vrstnim redom 2 (Preglednica V) zamenjali korak 5 in korak 2. Na tak način smo dobili primernejše zaporedje za primerjavo z drugim delom, kjer je bila raztopina substrata odpipetirana v prvem koraku. Tudi dodatek vode tik pred korakom dodatka raztopine encima je bolj smiseln, saj vodo dodajamo namesto raztopine encima.

Preglednica VIII: Vrstni red dodajanja raztopin in topil v vdolbinice mikrotitrne ploščice - vrstni red 5

Korak	Volumen [μL]	Slepi vzorec	Pozitivna kontrola	Vzorec z zaviralcem	Slepi vzorec rastlinskega izvlečka	Vzorec rastlinskega izvlečka
1	162	Pufer	Pufer	Pufer	Pufer	Pufer
2	10	Razt. PNP	Razt. PNP	Razt. PNP	Razt. PNP	Razt. PNP
3	16	50 % MeOH	50 % MeOH	/	/	/

4	16	/	/	Razt. zav.	Rastl. izvł.	Rastl. izvł.
5	12	Voda	/	/	Voda	/
6	12	/	Razt. encima	Razt. encima	/	Razt. encima

Pri drugem delu poskusa (Preglednica IX) smo v vdolbinice mikrotitrskę ploščice najprej dodali 172 μ L mešanice pufer : DMSO : razt. PNP v razmerju 132 : 30 : 10.

Rastline, uporabljene pri tem poskusu, so bile: zamrznjen grah Natureta, zamrznjen grah Ledo in zamrznjena korusa Natureta.

Lipazo smo skladno z ugotovitvami poskusa 8 v vodi raztapljali 17 minut pred centrifugiranjem.

Preglednica IX: Vrstni red dodajanja raztopin in topil v vdolbinice mikrotitrskę ploščice - vrstni red 6

Korak	Volumen [μ L]	Slepi vzorec	Pozitivna kontrola	Vzorec z zaviralcem	Slepi vzorec rastlinskega izvlečka	Vzorec rastlinskega izvlečka
1	172	Pufer + DMSO + Razt. PNP	Pufer + DMSO + Razt. PNP	Pufer + DMSO + Razt. PNP	Pufer + DMSO + Razt. PNP	Pufer + DMSO + Razt. PNP
2	16	50 % MeOH	50 % MeOH	/	/	/
3	16	/	/	Razt. zav.	Rastl. izvł.	Rastl. izvł.
4	12	Voda	/	/	Voda	/
5	12	/	Razt. encima	Razt. encima	/	Razt. encima

3.2.3.10 Poskus 10

Da bi ugotovili, zakaj pri grahu prihaja do povečanega naklona krivulje v kasnejših časovnih obdobjih meritev, smo naredili poskus za dve kontroli:

- kontrola 1: v po en vzorec rastlinskega izvlečka nismo dodali raztopine substrata, ampak slepo raztopino substrata
- kontrola 2: do 25. meritve enaka sestava kot pri pozitivni kontroli, nato pa smo v vdolbinico dodali 16 μ L rastlinskega izvlečka ter ponovno izvedli 25 meritev.

Slepo raztopino substrata smo pripravili samo s topiloma: zmešali smo 1 mL acetonitrila in 2 mL 96 % etanola.

Kjer po 25. minutah nismo dodali rastlinskega izvlečka, smo dodali 50 % MeOH.

Uporabili smo izvlečka zamrznjenega graha Natureta in Ledo v 50 % MeOH pripravljena po metodi 3.2.1.5.

Preglednica X: Vrstni red dodajanja raztopin in topil v vdolbinice mikrotitrskę ploščice - vrstni red 7

Korak	Volumen [μL]	Slepi vzorec	Pozitivna kontrola	Vzorec z zaviralcem	Kontrola 1	Kontrola 2	
1	162	Pufer + DMSO	Pufer + DMSO	Pufer + DMSO	Pufer + DMSO	Pufer + DMSO	
2	10	Razt. PNP	Razt. PNP	Razt. PNP	Acetonitril + 96 % EtOH	Razt. PNP	
3	16	50 % MeOH	50 % MeOH	Razt. zav.	Rastl. izvl.	50 % MeOH	
4	12	Voda	Razt. encima	Razt. encima	Razt. encima	Razt. encima	
5		Meritve 25 minut					
6	16	50 % MeOH	50 % MeOH	50 % MeOH	50 % MeOH	Rastl. izvl.	

3.2.3.11 Poskus 11

Da bi preprečili obarjanje PNP, smo prva dva koraka prejšnjega poskusa (Poskus 10) združili, in tako dobili vrstni red dodajanja 8.

3.2.3.12 Poskus 12

Da bi preverili uspešnost mešanja raztopin v vdolbinicah mikrotitrne ploščice, smo naredili poskus, kjer smo pri zadnjem koraku dodajanja vode oziroma raztopine encima s pipeto premešali vsebino vdolbinic.

Hkrati smo testirali vpliv koncentracije raztopine substrata na raztapljanje in mešanje snovi, zato je uporabili paraleli:

- običajna raztopina substrata (1,27 g/L)
- razredčena raztopina substrata (0,63 g/L)

Pri poskusu smo uporabili rastlinske vzorce zamrznjenega graha Natureta, Ledo in Ardo, zamrznjene koruze Natureta ter tudi njihove slepe vzorce.

Pri dodajanju raztopin v vdolbinice mikrotitrne ploščice smo sledili postopku po vzoru preglednice V.

3.2.4 Dokazovanje zaviralcev

3.2.4.1 Poskus 13

Optimizirano metodo iz poskusa 12 z mešanjem smo uporabili za dokazovanje zaviralcev v več rastlinskih vzorcih, in sicer smo rastlinske izvlečke pripravili iz:

- Zamrznjenega graha Natureta
- Zamrznjenega graha Ledo
- Zamrznjenega graha Ardo
- Zamrznjenega graha Iglo

ter za negativno kontrolo rastlinski izvleček iz:

- Zamrznjene koruze Natureta

Pri vseh izvlečkih smo kot topilo uporabili 50 % MeOH.

Uporabili smo raztopino substrata s koncentracijo 1,27 g/L.

3.2.4.2 Poskus 14

Uporabili smo metodo opisano v poskusu 7 za rastlinske izvlečke:

- Zamrznjenega graha Natureta
- Zamrznjenim grahom Ledo
- Zamrznjenim grahom Ardo
- Zamrznjenim grahom Mercator
- Steriliziranim grahom Natureta
- Steriliziranim grahom Bonduelle
- Steriliziranim grahom Valfrutta

ter za negativno kontrolo z:

- Zamrznjeno koruzo Natureta
- Sterilizirano koruzo Natureta

Vse izvlečke smo pripravili s topilom 50 % MeOH.

3.2.4.3 Poskus 15

Uporabili smo optimizirano metodo iz poskusa 12 z mešanjem za rastlinski izvleček lipe v 50 % MeOH. Izvleček smo pripravili po metodi 3.2.1.5 z dodatkom filtriranja pred centrifugiranjem. Raztopina substrata je imela koncentracijo 1,27 g/L.

3.2.4.4 Poskus 16

Uporabili smo metodo opisano v poskusu 9 z vrstnim redom 6 z izvlečkom vednozelenega gornika v 50 % MeOH, izvlečkom bele jelke v 50 % MeOH in izvlečkom bele jelke v prečiščeni vodi. Pri tem poskusu smo izvlečke pred centrifugiranjem še prefiltrirali.

3.2.4.5 Poskus 17

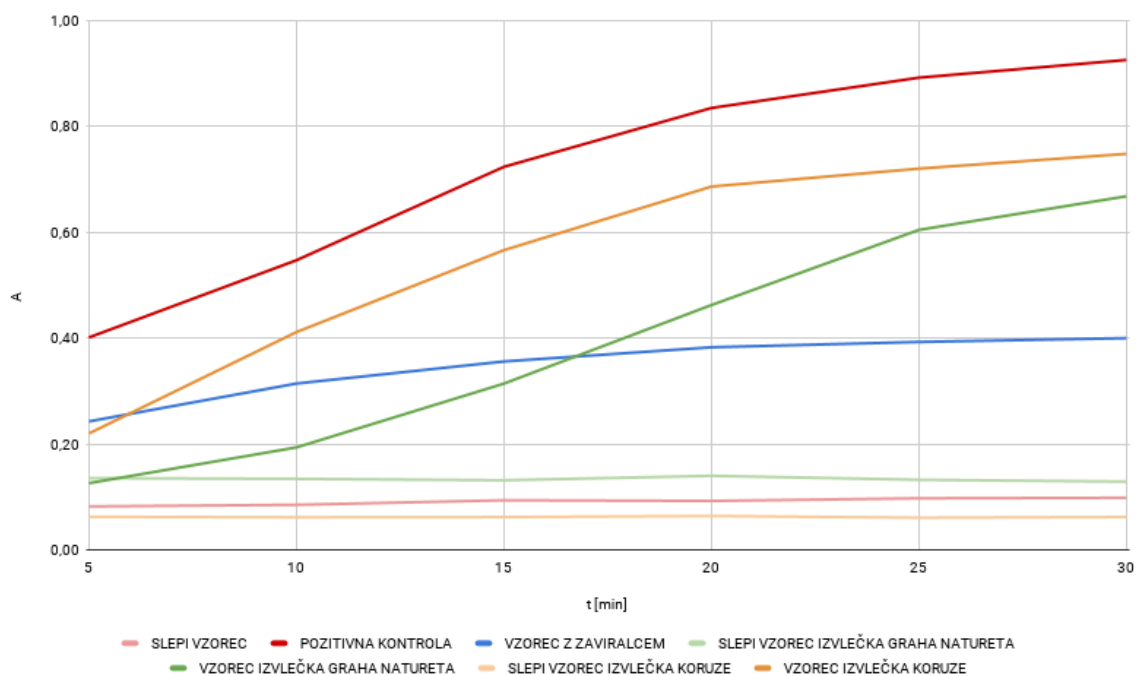
Uporabili smo metodo opisano v poskusu 9 z vrstnim redom 6 z izvlečkom bele jelke v 50 % MeOH v nižji koncentraciji. Izvleček smo torej pripravili po metodi 3.2.1.5, le da smo natehtali 0,6 g rastlinskega materiala ter izvleček pred centrifugiranjem filtrirali.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 Optimizacija metode

4.1.1 Poskus 1

V izhodiščnem poskusu smo preverili kakšne rezultate dobimo z uporabo metode po vzoru postopka iz literature (46), če absorbanco vzorcev merimo kontinuirano v časovnem obdobju tridesetih minut. Kontinuirano merjenje predstavlja že prvo optimizacijo, saj je v primeru, ko je to možno, zaželeno dokumentiranje časovnega poteka. S tem se izognemo večji negotovosti, ki jo prinaša meritev v samo eni časovni enoti, poleg tega pa kontinuirano merjenje omogoča odkrivanje vpliva napak, umetnih motenj ter kontrolo poteka reakcije (44). Pri poskusih s samo eno meritvijo absorbance vzorca je meritev slepega vzorca obvezna, medtem ko le-ta pri poskusu s kontinuiranimi meritvami absorbance vzorca ni nujno potrebna, saj za določanje hitrosti encimskih reakcij uporabljamo naklone krivulj. Kljub temu je meritev slepega vzorca potrebna za potrditev nastavitve naprave in območja meritve sistema (44). Slepe vzorce rastlinskih izvlečkov pa smo pomerili tudi zato, da bi ugotovili, ali v njih nastajajo morebitne spojine z absorbanco v območju okoli 405 nm, ki bi lahko vplivale na lažne rezultate vzorcev rastlinskih izvlečkov.



Slika 3: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 1

Slika 3 grafično ponazarja izmerjene absorbance v odvisnosti od časa z že odštetimi absorbancami ozadja praznih vdolbinic (povprečna absorbanca ozadja praznih vdolbinic 0,0533, SD 0,0017; celotna variabilnost metode, ki vključuje tudi pripravo vzorca, pa je bila bistveno večja in je lahko znašala tudi nekaj 10 %). Slepri vzorci so imeli nizke vrednosti skozi celoten čas meritev, torej smo potrdili, da slepi vzorec ostane nespremenjen v času meritev, ter da v slepih vzorcih zamrznjenega graha Natureta in zamrznjene koruze Natureta ne nastaja nobena spojina s takšno absorbanco, ki bi vplivala na rezultate. Krivulja vzorca z zaviralcem ima višjo začetno absorbanco kot slepi vzorci ter rahel naklon, s časom pa se le-ta zmanjša, po čemer sklepamo, da orlistat v vzorcu po približno dvajsetih minutah zavira skoraj vso količino encima. Krivulji graha in koruze imata sicer začetni absorbanci nižjih vrednosti kot vzorec z zaviralcem, čeprav sta njuni krivulji bolj strmi, vendar je to najbrž posledica časovnih zamikov pri izvajanju zadnjega koraka pipetiranja raztopine, ki sproži reakcijo. To pomanjkljivost smo optimizirali s poskusom 3 dalje, in sicer tako, da smo zadnji korak dodajanja raztopine izvedli z 8-kanalno pipeto.

