

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAJA ŽUPANC

**ISKANJE NOVIH ZAVIRALCEV ALFA-GLUKOZIDAZE,  
ALFA-AMILAZE IN DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE 4 V LESNIH GOBAH**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

KAJA ŽUPANC

**ISKANJE NOVIH ZAVIRALCEV ALFA-GLUKOZIDAZE,  
ALFA-AMILAZE IN DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE 4 V LESNIH GOBAH**

**SCREENING FOR NEW INHIBITORS OF ALPHA-GLUCOSIDASE, ALPHA-  
AMYLASE AND DIPEPTIDYL-PEPTIDASE 4 IN WOOD MUSHROOMS**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom prof. dr. BORUTA ŠTRUKLJA, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. MATJAŽA RAVNIKARJA, mag. farm.

## **Zahvala**

*Iskreno se zahvaljujem mentorju, prof. dr. Borutu Štruklju za strokovno pomoč, spodbude in pozitivno. Posebna hvala somentorju, asist. dr. Matjažu Ravnkarju za prijaznost, strokovno usmerjanje pri laboratorijskem delu in koristne nasvete pri pisanju magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi predsedniku komisije, prof. dr. Stanislavu Gobcu ter članu komisije, doc. dr. Iliji German Iliću za prilagodljivost. Hvala prof. dr. Francu Pohlevnu za sodelovanje, asist. dr. Evi Tavčar Benković ter dr. Dušanu Žigonu za pomoč pri meritvah in asist. Jeleni Golubović iz Univerze v Beogradu za izolacijo fomentariola.*

*Želela bi se iz srca zahvaliti tudi družini, ki me je podpirala, usmerjala in verjela vame. Hvala vam! Samo, hvala tebi, da si mi stal ob strani in me bodril. Hvala vsem prijateljem za spodbudne besede in Primožu za pomoč, ko me Word ni ubogal.*

## **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Boruta Štruklja, mag. farm. in somentorja asist. dr. Matjaža Ravnkarja, mag. farm.

Ljubljana, 2017

Kaja Županc

Predsednik magistrske komisije: prof. dr. Stanislav Gobec

Mentor: prof. dr. Borut Štrukelj

Somentor: asist. dr. Matjaž Ravnkar

Član magistrske komisije: doc. dr. Ilija German Ilić

## VSEBINA

1. UVOD.....	1
1.1. SLADKORNA BOLEZEN.....	1
1.1.1. SLADKORNA BOLEZEN TIPA 2 .....	2
1.2. GOBE.....	2
1.2.1. GNILOŽIVKE.....	3
1.2.2. ZAJEDALKE .....	3
1.2.3. SOŽIVKE.....	3
1.3. LESNE GOBE .....	3
1.3.1. KRESILNA GOBA ALI BUKOVA KRESILKA ( <i>FOMES FOMENTARIUS</i> ) .....	3
1.3.1.1. FOMENTARIOL .....	4
1.3.2. DIŠEČA TRAMOVKA ( <i>GLEOPHYLLUM ODORATUM</i> ).....	5
1.4. ALFA-GLUKOZIDAZA.....	5
1.5. ALFA-AMILAZA .....	6
1.6. DIPEPTIDIL-PEPTIDAZA 4.....	7
1.7. KROMATOGRFSKE METODE .....	8
1.7.1. KOLONSKA KROMATOGRAFIJA .....	8
1.7.2. HPLC.....	9
1.8. LC-MS .....	9
2. NAMEN MAGISTRSKEGA DELA .....	10
3. MATERIALI IN METODE .....	11
3.1. MATERIALI .....	11
3.1.1. BIOLOŠKI MATERIAL.....	11
3.1.2. KEMIKALIJE .....	11
3.1.3. LABORATORIJSKA OPREMA .....	12
3.2. METODE.....	13
3.2.1. PRIPRAVA EKSTRAKTOV.....	13