Kot je razvidno na sliki 3, grah izkazuje nižje vrednosti absorbance kot koruza, le-ta pa nižje kot pozitivna kontrola. Pri vseh treh krivuljah pa opazimo upad naklona po 20. oziroma 25. minuti. Krivulja encimske reakcije ima namreč najprej linearno območje, ob kasnejši zmanjšani količini substrata v vzorcu pa se njen naklon zmanjša (44). Časovno odvisno spremljanje encimske reakcije je pomembno za vrednotenje encimske aktivnosti, vendar je pomembno tudi, da se pri vrednotenju upošteva le linearni del krivulje (44), zato smo za izračun naklona vzeli meritve do 20. minute.

Vsi rezultati meritev vzorcev so bili v verodostojnem območju (območje meritev pri napravi GENios znaša 0,000 – 3,000 (48), pri napravi Synergy H4 pa 0,000 – 4,000 (49)), ker pa smo želeli čimdaljšo linearno območje krivulje pozitivne kontrole ter tudi daljše začetno območje krivulje, kjer ima grah manjši naklon, smo se odločili za naslednji poskus uporabiti nižjo koncentracijo encima. S spremembo količine encima v reakcijski zmesi namreč vplivamo na hitrost encimske reakcije (44). Z zmanjšano hitrostjo encimske reakcije se količina substrata porablja počasneje in zato pride do pomanjkanja substrata (pojava t.i. platoja krivulje) kasneje. Z zmanjšano hitrostjo encimske reakcije dosežemo tudi podrobnejši vpogled v začetno obdobje reakcije, kar nas je zanimalo, da bi ugotovili,

ali je nižji naklon pri vzorcu graha v začetnem obdobju naključen, ali posledica njegovega zaviranja encima.

Preglednica XI: Rezultati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 1

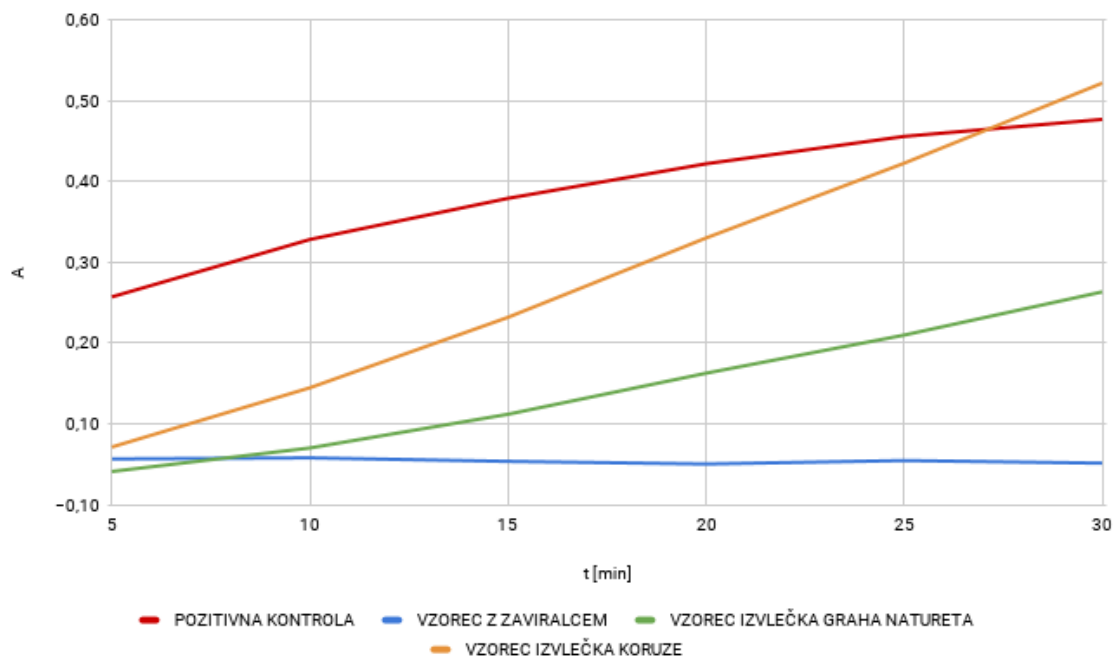
	Slepi vzorec	Pozitivna kontrola	Vzorec z zaviralcem	Slepi vzorec izvlečka graha Natureta	Vzorec izvlečka graha Natureta	Slepi vzorec izvlečka koruze	Vzorec izvlečka koruze
N 5-20 [$\cdot 10^{-3}$]	0,79	29,55	9,24	0,21	22,61	0,09	31,09
%INH 5-20	97,3 %		68,7 %	99,3 %	23,5 %	99,7 %	-5,22 %

Kot smo opazili že na sliki 3 ter vidimo tudi v preglednici XI, sta v skladu s pričakovanji največjo aktivnost lipaze izkazovala pozitivna kontrola in vzorec izvlečka koruze. Le-ta je kazal celo na rahlo aktivacijo. Vzorec z znanim zaviralcem je v tem obdobju meritev kazal 68,7 % inhibicijo, vzorec z izvlečkom graha pa 23,5 % inhibicijo. Slepi vzorci pričakovano praktično ne kažejo aktivnosti kot je razvidno že na sliki 3.

4.1.2 Poskus 2

Pri poskusu 2 nas je zanimal tudi vpliv vrstnega reda dodajanja raztopin in topil v reakcijske zmesi na potek encimskih reakcij in uporabnost rezultatov, zato smo vzporedno izvedli meritve dveh vrstnih redov. Pri obeh smo na podlagi ugotovitev poskusa 1 uporabili nižjo koncentracijo raztopine encima, kar je znižalo vrednosti absorbanc, vendar – kot opazimo na sliki 4 – je krivulja pozitivne kontrole še vedno v času trajanja poskusa prehajala v plato, zato smo se odločili pri nadaljnjih poskusih uporabiti še manj koncentrirano raztopino encima.

Pri vrstnem redu 2, kjer smo kot predzadnji korak v mikrotitrski vdolbinici dodali raztopino substrata, kot zadnji korak pa raztopino encima oziroma v primeru slepih vzorcev samo topilo, je vzorec z zaviralcem že od začetka zelo dobro inhibiral encim. To lahko sklepamo po sliki 4, kjer je razvidno, da je že njegova začetna absorbanca pri 5. minutah nizka v primerjavi s pozitivno kontrolo, ter po rezultatih iz preglednice XII, ki kažejo, da v območju 5-15 minut izkazuje skoraj popolno, 98,7 % inhibicijo. Ta rezultat je bil pričakovan, saj je pri prejšnem poskusu z dvojno količino encima zaviralec že povzročil skoraj popolno inhibicijo od približno 20. minute reakcije dalje. Na sliki 4 zamrznjen grah Natureta izkazuje na začetku celo nižjo absorbanco kot vzorec z zaviralcem, vendar se absorbanca nato veča, tako da znaša inhibicija v območju 5-15 minut 42,5 %.

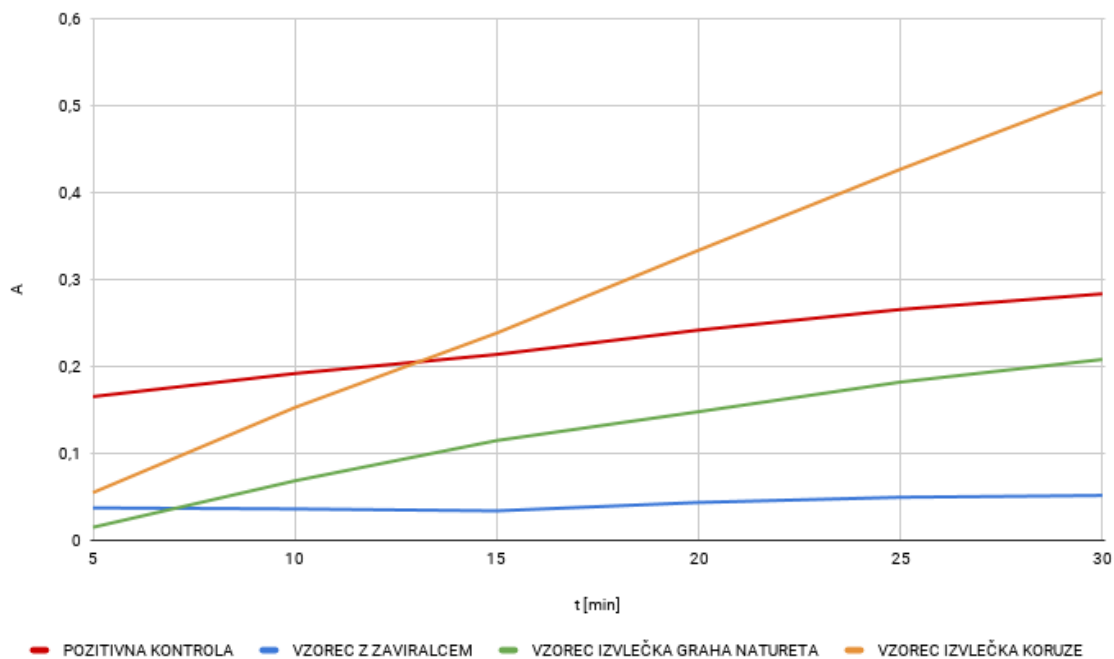


Slika 4: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 2, kjer je bil kot zadnja komponenta reakcijske zmesi dodan encim (vrstni red 2). Prikazane so absorbance po odštetju slepih vzorcev.

Preglednica XII: Rezultati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 2, kjer je bil kot zadnja komponenta dodan encim (vrstni red 2)

	Slepi vzorec	Pozitivna kontrola	Vzorec z zaviralcem	Slepi vzorec izvlečka graha Natureta	Vzorec izvlečka graha Natureta	Slepi vzorec izvlečka koruze	Vzorec izvlečka koruze
N 5-15 [$*10^{-3}$]	0,51	13,71	0,18	0,22	7,88	3,85	21,22
%INH 5-15	96,3 %		98,7 %	98,4 %	42,5 %	71,9 %	-54,8 %

Da bi pridobili boljše podatke o začetnem obdobju reakcije, smo nadaljne poskuse optimizirali z nastavitvijo pogostejših meritev, in sicer na izvajanje meritev vsako minuto. Da smo meritve lahko začeli izvajati čimhitreje po začetku reakcij, smo z naslednjim poskusom dalje optimirali zadnji korak dodajanja raztopin z uporabo 8-kanalne pipete, ki je skrajšala čas pipetiranja. 8-kanalna pipeta je omogočila tudi boljše primerljivost vzorcev v vsakem poskusu, saj zaradi njene uporabe ni prihajalo do takšnih časovnih zamikov začetka reakcij med samimi vzorci.



Slika 5: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 2, kjer je bil kot zadnja komponenta reakcijske zmesi dodan substrat (vrstni red 3). Prikazane so absorbance po odštetju slepih vzorcev.

Na sliki 5 je razvidno, da je tudi pri vrstnem redu 3, kjer smo kot zadnjo dodali raztopino substrata, začetna absorbanca najnižja pri vzorcu izvlečka graha, torej lahko sklepamo, da je bila pri njem encimska reakcija v obdobju med 0-5 minut najpočasnejša. Možno pa je tudi, da je nižja začetna absorbanca posledica časovnega zamika začetka reakcij zaradi pipetiranja, kar smo nadaljnje – kot že omenjeno – optimizirali z uporabo 8-kanalne pipete. Pri tem vrstem redu po podatkih iz preglednice XIII vzorec z izvlečkom graha ni kazal inhibicije, vzorec z izvlečkom koruze pa je izkazoval močno aktivacijo. Pri vrstnem redu 3 je tudi vzorec z zaviralcem v primerjavi z vrstnim redom 2 kazal nižjo inhibicijo (88,2 %).

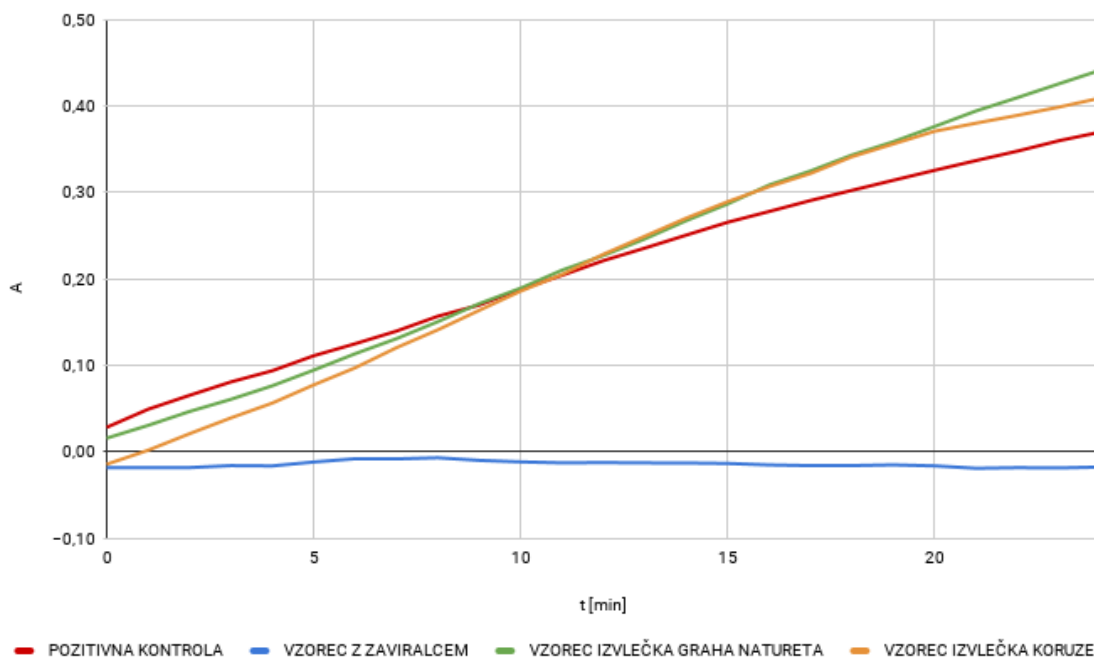
Preglednica XIII: Rezultati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 2, kjer je bil kot zadnja komponenta dodan substrat (vrstni red 3)

	Slepi vzorec	Pozitivna kontrola	Vzorec z zaviralcem	Slepi vzorec izvlečka graha Natureta	Vzorec izvlečka graha Natureta	Slepi vzorec izvlečka koruze	Vzorec izvlečka koruze
N 5-15 [$\cdot 10^{-3}$]	1,03	5,89	0,69	1,26	11,25	4,22	22,60
%INH 5-15	82,5 %		88,2 %	78,6 %	-91,1 %	28,3 %	-283,9 %

Ti podatki nakazujejo na boljšo uporabnost metode z vrstnim redom 2, kljub temu pa smo se za poskus 3 odločili, da z optimirano metodo pomerimo še enkrat oba vrstna reda z nižjo koncentracijo raztopine encima.

4.1.3 Poskus 3

Na sliki 6 vidimo boljše linearno območje pozitivne kontrole v času meritev ($R^2 = 0,996$) pri uporabi koncentracije raztopine encima 1,25 g/L, zato smo to koncentracijo uporabljali tudi pri nadaljnjih poskusih. Vzorec graha je imel tokrat pri prvi meritvi že višjo vrednost absorbance kot vzorec z zaviralcem, kar potrjuje naše predvidevanje iz poskusa 2, da je bila nižja vrednost posledica časovnih zamikov začetka reakcij. Ker smo z uporabo 8-kanalne pipete te zamike očitno uspešno zmanjšali, smo uporabo 8-kanalne pipete uvedli kot stalno prakso.



Slika 6: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 3, kjer je bil kot zadnja komponenta reakcijske zmesi dodan encim (vrstni red 2). Prikazane so absorbance po odštetju slepih vzorcev.

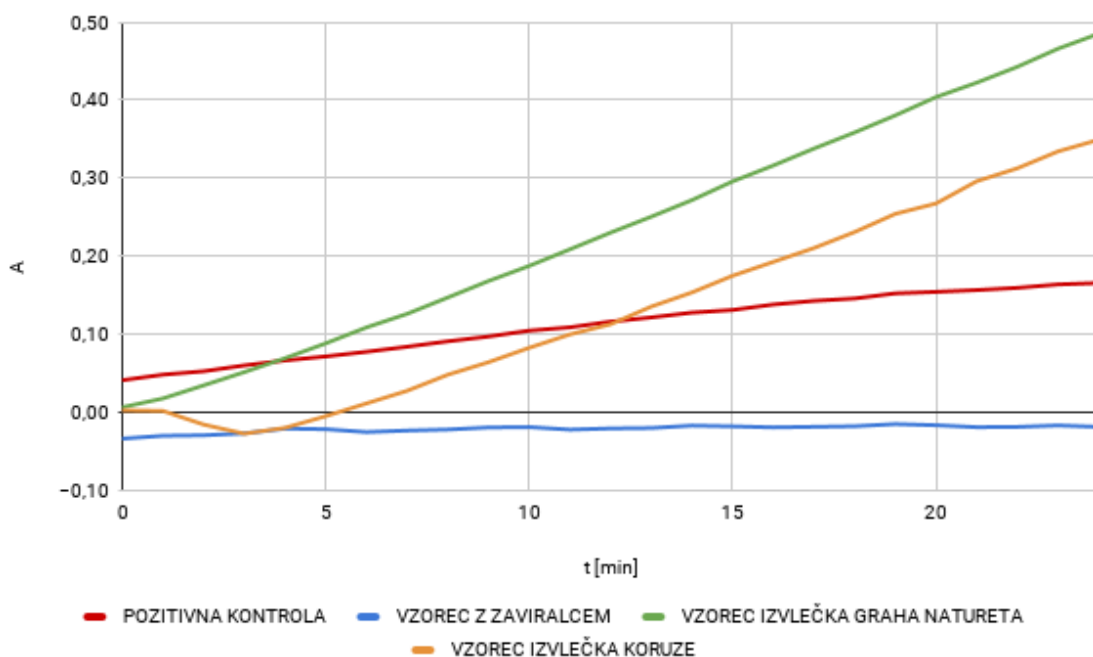
Kot je razvidno iz preglednice XIV, sta oba rastlinska izvlečka povzročila aktivacijo, vzorec z zaviralcem pa ponovno močno (99,8 %) inhibicijo. Snovi v izvlečku bi dejansko lahko interagirale z encimom in s tem povečale njegovo aktivnost, bolj verjetno pa se nam

zdi, da je šlo za interakcijo rastlinskega izvlečka s substratom ali produktom reakcije ali pa za drug pojav, ki je povzročil povečanje naklona krivulje.

Preglednica XIV: Rezultati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 3, kjer je bil kot zadnja komponenta dodan encim (vrstni red 2)

	Slepi vzorec	Pozitivna kontrola	Vzorec z zaviralcem	Slepi vzorec izvlečka graha Natureta	Vzorec izvlečka graha Natureta	Slepi vzorec izvlečka koruze	Vzorec izvlečka koruze
N 0-25 [$\cdot 10^{-3}$]	0,17	14,52	0,03	0,28	18,63	0,61	19,37
%INH 0-25	98,8 %		99,8 %	98,1 %	-28,2 %	95,8 %	-33,3 %

Vrstni red korakov 3 v primerjavi z 2 se je ponovno izkazal za slabšega, saj z rastlinskima izvlečkoma kaže na močno aktivacijo, z zaviralcem 84,8 % zaviralno aktivnost ter večje naraščanje absorbance slepih vzorcev, ki je povezano z 10-minutno inkubacijo, ki smo jo izvedli pri koraku 3. Zato smo se odločili za prihodnjo uporabo vrstnega reda 2.



Slika 7: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 3, kot zadnja komponentna reakcijske zmesi je bil dodan substrat (vrstni red 3). Prikazane so absorbance po odšetju slepih vzorcev.

Preglednica XV: Rezultati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 3, kjer je bil kot zadnja komponenta dodan substrat (vrstni red 3)

	Slepi vzorec	Pozitivna kontrola	Vzorec z zaviralcem	Slepi vzorec izvlečka graha Natureta	Vzorec izvlečka graha Natureta	Slepi vzorec izvlečka koruze	Vzorec izvlečka koruze
N 0-25 [$*10^{-3}$]	0,36	5,77	0,88	0,34	20,86	1,78	18,30
%INH 0-25	93,8 %		84,8 %	94,1 %	-261,6 %	69,2 %	-217,2 %

4.1.4 Poskus 4

Pri poskusu 4 smo ugotavljali učinke različnih topil, s katerimi smo pripravili rastlinske izvlečke, na njihovo zaviralno aktivnost. Ugotovili smo, da zamrznjen grah Natureta izkazuje dobro inhibicijo, kadar je njegov izvleček pripravljen z 96 % EtOH. Obetavno inhibicijo je kazal tudi njegov izvleček pripravljen z 1-butanolom. Iz tega lahko sklepamo, da so spojine z zaviralno aktivnostjo srednje polarne. Ker smo opazili, da so absorbance graha počasneje naraščale v prvih minutah, ter da so nekatere pozitivne kontrole prehajale v plato, smo izračunali še naklone za prvih pet minut meritev. V preglednici XVI vidimo, da so v času 0-5 minut inhibicije graha večje, ter da zaviralno aktivnost izkazuje vzorec graha pripravljenega v vsakem topilu, v 96 % EtOH celo enako močno kot orlistat v 50 % MeOH.

Iz teh rezultatov nato sklepamo, da izvleček z 96 % EtOH izkazuje največjo inhibicijo.

Preglednica XVI: Rezultati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 4

	ZAV	PK 50% MeOH	G 50% MeOH	PK H ₂ O	G H ₂ O	PK 50% EtOH	G 50% EtOH	PK 96% EtOH	G 96% EtOH	PK aceton	G aceton	PK 1-butanol	G 1-butanol
N 0-25 [$*10^{-3}$]	0,30	7,16	6,90	8,35	7,95	6,24	9,10	6,91	1,93	6,47	7,42	1,83	1,15
%INH 0-25	95,9 %		3,69 %		4,79 %		-45,8 %		72,1 %		-14,7 %		36,8 %
N 0-5 [$*10^{-3}$]	0,87	18,86	4,43	19,79	7,08	17,33	7,11	15,54	0,89	11,97	5,73	3,39	1,67
%INH 0-5	95,4 %		76,5 %		64,2 %		59,0 %		94,3 %		52,1 %		50,7 %

ZAV: vzorec z zaviralcem; PK 50% MeOH: pozitivna kontrola s 50% MeOH; G 50% MeOH: vzorec izvlečka graha Natureta s 50% MeOH; ; PK H₂O: pozitivna kontrola z vodo; G H₂O: vzorec izvlečka graha Natureta z vodo; ; PK 50% EtOH: pozitivna kontrola s 50% EtOH; G 50% EtOH: vzorec izvlečka graha Natureta s 50% EtOH; ; PK 96% EtOH: pozitivna kontrola z 96% EtOH; G 96% EtOH: vzorec izvlečka graha Natureta z 96% EtOH; PK aceton: pozitivna kontrola z acetonom; G aceton: vzorec izvlečka graha Natureta z acetonom; ; PK 1-butanol: pozitivna kontrola z 1-butanolom; G 1-butanol: vzorec izvlečka graha Natureta z 1-butanolom.

4.1.5 Poskus 5

Zaradi obetavnih rezultatov z 96 % EtOH pri poskusu 4 smo poskusili takšen izvleček še predhodno očistiti z namenom, da bi dobili metodo, ki bi predstavljala dobro izhodišče za nadaljne raziskave.

Na TLC ploščico smo zaostanke izvlečkov raztopljene v 50 % MeOH, ki je omogočil nanos s kapilaro, nanесли v vrstnem redu kot je označeno v preglednici XVII. Na sliki 8 vidimo, da je sestava izvlečka graha s 96 % EtOH ostala praktično enaka kljub predhodnemu čiščenju z 1-butanolom kot tudi z etilacetatom (lise na mestih 2, 4 in 6).



Slika 8: Fotografija razvite TLC plošče rastlinskih vzorcev poskusa 5 z MF 1

Preglednica XVII: Zaporedje TLC nanosa ter rezultati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 5

		TLC zaporedje:		1	2	3	4	5	6
	Vzorec z zaviralcem	Pozitivna kontrola 50% EtOH	Pozitivna kontrola 96% EtOH	Vzorec izvlečka graha v 50% EtOH	Vzorec izvlečka graha v 96 % EtOH	Z etilacetatom prečiščen vzorec izvlečka graha v 50 % EtOH	Z etilacetatom prečiščen vzorec izvlečka graha v 96 % EtOH	Z 1-butanolom prečiščen vzorec izvlečka graha v 50 % EtOH	Z 1-butanolom prečiščen vzorec izvlečka graha v 96 % EtOH
N 0-25 [$\cdot 10^{-3}$]	0,13	3,89	5,27	3,08	1,14	2,68	3,56	1,65	3,52
%INH 0-25	96,7%			20,9%	78,3%	31,2%	32,5%	57,7%	33,2%

Kljub temu, da izvlečkov nismo uspeli očistiti, tudi nismo ohranili njihove zaviralne aktivnosti, kar je razvidno v preglednici XVII. Vidimo, da je vzorec prečiščen z 1-butanolom v 96 % EtOH izkazal manjšo inhibicijo (33,2 %) od svoje neprečiščene paralele (78,3 %). Približno enako zmanjšanje inhibicije je izkazala tudi njegova paralela prečiščena z etilacetatom (32,5 %).