3.2.2.	TEST EKSTRAKTOV .....	14
3.2.2.1.	MERJENJE AKTIVNOSTI ALFA-GLUKOZIDAZE .....	14
3.2.2.2.	MERJENJE AKTIVNOSTI ALFA-AMILAZE .....	15
3.2.2.3.	MERJENJE AKTIVNOSTI DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE 4.....	16
3.2.3.	SEPARACIJA EKSTRAKTOV GOB .....	17
3.2.3.1.	ULTRAFILTRACIJA EKSTRAKTOV GOB .....	17
3.2.3.2.	DIALIZA EKSTRAKTOV GOB .....	17
3.2.3.3.	KOLONSKA KROMATOGRAFIJA .....	18
3.2.3.4.	IZOLACIJA FOMENTARIOLA IZ GOBE <i>FOMES FOMENTARIUS</i> 19	
3.2.3.5.	HPLC.....	19
3.2.4.	IDENTIFIKACIJA AKTIVNIH SPOJIN (LC-MS) .....	19
3.2.5.	PRIPRAVA ENCIMOV .....	19
3.2.5.1.	PRIPRAVA ENCIMA ALFA-GLUKOZIDAZA.....	19
3.2.5.2.	PRIPRAVA ENCIMA ALFA-AMILAZA .....	20
3.2.5.3.	PRIPRAVA ENCIMA DIPEPTIDIL-PEPTIDAZA 4.....	20
4.	REZULTATI .....	21
4.1.	PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB Z ALFA-GLUKOZIDAZO .....	21
4.1.1.	MERJENJE AKTIVNOSTI IZOLIRANEGA ENCIMA ALFA-GLUKOZIDAZA .....	21
4.1.2.	PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB Z ALFA-GLUKOZIDAZO .....	22
4.1.3.	PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB PO ULTRAFILTRACIJI.....	23
4.1.4.	PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB PO DIALIZI .....	24
4.1.5.	PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB PO KOLONSKI KROMATOGRAFIJI .....	25
4.1.6.	PREIZKUŠANJE FOMENTARIOLA Z ALFA-GLUKOZIDAZO .....	28
4.2.	PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB Z ALFA-AMILAZO .....	29
4.2.1.	PREIZKUŠANJE AKTIVNOSTI ENCIMA ALFA-AMILAZA.....	29
4.2.2.	PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB Z ALFA-AMILAZO .....	30

4.2.3.	PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB PO ULTRAFILTRACIJI.....	36
4.2.4.	PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB PO DIALIZI .....	37
4.2.5.	PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB PO KOLONSKI KROMATOGRAFIJI .....	38
4.3.	PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB Z DIPEPTIDIL-PEPTIDAZO 4 .....	39
4.3.1.	PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB Z DIPEPTIDIL-PEPTIDAZO 4.	39
4.3.2.	PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB PO ULTRAFILTRACIJI.....	42
4.3.3.	PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB PO DIALIZI .....	42
4.3.4.	PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB PO KOLONSKI KROMATOGRAFIJI .....	44
4.3.5.	PREIZKUŠANJE FOMENTARIOLA Z DIPEPTIDIL-PEPTIDAZO 4 .....	47
4.4.	HPLC REZULTATI .....	47
4.5.	REZULTATI MERITEV LC-MS .....	57
5.	RAZPRAVA.....	59
6.	SKLEP .....	61
7.	LITERATURA .....	62