Čiščenje z 1-butanolom oziroma etilacetatom ne pripomore k optimizaciji metode in ga zato v prihodnje nismo več izvajali.

4.1.6 Poskus 6

Ker nam pri poskusu 5 ni uspelo pridobiti očiščene frakcije z močno inhibicijo, ki bi bila dobro izhodišče za nadaljne raziskave, smo izvedli poskus 6 z namenom, da bi preverili prehajanje potencialnih zaviralcev pankreasne lipaze in nečistoč med topili. Prehajanje potencialnih zaviralcev smo ugotavljali z merjenjem absorbanc (rezultati v preglednici XVIII), prehajanje nečistoč pa s TLC (rezultati na sliki 9).

Preglednica XVIII: Rezultati naklonov pri poskusu 6

	TLC zaporedje:			1	2	3	4	5
	Slepi vzorec	Vzorec z zaviralcem	Pozitivna kontrola 50% EtOH	Organska faza - petroleter	Organska faza - dietil eter	Organska faza - etilacetat	Organska faza - 1-butanol	Vodna faza
N 0-25 [$\cdot 10^{-3}$]	0,16	0,56	6,48	7,64	5,97	6,84	0,70	12,20

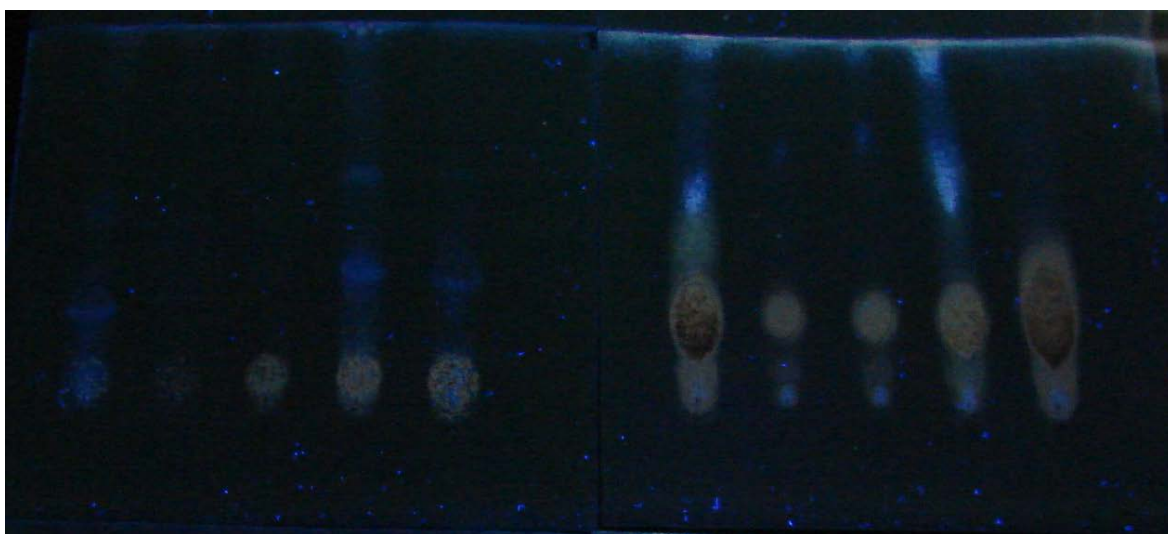
Kjer so bile vrednosti naklonov vzorcov enake ali večje od pozitivne kontrole s 50 % EtOH, lahko sklepamo, da zaviralci niso bili prisotni in se torej niso ekstrahirali v ta topila (petroleter, etilacetat) oziroma niso ostali v začetnem izvlečku (vodna faza). Kjer so bile vrednosti naklonov manjše (dietil eter, 1-butanol), pa lahko pomislimo na prisotnost zaviralcev. Možno je tudi, da na nižji naklon vpliva topilo samo, zato za primerjavo pogledamo naklon pozitivne kontrole z 1-butanolom iz poskusa 4, ki je v časovnem obdobju 0-25 minut znašal 1,82. Iz tega lahko sklepamo, da je organska faza ekstrakcije z 1-butanolom dejansko vsebovala zaviralce (61,6 % inhibicija glede na pozitivno kontrolo z 1-butanolom iz poskusa 4).

Iz slik 9 in 10 vidimo, da organska faza z 1-butanolom ni prečiščena (mesto 4) v primerjavi z izhodnim izvlečkom na mestu 5. Najbolj prečiščeni izgledata frakciji na mestih 2 in 3

(dietil eter in etilacetat), vendar le-ti nista izkazovali inhibicije (etilacetat) oziroma samo možno minimalno inhibicijo (dietil eter).



Slika 9: Fotografija razvitih TLC plošč rastlinskih vzorcev poskusa 6. Na levi strani TLC plošča razvita z MF 2, na desni strani TLC plošča razvita z MF 3.

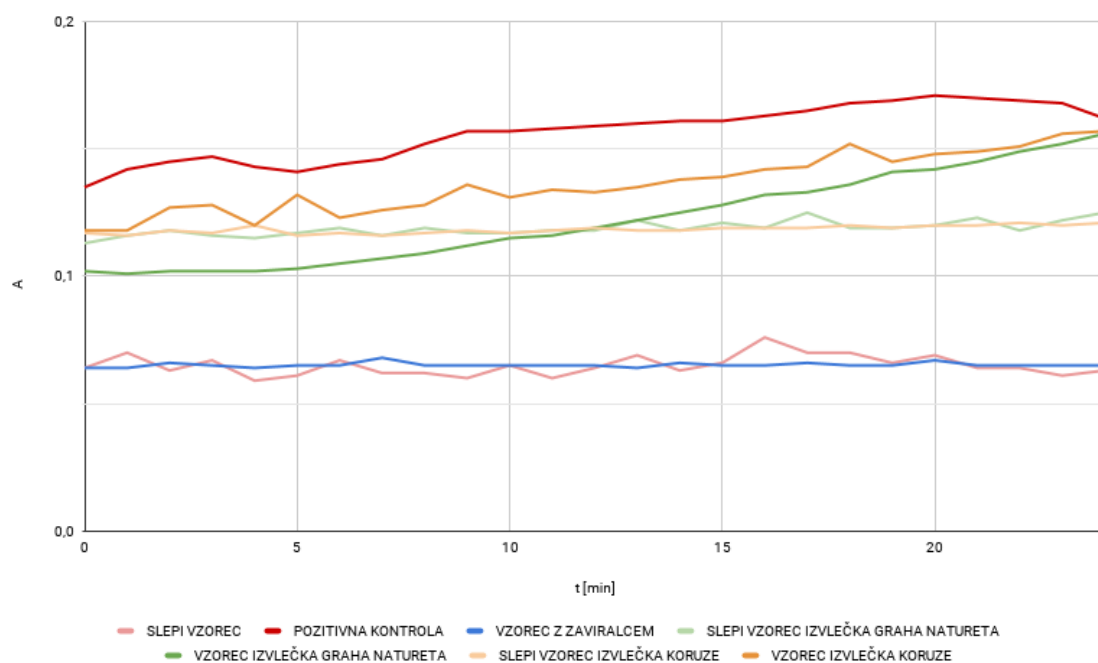


Slika 10: Fotografija razvitih TLC plošč rastlinskih vzorcev poskusa 6 pod UV lučjo 366 nm. Na levi strani TLC plošča razvita z MF 2, na desni strani TLC plošča razvita z MF 3.

4.1.7 Poskus 7

Da bi preverili uporabnost optimizirane metode, do katere smo prišli pri poskusu 3, za aplikacijo na drugih napravah, smo jo izvedli še na napravi Synergy H4 z enakimi nastavitvami.

Kot vidimo na sliki 11, je grah kazal inhibicijo v začetnih 5 minutah, vendar rezultat ni zanesljiv zaradi absorbanc drugih krivulj, ki vidimo, da so – za razliko od vzorca z izvlečkom graha – žagaste oblike. Predvsem problematična je bila krivulja pozitivne kontrole, ki ni kazala dobre linearne aktivnosti ter je imela precej nižje vrednosti absorbance kot v prejšnjih poskusih. Zaradi tega smo pomislili na vpliv časa raztapljanja lipaze v vodi pred centrifugiranjem raztopine encima. Raztopina lipaze namreč po dodatku vode ni postala bistra, ampak smo raztopino vedno centrifugirali, da smo dobili supernatant za nadaljnjo uporabo. Čas od priprave raztopine encima do centrifugiranja je bil kratek, tako da bi lahko razlika približno petih minut do centrifugiranja pomenila približno 15 % razliko v času raztapljanja.



Slika 11: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 7

Ker torej nismo dobili rezultatov primerljivih s poskusom 3, smo nadaljno optimizacijo izvajali še na napravi Synergy H4. Zaradi pomislekov o času raztapljanja encima iz poskusa 7, smo izvedli poskus 8, kjer smo želeli ugotoviti vpliv časa raztapljanja in optimalen čas raztapljanja encima za nadaljne poskuse.

4.1.8 Poskus 8

Kot je razvidno iz preglednice XIX, naklon pozitivne kontrole res narašča z daljšim časom raztapljanja encima. Pozitivni kontroli z najkrajšim (7-minutnim) raztapljanjem prehajata v

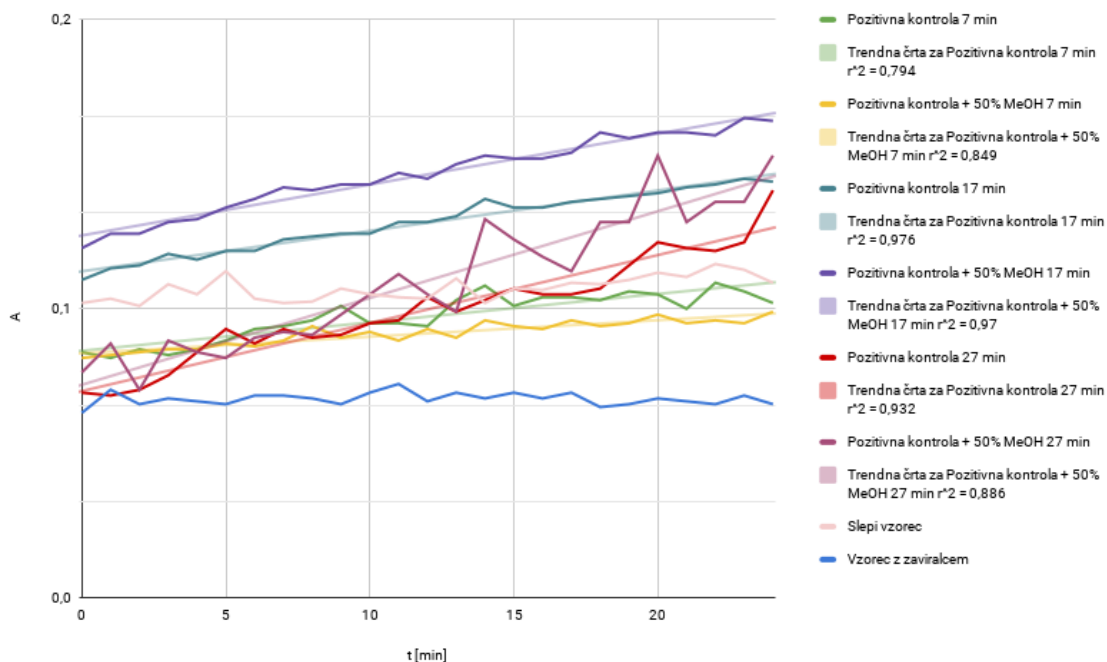
plato, kar nam lahko razjasni, zakaj je pri nekaterih prejšnjih poskusih ob uporabi enakih koncentracij raztopine substrata in encima prišlo do pojava platoja (Poskusi 4, 6, 7), pri nekaterih pa ne (Poskusa 3, 5). Plato je torej nastal zaradi pomanjkanja encima, ki bi nadalje razgrajeval substrat.

Na sliki 12 vidimo, da imata krivulji pozitivnih kontrol s 17-minutnim raztapljanjem lipaze najvišjo absorbanco s še vedno zadostnim naklonom ter da sta njuni krivulji manj žagaste oblike od ostalih, zato smo se odločili, da je takšno raztapljanje najprimernejše.

Prisotnost 50 % MeOH naj bi pri najkrajšem času raztapljanja encima vlivala zaviralno, pri daljših časih pa je pripomogla k višjim vrednostim naklonov, in kot takšna pri izbranem času raztapljanja 17 minut ne ovira meritev.