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1</b> Prikaz sinteze fomentariola.....	4
<b>Slika 2</b> Fomentariol in njegovi derivati: a) fomentariol, b) dehidrofomentariol, c) anhidrofomentariol in d) anhidrodehidrofomentariol.....	5
<b>Slika 3</b> Prikaz delovanja encima DPP IV.....	8
<b>Slika 4</b> Prikaz LC-MS naprave .....	9
<b>Slika 5</b> Aktivnost 100 x, 200 x, 500 x in 1000 x redčenega encima alfa-glukozidaza .....	21
<b>Slika 6</b> Zaviralno delovanje vodnih in etanolnih ekstraktov gob na alfa-glukozidazo.....	22
<b>Slika 7</b> % zaviralnega delovanja posameznih koncentracij vzorcev gob na encim alfa-glukozidaza.....	23
<b>Slika 8</b> Povprečje % zaviralnega delovanja filtratov ter vzorcev 2e, 12e in akarboze v časovnih točkah 30, 60, 90 in 120 minut na encim alfa-glukozidaza.....	24
<b>Slika 9</b> Povprečje % zaviralnega delovanja vzorcev 2e, 12e, 2e(M), 12e(M), 2e(A), 12e(A), 2e(B) in 12e(B) na encim alfa-glukozidaza .....	25
<b>Slika 10</b> Povprečje % zaviralnega delovanja frakcij vzorca 2e(M) na encim alfa-glukozidaza pri prvi koloni.....	26
<b>Slika 11</b> Povprečje % zaviralnega delovanja frakcij vzorca 12e(M) na encim alfa-glukozidaza pri prvi koloni.....	26
<b>Slika 12</b> Povprečje % zaviralnega delovanja frakcij vzorca 2e(M) na encim alfa-glukozidaza pri drugi koloni.....	27
<b>Slika 13</b> Povprečje % zaviralnega delovanja frakcij vzorca 12e(M) na encim alfa-glukozidaza pri drugi koloni.....	27
<b>Slika 14</b> Povprečje % zaviralnega delovanja vzorcev na encim alfa-glukozidaza .....	28
<b>Slika 15</b> Umeritvena premica različnih koncentracij standardov maltoze.....	30
<b>Slika 16</b> % zaviralnega delovanja vodnih in etanolnih vzorcev s koncentracijo 2 mg/mL na encim alfa-amilaza pri 1. meritvi.....	31
<b>Slika 17</b> % zaviralnega delovanja vodnih in etanolnih vzorcev s koncentracijo 2 mg/mL na encim alfa-amilaza pri 2. meritvi.....	32
<b>Slika 18</b> % zaviralnega delovanja vodnih in etanolnih vzorcev s koncentracijo 1,7 mg/mL na encim alfa-amilaza.....	32

<b>Slika 19</b> % zaviralnega delovanja vodnih in etanolnih vzorcev s koncentracijo 1 mg/mL na encim alfa-amilaza.....	33
<b>Slika 20</b> % zaviralnega delovanja vodnih in etanolnih vzorcev s koncentracijo 0,5 mg/mL na encim alfa-amilaza.....	33
<b>Slika 21</b> % zaviralnega delovanja vzorcev: 1v, 8v, 11v, 12v, 13v, 3e, 4e, 5e, 6e in 8e na encim alfa-amilaza.....	34
<b>Slika 22</b> % zaviralnega delovanja vzorca 3e, 4e in 8e na encim alfa-amilaza.....	35
<b>Slika 23</b> % zaviralnega delovanja vzorcev 3e, 4e, 8e, 14v, 15e in 15v na encim alfa-amilaza.....	36
<b>Slika 24</b> % zaviralnega delovanja vzorcev 8e in 8e(V) na encim alfa-amilaza .....	37
<b>Slika 25</b> % zaviralnega delovanja vzorcev 8e, 8e(M), 8e(V) in 8e(B) na encim alfa-amilaza .....	38
<b>Slika 26</b> % zaviralnega delovanja posameznih frakcij vzorca 8e(V) na encim alfa-amilaza .....	39
<b>Slika 27</b> % zaviralnega delovanja etanolnih vzorcev s koncentracijo 1 mg/mL na encim DPP IV.....	40
<b>Slika 28</b> % zaviralnega delovanja etanolnih vzorcev s koncentracijo 1,5 mg/mL na encim DPP IV.....	40
<b>Slika 29</b> % zaviralnega delovanja etanolnih vzorcev s koncentracijo 2 mg/mL na encim DPP IV.....	41
<b>Slika 30</b> % zaviralnega delovanja etanolnih vzorcev 2e in 12e s koncentracijo 2 mg/mL na encim DPP IV .....	41
<b>Slika 31</b> % zaviralnega delovanja vzorcev 2e, 2e(M), 2e(V), 12e, 12e(M) ter 12e(V) na encim DPP IV .....	42
<b>Slika 32</b> % zaviralnega delovanja vzorcev 2e, 2e(M), 12e, 12e(M) in 12e(A) na encim DPP IV.....	43
<b>Slika 33</b> % zaviralnega delovanja vzorcev 2e, 2e(M), 2e(V), 2e(A), 12e, 12e(M), 12e(V) in 12e(A) na encim DPP IV.....	44
<b>Slika 34</b> % zaviralnega delovanja frakcij vzorca 2e(M) na encim DPP IV pri prvi koloni	45
<b>Slika 35</b> % zaviralnega delovanja frakcij vzorca 12e(M) na encim DPP IV pri prvi koloni .....	45