Preglednica XIX: Rezultati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 8

	Slepi vzorec	Vzorec z zaviralcem	Pozitivna kontrola 7 min	Pozitivna kontrola + 50 % MeOH 7 min	Pozitivna kontrola 17 min	Pozitivna kontrola + 50 % MeOH 17 min	Pozitivna kontrola 27 min	Pozitivna kontrola + 50 % MeOH 27 min
N 0-25 [$\cdot 10^{-3}$]	0,37	0,00	0,98	0,57	1,40	1,76	2,35	3,00

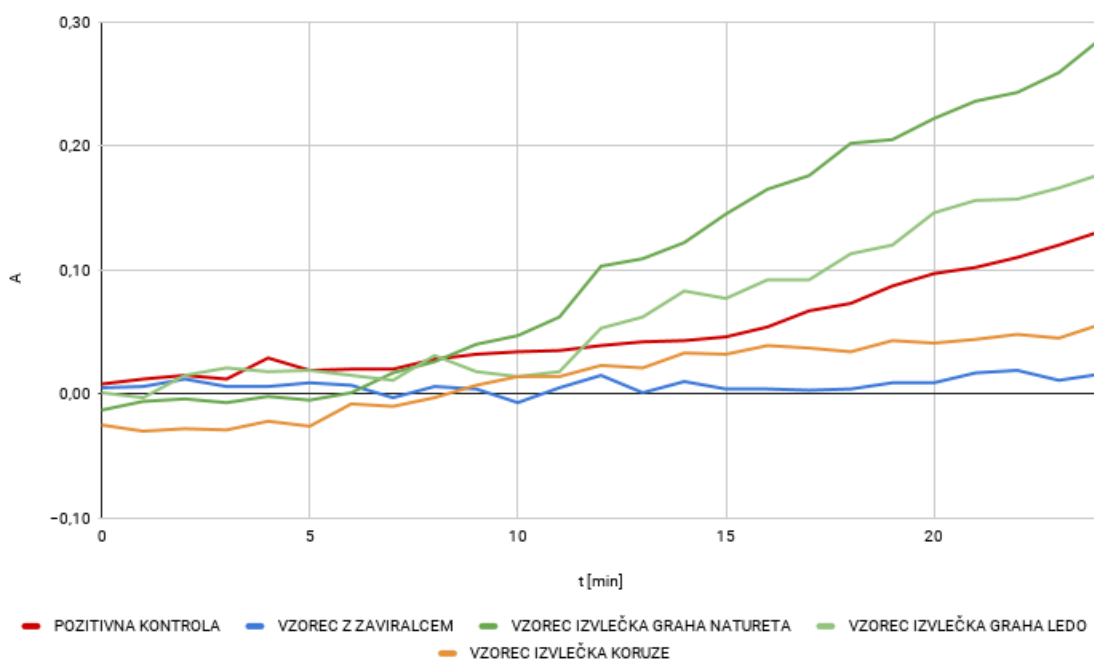


Slika 12: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 8

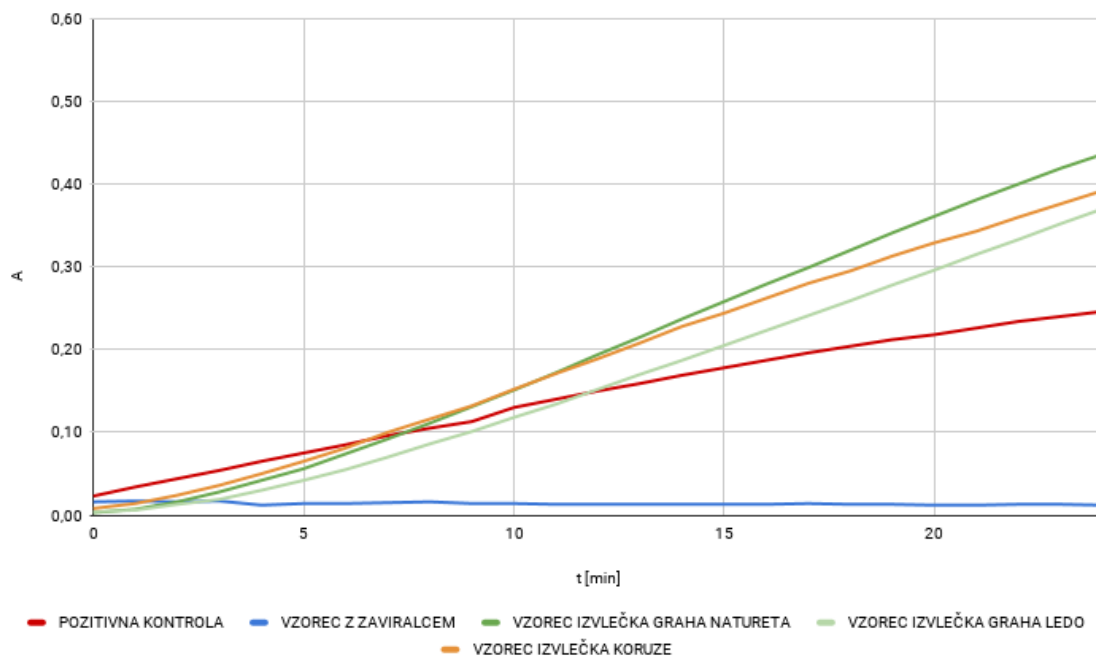
4.1.9 Poskus 9

Ker smo na napravi Synergy H4 dobivali rezultate z žagastimi oblikami krivulj, smo se odločili dodati v reakcijske zmesi DMSO, ki bi naj glede na podatke iz literature (46) zagotovil popolno raztapljanje substrata, v kolikor je ta motil meritve. To smo storili tako, da smo zmešali skupaj raztopino substrata, DMSO in pufer, kar je predstavljalo raztopino, ki smo jo dodali v reakcijsko zmes kot prvi korak. Za primerjavo smo izvedli tudi meritve brez DMSO. Za boljšo primerjavo rezultatov smo vrstnemu redu dodajanja raztopin 2 zamenjali dva koraka tako, da je dodajanje raztopine substrata sledilo dodajanju pufru (vrstni red 5).

Iz slik 13 in 14 je razvidno, da je dodatek DMSO pripomogel k nežagastim krivuljam, prispeval pa je tudi k višjim vrednostim absorbanc ter naklonov krivulj – razen v primeru naklona vzorca z zaviralcem. Ta še vedno kaže popolno inhibicijo, kar potrjuje primernost metode. Tudi krivulja pozitivne kontrole je v primeru dodatka DMSO v linearnem območju skozi celotno obdobje izvajanja meritev, medtem ko v poskusu brez DMSO na začetku skoraj ne narašča ter preide v strmejšo in linearno območje šele po 15. minuti. Pojava nismo znali razložiti.



Slika 13: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 9 brez DMSO



Slika 14: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 9 z DMSO

Ker je bila v obeh primerih (brez DMSO in z DMSO) krivulja vzorca izvlečka graha na začetku meritev položnejša, smo nato načrtovali poskus (poskus 10), s katerim smo želeli preveriti, kaj vpliva na povečan naklon njegove krivulje v kasnejših časovnih obdobjih meritev.

4.1.10 Poskus 10

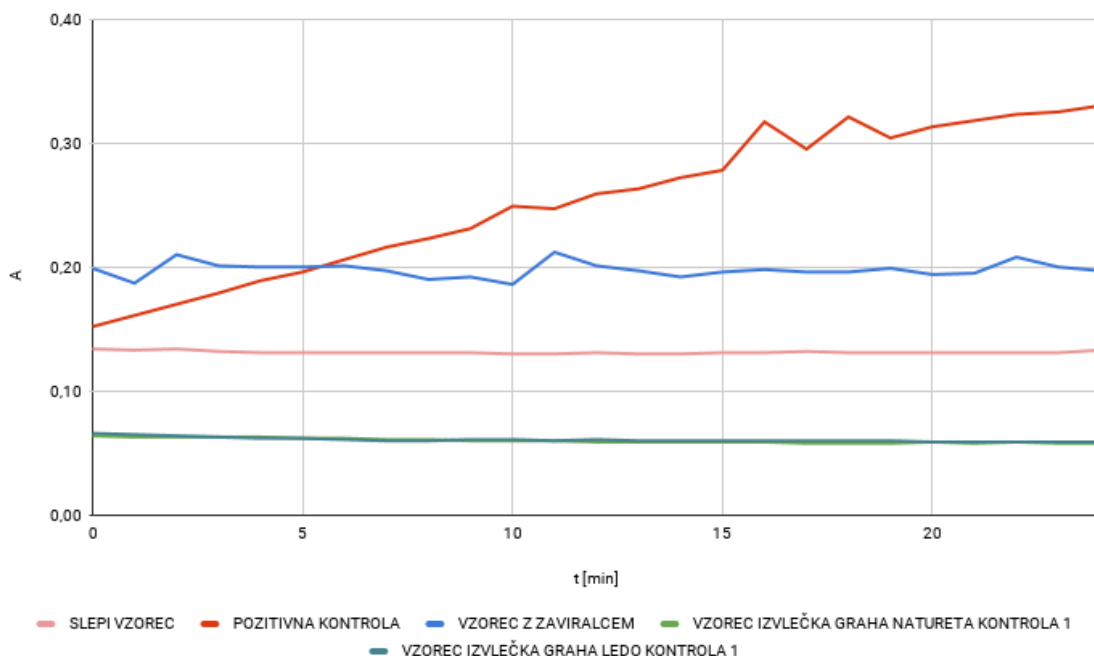
Za vpliv na povečan naklon krivulje graha v kasnejših časovnih obdobjih meritev smo postavili dve hipotezi:

- hipoteza 1: encim neko snov iz graha pretvarja v drugo snov, ki ima absorbanco pri 405 nm (kontrola 1)
- hipoteza 2: snovi iz graha reagirajo s produktom encimske reakcije (p-nitrofenolom ali maščobno kislino) in nastane snov z večjo molarno absorbanco (kontrola 2)

Za preverjanje hipotez smo uporabili reakcijski zmesi, ki smo ju poimenovali kontrola 1 in kontrola 2 (3.2.3.10). Pri vsaki hipotezi smo testirali dve vrsti grahov.

Na sliki 15, ki prikazuje rezultate testiranja hipoteze 1, vidimo, da je krivulja lipaze v linernem območju, vendar pa ima motnje kot ima motnje tudi vzorec z zaviralcem. Pri poskusu 10 smo sicer ponovno uporabili DMSO, vendar smo ga dodali šele direktno v

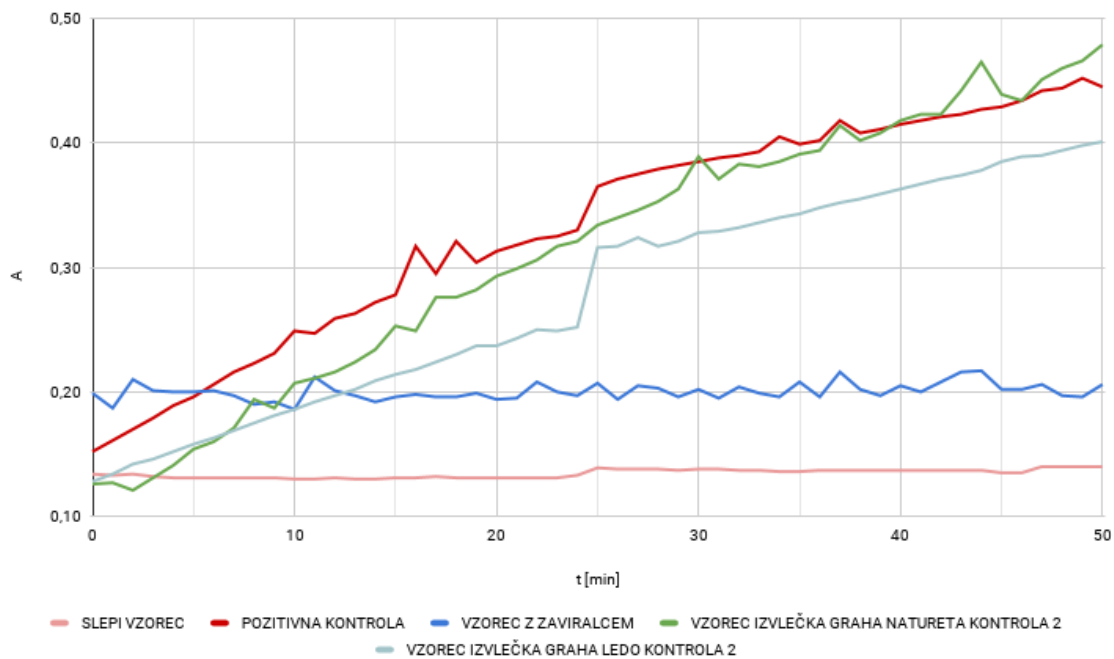
vdolbinice mikrotitrne ploščice. Očitno dodajanje DMSO v vdolbinice mikrotitrne ploščice ni zadovoljivo, ampak moramo DMSO raztopini substrata primešati že pred pipetiranjem. Kljub temu iz slike 15 vidimo, da lahko ovržemo hipotezo 1. Krivulji kontrol 1 sta namreč brez naklona, v primeru potrditve hipoteze pa bi imeli pozitivni naklon.



Slika 15: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 10 kontrole 1

Na sliki 16, ki prikazuje rezultate kontrole 2, je še bolj razvidno, da ni dovolj, če DMSO dodamo šele v vdolbinice mikrotitrne ploščice, zato sklepamo, da ga moramo predhodno primešati raztopini substrata kot v poskusu 9.

Naklon krivulj pozitivne kontrole ter obeh kontrol 2 v času 0-25 bi moral biti enak, saj imajo v tem času ti vzorci enako sestavo. Ker temu ni bilo tako, jih v obdobju 25-50 težko primerjamo, čeprav imata kontroli 2 večji naklon, kar bi lahko potrdilo našo hipotezo 2. Za boljšo medsebojno primerjavo vzorcev zato prilagodimo poskus tako, da DMSO dodamo raztopini substrata že med pripravo raztopin (Poskus 11).



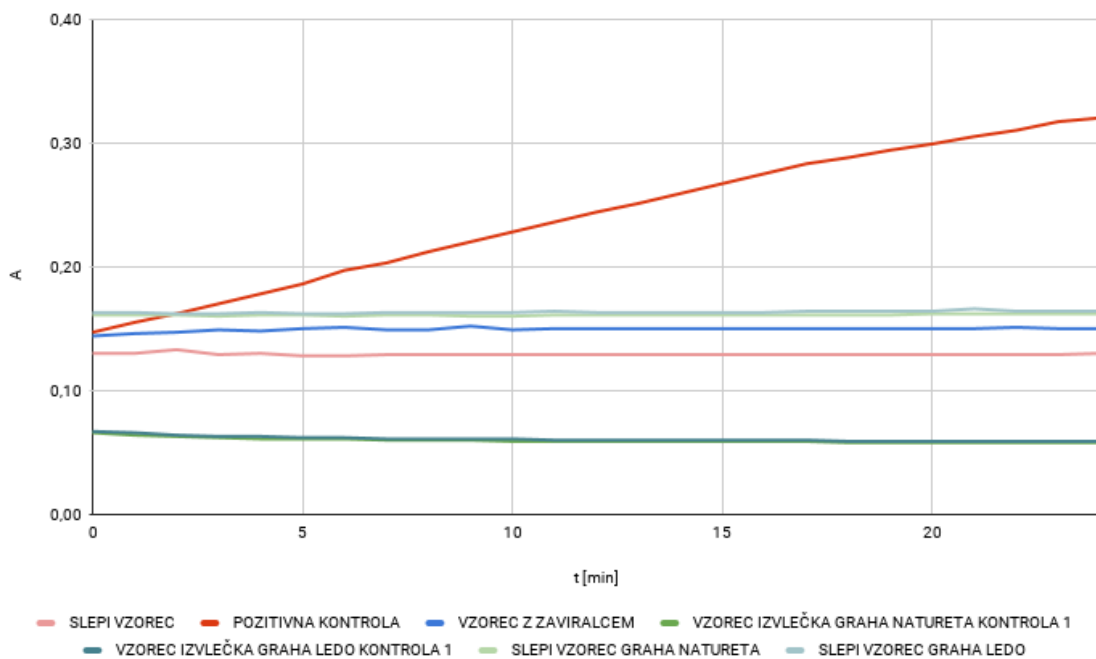
Slika 16: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 10 kontrole 2

4.1.11 Poskus 11

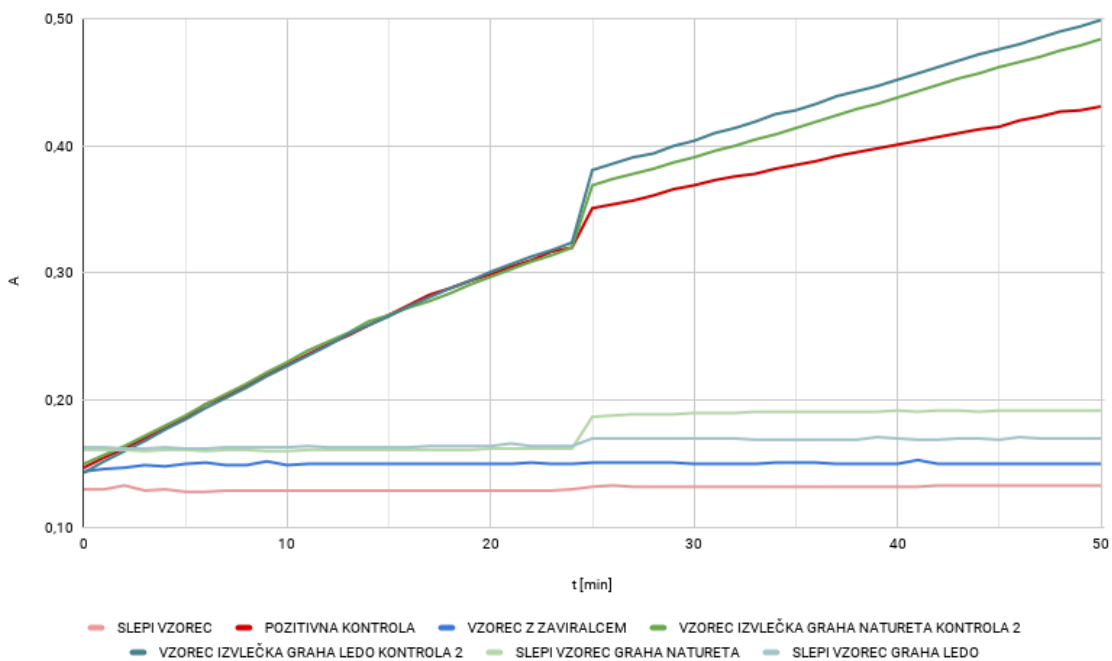
Kot smo sklepali pri poskusu 10, je težavo žgastih krivulj res izboljšalo dodajanje DMSO v raztopino substrata pred pipetiranjem. Zaradi tega dejstva lahko sklepamo tudi, da se vsebina v vdolbinicah ne premeša dovolj kljub temu, da naprava stresa mikrotitrne ploščice pred meritvami. Na slikah 17 in 18 vidimo skoraj nežagaste krivulje ter v obdobju 0-25 minut enak naklon krivulj pozitivne kontrole ter kontrol 2. To predstavlja pričakovan rezultat, saj imajo v tem obdobju ti vzroci enako sestavo.

Tudi pri poskusu 11 smo hipotezo 1 ovrgli, saj krivulji kontrol 1 nista imeli naklona (Slika 17).

Primerjava naklona pozitivne kontrole in kontrol 2 v obdobju 25-50 minut (Slika 18) je pokazala, da je naklon pri kontrolah 2 za skoraj polovico večji kot pri pozitivni kontroli. S tem lahko potrdimo našo hipotezo, da iz produktov razpada substrata (palmitinske kisline ali p-nitrofenola) in snovi iz graha Natureta kot tudi Ledo nastaja snov z višjo molekularno absorbanco.



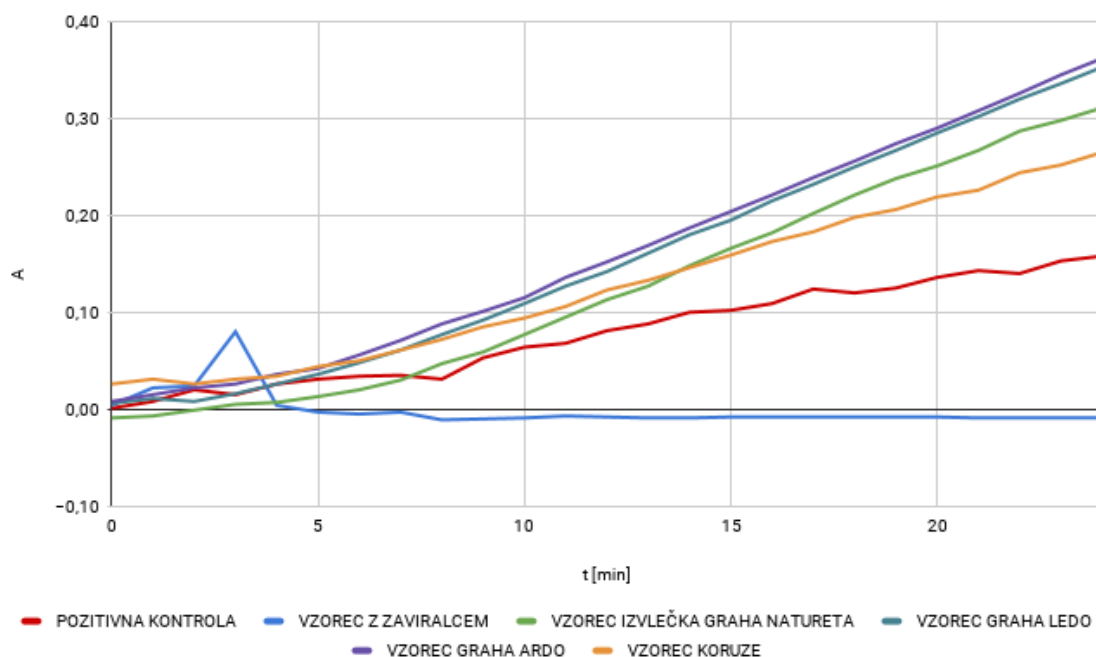
Slika 17: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 11 kontrole 1



Slika 18: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 11 kontrole 2

4.1.12 Poskus 12

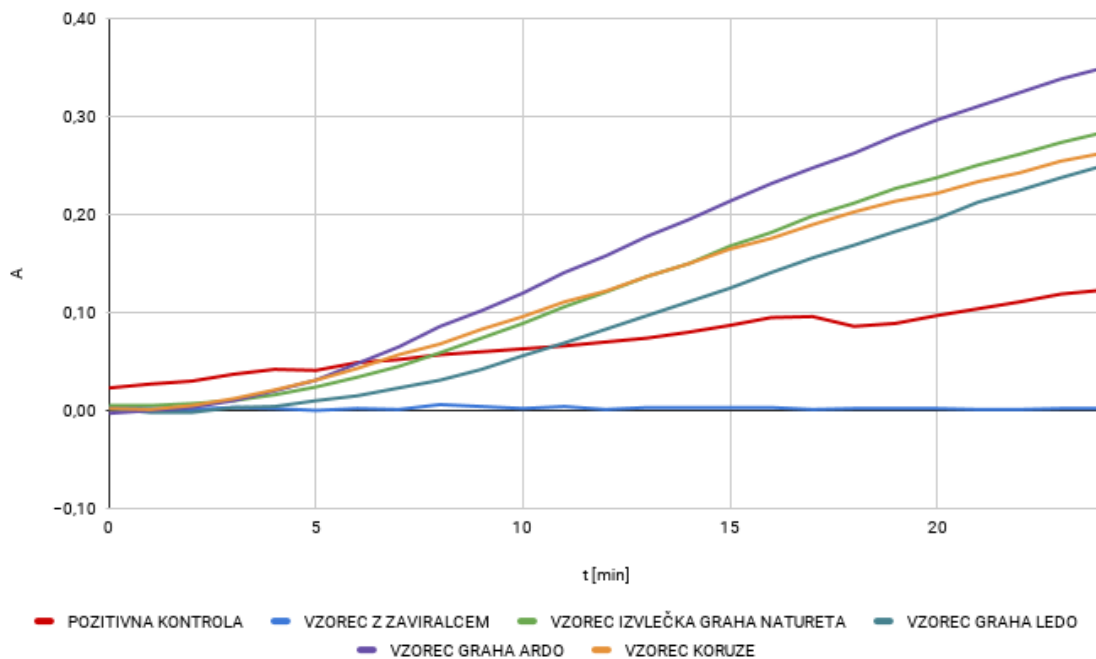
Ker smo pri prejšnjem poskusu pomislili na nezadostno mešanje reakcijskih zmesi v vdolbinicah mikrotitrskih ploščic, smo naredili še poskus 12, kjer smo preverili, kako ročno mešanje s pipetami vpliva na žagasto obliko krivulj. Preizkusili smo tudi, ali bi bile krivulje nežagaste oblike z manjšo količino substrata v reakcijski zmesi.



Slika 19: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 12, kjer smo pri zadnem koraku pipetiranja reakcijsko zmes premešali s pipeto. Prikazane so absorbance po odštetju slepih vzorcev.

Na sliki 19 vidimo, da smo z ročnim mešanjem s pipeto res dosegli že manj žagaste oblike krivulj kot npr. pri poskusu 10 (sliki 15 in 16), kjer nismo izvajali mešanja. Slika 20 pa potrjuje naše predvidevanje, da dobimo še manj žagaste krivulje, če poleg ročnega mešanja uporabimo samo polovično količino substrata. Možen razlog za to je, da se takšna količina substrata popolnoma raztopi. Kljub temu nižje koncentracije substrata niso uporabili kot optimizacijo, ker se je naklon pozitivne kontrole zmanjšal za 43,5 % v primerjavi samo z mešanjem, krivulje pa so bile zadosti nežagaste že pri sami metodi z mešanjem.

Vzorca izvlečka graha Natureta kažeta v celotnem času meritev v obeh primerih aktivacijo, vendar z začetnimi manjšimi nakloni krivulje, po čemer lahko ponovno sklepamo, da iz produkta razpada substrata in snovi iz graha nastaja snov z večjo molarno absorbanco.



Slika 20: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 12, kjer je bila koncentracija dodane raztopine substrata polovico nižja in kjer smo pri zadnem koraku pipetiranja reakcijsko zmes premešali s pipeto. Prikazane so absorbance po odštetju slepih vzorcev.

4.2 Dokazovanje zaviralcev

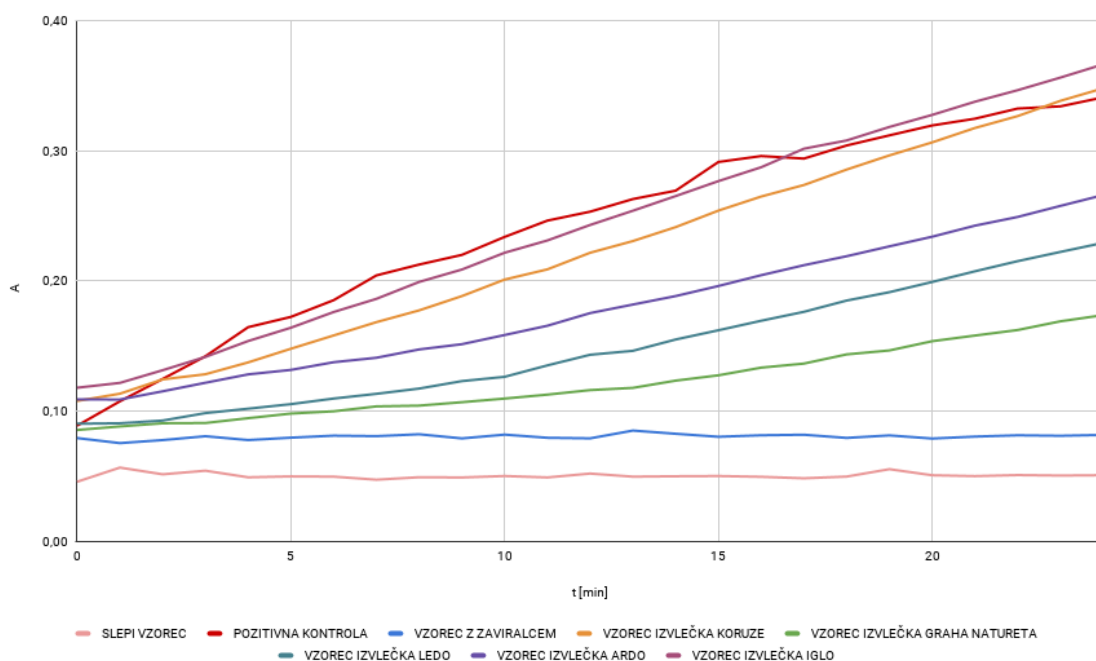
4.2.1 Poskus 13

Z uporabo optimizirane metode poskusa 12 s koncentracijo substrata 1,27 g/L smo na napravi GENios testirali več različnih vrst zamrznjenega graha, da bi v njih dokazali prisotnost zaviralcev in ugotovili, katera vrsta graha predstavlja najobetavnejše izhodišče za novo zdravilo za zdravljenje debelosti. Kot je razvidno v preglednici XX, negativni vzorec zamrznjene koruze in vzorec zamrznjenega izvlečka graha Iglo nista kazala inhibicije, ostali vzorci z izvlečki graha pa so jo, torej lahko sklepamo, da so v rastlinskem materialu zamrznjenega graha Natureta, Ledo in Ardo prisotni zaviralci. Največjo inhibicijo je kazal vzorec izvlečka zamrznjenega graha Natureta (62,3 %). Za čimbolj relevantne rezultate smo za računanje naklona krivulje vzeli območje, kjer je pozitivna kontrola kazala največjo linearnost skozi daljši čas. Kot je razvidno na sliki 21, je imela pozitivna kontrola v začetnih 4 minutah sicer bolj strm linearen naklon, rastlinski vzorci pa ravno v teh začetnih minutah nižjega. Takšno obnašanje vzorcev graha je tudi v skladu z

našo že potrjeno hipotezo 2 (Poskusa 10 in 11), da iz snovi iz graha in produktov razpada substrata nastaja snov z višjo molarno absorbanco. Kljub temu, da po tej metodi v reakcijsko zmes nismo dodajali DMSO, so bile krivulje zadostno nežagaste oblike, k čemur je (kot ugotovljeno pri poskusu 12) pripomoglo mešanje s pipeto.

Preglednica XX: Rezultati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 13

	Slepi vzorec	Pozitivna kontrola	Vzorec z zaviralcem	Vzorec izvlečka koruze	Vzorec izvlečka graha Natureta	Vzorec izvlečka graha Ledo	Vzorec izvlečka graha Ardo	Vzorec izvlečka graha Iglo
N 5-20 [$\cdot 10^{-3}$]	0,16	9,68	0,00	10,64	3,65	6,40	7,01	11,02
%INH 5-20	98,3 %		100,0 %	-10,0 %	62,3 %	33,8 %	27,6 %	-13,9 %



Slika 21: Grafična ponazoritev rezultatov meritev poskusa 13

4.2.2 Poskus 14

Za testiranje več vrst rastlinskih materialov smo uporabili metodo poskusa 7. Uporabili smo novo letino zamrznjenega graha in koruze, uporabili pa smo tudi njune sterilizirane materiale. Krivulje so bile tokrat bolj žagastih oblik, saj nismo izvajali mešanja s pipeto. Zaradi njihove začetne žagaste oblike pri pozitivni kontroli, slepem vzorcu in vzorcu z zaviralcem smo zato iz računanja naklonov izključili rezultate prvih 5 minut. Kot je razvidno iz preglednice XXI, je pri rastlinskem materialu nove letine inhibicijo kazal le

vzorec z izvlečkom zamrznjenega graha Ledo (40,1 %) ter presenetljivo vzorec z izvlečkom zamrznjene kuzu Natureta (51,4 %). Vzorci z grahom v prvih 5 minutah niso imeli žagastih oblik krivulj ter so imeli v tem obdobju obliko krivulj skoraj brez naklona – najnižjega sta izkazovala zamrznjen grah Ledo in zamrznjen grah Natureta. Glede na drugačne rezultate pri odstotku inhibicije skozi celotno opazovano obdobje pa lahko ponovno sklepamo, da ne zaznamo inhibicije pri zamrznjenem grahu Natureta zaradi hipoteze 2.

Preglednica XXI: Rezultati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 14

	Slepi vzorec	Pozitivna kontrola	Vzorec z zaviralcem	Vzorec izvlečka ZGN	Vzorec izvlečka ZGA	Vzorec izvlečka ZGL	Vzorec izvlečka ZGM	Vzorec izvlečka KGB	Vzorec izvlečka KGN	Vzorec izvlečka KGV	Vzorec izvlečka ZKN	Vzorec izvlečka KKN
N 5-25 [$*10^{-3}$]	0,26	2,19	0,06	3,78	4,19	1,31	4,44	4,45	3,01	3,96	1,06	3,57
%INH 5-25	88,0 %		97,5 %	-72,7 %	-91,4 %	40,1 %	-103,1 %	-103,6 %	-37,8 %	-80,9 %	51,4 %	-63,3 %

ZGN: zamrznjen grah Natureta; ZGA: zamrznjen grah Ardo; ZGL: zamrznjen grah Ledo; ZGM: zamrznjen grah Mercator; KGB: konzerviran grah Bonduelle; KGN: konzerviran grah Natureta; KGV: konzerviran grah Valfruta; ZKN: zamrznjena kuzu Natureta; KKN: konzervirana kuzu Natureta

4.2.3 Poskus 15

Kot pri poskusu 13, kjer smo določevali prisotnost zaviralcev v različnih vrstah graha, smo z isto metodo določevali tudi prisotnost zaviralcev pankreasne lipaze v izvlečku lipe. Vrednosti absorbanc vzorcev, v katera smo dodali izvleček lipe, so bile precej višje od ostalih, in sicer okoli vrednosti 1,30-1,50. Te vrednosti so še vedno v območju meritev (0,00-4,00) naprave Synergy H4, ki smo jo uporabili pri tem poskusu. V preglednici XXII vidimo, da vrednosti absorbance naraščajo s časom že pri slepem vzorcu izvlečka lipe, kar je lahko posledica razpada spojin v samem izvlečku ali pa reakcije med izvlečkom lipe in substratom. Ob prisotnosti encima se naklon poveča za približno vrednost naklona pozitivne kontrole. Torej je najverjetneje absorbanca v slepem vzorcu izvlečka lipe posledica razpada spojin izvlečka. V vzorcu izvlečka lipe pa prispeva k večjemu naklonu krivulje še reakcija med encimom in substratom.

Preglednica XXII: Rezultati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 15

	Slepi vzorec	Pozitivna kontrola	Vzorec z zaviralcem	Slepi vzorec izvlečka lipe	Vzorec izvlečka lipe
N 0-25 [$*10^{-3}$]	0,29	4,81	0,03	3,01	7,98
%INH 0-25	94,0 %		99,3 %	37,4 %	-65,9 %

Pozitivna kontrola pri poskusu 15 je imela sicer precej enakomerno krivuljo z linearnim območjem skozi celotno obdobje meritev, vendar smo se za naslednji poskus (Poskus 16) odločili rastlinski material testirati na metodi z dodatkom DMSO, ki je bila optimizirana v poskusu 9.

4.2.4 Poskus 16

Prisotnost zaviralcev smo preverili v rastlinskem materialu vednozelenega gornika ter bele jelke. Ker smo pri rastlinskem materialu bele jelke uporabljali suh vodni izvleček njenega lesa, smo poleg v 50 % MeOH njen rastlinski izvleček pripravili še z vodo.

Tokrat so se pri vzorcih z rastlinskimi materiali vrednosti absorbanc gibale celo v območju približno 2,70-3,70, vendar so tudi te vrednosti v območju meritev naprave Synergy H4. V preglednici XXIII je razvidno, da so se snovi z absorbanco tvorile pri rastlinskih vzorcih že v odsotnosti encima, saj imajo vsi višje vrednosti naklonov kot pozitivna kontrola, s prisotnostjo encima pa so nakloni narastli do takšnih vrednosti, da bi lahko sklepali, da prihaja do tvorbe snovi z absorbanco tudi med snovmi iz rastlin in encimom. Iz teh rezultatov torej ne moremo sklepati na prisotnost zaviralcev, ker pa so bile vrednosti absorbanc visoke, smo se odločili ponoviti poskus z razredčeno raztopino izvlečka bele jelke.

Preglednica XXIII: Rezultati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 16

	Slepi vzorec	Pozitivna kontrola	Vzorec z zaviralcem	Slepi vzorec izvlečka vednozelenega gornika	Vzorec izvlečka vednozelenega gornika	Slepi vzorec izvlečka bele jelke v 50 % MeOH	Vzorec izvlečka bele jelke v 50 % MeOH	Slepi vzorec izvlečka bele jelke v H ₂ O	Vzorec izvlečka bele jelke v H ₂ O
N 0-25 [$*10^{-3}$]	-0,06	7,55	0,21	11,51	21,67	9,32	20,93	13,70	34,07
%INH 0-25	100,8 %		97,2 %	-52,3 %	-186,9 %	-23,4 %	-177,1 %	-81,4 %	-351,1 %

4.2.5 Poskus 17

Ker je bil poskus narejen po enaki metodi, je pričakovano, da so dobljene vrednosti (Preglednica XXIV) slepega vzorca, pozitivne kontrole in vzorca z zaviralcem približno enake kot pri prejšnjem poskusu (Poskus 16). Vzorca z dodatkom izvlečka bele jelke z nižjo koncentracijo sta – kot želeno – izkazovala nižje vrednosti absorbance, in sicer v območju približno 0,43-0,77. Iz preglednice XXIV vidimo, da so se snovi z absorbanco

tvorile tudi pri slepem vzorcu razredčenega izvlečka bele jelke, vendar v precej manjši količini, tako da je bil tokrat njegov naklon krivulje nižji od naklona krivulje pozitivne kontrole. Ob prisotnosti encima pa je naklon ponovno narastel do takšne vrednosti, da je v primerjavi z pozitivno kontrolo prišlo do aktivacije, kar pa je verjetno posledica nekih neidentificiranih interakcij med komponentami reakcijske zmesi in ne dejanske povečane encimske aktivnosti.

Tudi iz teh rezultatov torej ne moremo sklepati na prisotnosti zaviralcev v beli jelki.

Preglednica XXIV: Rezultati naklonov in odstotkov inhibicije pri poskusu 17

	Slepi vzorec	Pozitivna kontrola	Vzorec z zaviralcem	Slepi vzorec izvlečka bele jelke v 50 % MeOH, nižja koncentracija	Vzorec izvlečka bele jelke v 50 % MeOH, nižja koncentracija
N 0-25 [$*10^{-3}$]	-0,04	7,46	0,14	3,64	14,81
%INH 0-25	100,5 %		98,1 %	51,2 %	-98,7 %

5 SKLEP

S spreminjanjem posameznih parametrov (uporaba različnih topil, prilagajanje koncentracij reagentov in izvlečkov, različna zaporedja dodajanja le-teh v reakcijske zmesi, uporaba različnih pipet in različnih nastavitev mikrotitrskega čitalca) smo optimizirali spektrofotometrično metodo določevanja zaviranja encima pankreasne lipaze. Optimizacijo smo dosegli z naslednjimi spremembami parametrov:

- kontinuirano merjenje (izvajanje meritev vsako minuto, 25 minut)
- zmanjšana koncentracija raztopine encima na 1,25 g/L
- vrstni red dodajanja 2, kjer v reakcijsko zmes v zadnjem koraku dodamo raztopino encima
- uporaba 8-kanalne pipete pri pipetiranju zadnjega koraka
- časovno kontrolirano raztapljanje pankreasne lipaze pri pripravi raztopine encima (17 minut)
- dodatek DMSO direktno v raztopino s substratom in ne šele v reakcijsko zmes
- ročno mešanje reakcijskih zmesi s pipetami po pipetiranju zadnjega koraka

Boljši vpogled v dogajanje v reakcijskih zmesih smo dosegli s kontinuiranim merjenjem, ki je omogočilo vpogled v spreminjanje hitrosti reakcij in s tem lažje ugotavljanje morebitnega primanjkljaja substrata ali zakasnenega učinka zaviralcev. Zmanjšanje koncentracije encima na 1,25 g/L je povečalo opazovano območje zaradi daljše linearnosti krivulje pozitivne kontrole. Vpogled v dogajanje v reakcijski zmesi smo dobili še s prilagojeno metodo (Poskusa 10 in 11), s katero smo ugotovili interakcije med izvlečkom graha in produkti razpada substrata.

Pri dokazovanju zaviralcev v grahu so pri eni letini kazale inhibicijo skoraj vse vrste zamrznjenega graha (Natureta, Ledo, Ardo), pri drugi letini graha pa samo zamrznjen grah Ledo. Pri steriliziranih vrstah graha nismo zaznali inhibicije, prav tako nismo zaznali inhibicije pri sterilizirani koruzi kot tudi pri zamrznjeni koruzi. Pri poskusih določanja zaviralcev v izvlečkih lipe, vednozelenega gornika in bele jelke rezultati kažejo, da zaviralci pankreasne lipaze najverjetneje niso prisotni v teh rastlinskih vzorcih.

Za potrditev zaviralnega delovanja izvlečkov graha bi bilo potrebno še nadalje optimizirati metodo za zagotovitev večje robustnosti in nato preveriti prisotnost zaviralcev v več

letinah zamrznjenega graha ter izvesti nadaljne raziskave s pH-stat metodo, ki velja za referenčno.

6 LITERATURA

1. Caballero B. The Global Epidemic of Obesity: An Overview. *Epidemiol Rev.* 2007 May 2;29(1):1–5.
2. Frühbeck G, Toplak H, Woodward E, Yumuk V, Maislos M, Oppert J-M. Obesity: The Gateway to Ill Health – an EASO Position Statement on a Rising Public Health, Clinical and Scientific Challenge in Europe. *Obes Facts.* 2013;6:117–20.
3. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, et al. The global obesity pandemic: Shaped by global drivers and local environments. *Lancet.* 2011;378(9793):804–14.
4. Yumuk V, Tsigos C, Fried M, Schindler K, Busetto L, Micic D, et al. European Guidelines for Obesity Management in Adults. *Obes Facts.* 2015;8(6):402–24.
5. Health Status [Internet]. [cited 2017 Apr 10]. Available from: http://stats.oecd.org/index.aspx?DataSetCode=HEALTH_STAT#
6. Kelly T, Yang W, Chen C-S, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes.* 2008;32(9):1431–7.
7. Ribarič S. Temelji patološke fiziologije. 2. izdaja. Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo; 2011. 65-83 p.
8. Seyedan A, Alshawsh MA, Alshagga MA, Koosha S, Mohamed Z. Medicinal Plants and Their Inhibitory Activities against Pancreatic Lipase: A Review. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2015;2015:1–14.
9. WHO : Global Database on Body Mass Index [Internet]. [cited 2017 Apr 10]. Available from: http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html
10. Cirila U, Ribič H, Djomba JK, Zaletel-kragelj L, Maučec J. TVEGANJA VEDENJA , POVEZANA Z ZDRAVJEM IN NEKATERA ZDRAVSTVENA STANJA PRI ODRASLIH PREBIVALCIH SLOVENIJE Rezultati raziskave Dejavniki tveganja za nenalezljive bolezni pri odraslih prebivalcih Slovenije 2008 (Z zdravjem povezan vedenjski slog). Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije. 2010.
11. G Karam J, I McFarlane S. Secondary causes of obesity. *Futur Med.* 2007;83(8):641–50.
12. Bray GA, Ryan DH. Drug Treatment of Obesity. *Psychiatr Clin North Am.* 2011 Dec;34(4):871–80.
13. Obesity: A Growing Pharmacologic Challenge [Internet]. *Pharmacy Times.* 2006

- [cited 2017 Apr 13]. Available from:
<http://www.pharmacytimes.com/publications/issue/2006/2006-11/2006-11-6002>
14. Lenzi A, Migliaccio S, Donini LM. Multidisciplinary approach to obesity : from assessment to treatment. Springer; 2014. 339 p.
 15. Conrad AO, Dubin RL, Uwaifo GI, Jack L, Kennedy K. Clinical Pharmacist Services in a Multidisciplinary Weight Management Clinic. *J Health Care Poor Underserved*. 2013;24(1A):29–35.
 16. Kotnik P, Čampa A, Vogrin B, Starc G, Strel J, Urbančič M, et al. Preprečevanje, klinična ocena in obravnava čezmerne telesne teže in debelosti v preventivnem programu ZDAJ [Internet]. 2015 [cited 2017 May 25]. Available from:
http://www.skupajzazdravje.si/media/vogrin.b_.obrnava.debelosti.pdf
 17. Apovian CM, Garvey WT, Ryan DH. Challenging obesity: Patient, provider, and expert perspectives on the roles of available and emerging nonsurgical therapies. *Obesity (Silver Spring)*. 2015 Jul;23 Suppl 2(0 2):S1–26.
 18. WHO | Healthy diet [Internet]. WHO. World Health Organization; 2016 [cited 2017 May 26]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs394/en/>
 19. Foster-Schubert KE, Alfano CM, Duggan CR, Xiao L, Campbell KL, Kong A, et al. Effect of diet and exercise, alone or combined, on weight and body composition in overweight-to-obese post-menopausal women. *Obesity (Silver Spring)*. 2012 Aug;20(8):1628–38.
 20. Johns DJ, Hartmann-Boyce J, Jebb SA, Aveyard P, Behavioural Weight Management Review Group. Diet or exercise interventions vs combined behavioral weight management programs: a systematic review and meta-analysis of direct comparisons. *J Acad Nutr Diet*. 2014 Oct;114(10):1557–68.
 21. Kim SJ, de Souza RJ, Choo VL, Ha V, Cozma AI, Chiavaroli L, et al. Effects of dietary pulse consumption on body weight: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*. 2016;103(5):1213–23.
 22. 2016 mednarodno leto stročnic, Hranljiva zrna za trajnostno prihodnost [Internet]. [cited 2017 Apr 15]. Available from:
http://www.mkgp.gov.si/fileadmin/mkgp.gov.si/pageuploads/Medijsko_sredisce/2016/IYP_brosura_FAO.pdf
 23. Branca F, Nikogosian H, Lobstein T, World Health Organization. Regional Office

- for Europe., WHO European Ministerial Conference on Counteracting Obesity (2006 : Istanbul T. The challenge of obesity in the WHO European region and the strategies for response : summary. World Health Organization, Regional Office for Europe; 2007. 32 p.
24. Hamdy O. Obesity Medication. *Medscape*. 2017;1–16.
 25. Žiberna L. Farmakološki pristopi pri zdravljenju debelosti [Internet]. 2015 [cited 2017 Apr 10]. Available from: http://www.fvz.upr.si/sites/default/files/ziberna_-_farmakoloski_pristopi_pri_zdravljenju_debelosti_ver3.pdf
 26. Bray GA. Obesity in adults: Drug therapy [Internet]. 2016 [cited 2017 Apr 16]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/obesity-in-adults-drug-therapy#H1268489>
 27. Haslam D. Weight management in obesity – past and present. *Int J Clin Pract*. 2016;70(3):206–17.
 28. Pahlajani S, Citrome L. Liraglutide Subcutaneous Injection for Weight Loss. *Int J Clin Pr* [Internet]. 2015 [cited 2017 Apr 16];7(69):719–21. Available from: <http://www.medscape.com/viewarticle/847241>
 29. Lužnik IA, Savič BS, Savić KS, editors. Etiologija in patologija debelosti: zbornik prispevkov za recenzijo/ 2. simpozij Katedre za temeljne vede. Visoka šola za zdravstveno nego Jesenice; 2011.
 30. Despopoulos A, Silbernagl S. Color atlas of physiology. 5th ed. *Physiology*. 2003. 230-257 p.
 31. Ros E. Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 2000;151(2):357–79.
 32. Birari RB, Bhutani KK. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discov Today*. 2007;12(19–20):879–89.
 33. Guyton AC, Hall JE (John E. Textbook of medical physiology. 11th ed. Elsevier Saunders; 2006. 811-816 p.
 34. Pafumi Y, Lairon D, De La Porte PL, Juhel C, Storch J, Hamosh M, et al. Mechanisms of inhibition of triacylglycerol hydrolysis by human gastric lipase. *J Biol Chem*. 2002;277(31):28070–9.
 35. Lowe ME. Pancreatic triglyceride lipase and colipase: Insights into dietary fat

- digestion. *Gastroenterology*. 1994;107(5):1524–36.
36. Rubin B, Dennis E, editors. *Methods in Enzymology, Lipases (Part B: Enzyme Characterization and Utilization)*. 286th ed. Academic Press; 1997. 1-15 p.
 37. Lunagariya NA, Patel NK, Jagtap SC, Bhutani KK. Inhibitors of pancreatic lipase: State of the art and clinical perspectives. *EXCLI J*. 2014;13:897–921.
 38. Björkling F, Dahl A, Patkar S, Zundel M. Inhibition of lipases by phosphonates. *Bioorganic Med Chem*. 1994;2(7):697–705.
 39. Bitou N, Ninomiya M, Tsujita T, Okuda H. Screening of lipase inhibitors from marine algae. *Lipids*. 1999;34(5):441–5.
 40. de la Garza A, Milagro F, Boque N, Campi3n J, Mart3nez J. Natural Inhibitors of Pancreatic Lipase as New Players in Obesity Treatment. *Planta Med*. 2011 May 16;77(8):773–85.
 41. Slanc P, Doljak B, Kreft S, Lunder M, Janeš D, Štrukelj B. Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition. *Phyther Res*. 2009 Jun;23(6):874–7.
 42. Beisson F, Riviere C, Tiss A, Verger R. Methods for Lipase Detection and Assay : A Critical Review. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2000;9312:133–53.
 43. Stoytcheva M, Stoytcheva M, Montero G, Zlatev R, León JÁ, Gochev V. Analytical Methods for Lipases Activity Determination : A Review. *Curr Anal Chem*. 2012;8(3):400–7.
 44. Bisswanger H. Enzyme assays. *Perspect Sci*. 2014;1(1–6):41–55.
 45. Eva Koprivec. Optimizacija UV-spektrofotometrične metode določevanja aktivnosti pankreasne lipaze in določevanje njene inhibicije z rastlinskimi in glivnimi izvlečki. Univerza v Ljubljani; 2002.
 46. Lidija Gerzej. Razvoj postopka izolacije inhibitorjev pankreasne lipaze iz semen graha (*Pisum sativum L.*). Univerza v Ljubljani; 2002.
 47. Wrolstad RE, Acree TE, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, et al., editors. *Handbook of food analytical chemistry*. Wiley-Interscience; 2005. 379 p.
 48. Tecan Austria Ges.m.b.H. Operating manual for GENios, GENios FL, and GENios Plus. 2002.
 49. BioTek Instruments I. Synergy™ HT Operator's Manual. Vol. Revision I. 2008.