<b>Slika 36</b> % zaviralnega delovanja frakcij vzorca 2e(M) na encim DPP IV pri drugi koloni .....	46
<b>Slika 37</b> % zaviralnega delovanja frakcij vzorca 12e(M) na encim DPP IV pri drugi koloni .....	46
<b>Slika 38</b> % zaviralnega delovanja fomentariola na encim DPP IV .....	47
<b>Slika 39</b> HPLC kromatogram vzorca 2e .....	48
<b>Slika 40</b> HPLC kromatogram združenih frakcij vzorca 2e(M) .....	49
<b>Slika 41</b> Absorpcijski spektri aktivnih frakcij vzorca 2e(M) pri a) $t_R = 7,962$ , b) $t_R = 8,184$ in c) $t_R = 11,918$ .....	50
<b>Slika 42</b> HPLC kromatogram vzorca 12e .....	50
<b>Slika 43</b> Absorpcijski spektri vzorca 12e pri a) $t_R = 4,887$ , b) $t_R = 5,067$ , c) $t_R = 5,903$ , d) $t_R = 6,972$ in e) $t_R = 8,306$ .....	51
<b>Slika 44</b> HPLC kromatogram združenih frakcij vzorca 12e(M) .....	52
<b>Slika 45</b> Absorpcijski spektri združenih frakcij vzorca 12e(M) pri a) $t_R = 4,895$ , b) $t_R = 5,053$ , c) $t_R = 6,382$ , d) $t_R = 8,324$ , e) $t_R = 10,975$ in f) $t_R = 12,387$ .....	53
<b>Slika 46</b> HPLC kromatogram vzorca 8e(V) .....	53
<b>Slika 47</b> Absorpcijski spektri vzorca 8e(V) pri a) $t_R = 1,156$ , b) $t_R = 1,310$ , c) $t_R = 1,659$ in d) $t_R = 22,744$ .....	54
<b>Slika 48</b> HPLC kromatogram 1. frakcije vzorca 8e(V) .....	54
<b>Slika 49</b> Absorpcijski spektri 1. frakcije vzorca 8e(V) pri a) $t_R = 12,383$ , b) $t_R = 19,214$ , c) $t_R = 22,756$ .....	55
<b>Slika 50</b> HPLC kromatogram 13. frakcije vzorca 8e(V) .....	55
<b>Slika 51</b> Absorpcijski spektri 13. frakcije vzorca 8e(V) pri a) $t_R = 1,166$ , b) $t_R = 1,311$ , c) $t_R = 5,912$ , d) $t_R = 11,013$ , e) $t_R = 12,370$ in f) $t_R = 14,070$ .....	56
<b>Slika 52</b> Masni spekter fomentariola (zgoraj) in masni spekter združenih frakcij vzorca 2e(M) .....	57
<b>Slika 53</b> Masni spekter združenih frakcij vzorca 2e(M) .....	58
<b>Slika 54</b> Masni spekter in elementna sestava fomentariola .....	58

## **KAZALO PREGLEDNIC**

<b>Preglednica I</b> Sestava reakcijske mešanice za testiranje izvlečkov gob z alfa-glukozidazo .....	15
<b>Preglednica II</b> Sestava reakcijske mešanice za testiranje izvlečkov gob z alfa-amilazo ...	16
<b>Preglednica III</b> Sestava reakcijske mešanice za testiranje izvlečkov gob z DPP IV .....	17
<b>Preglednica IV</b> Sestava reakcijske mešanice za merjenje aktivnosti encima alfa-amilaza	29
<b>Preglednica V</b> Pregled analiziranih vzorcev s HPLC .....	47

## POVZETEK

Sladkorna bolezen spada v skupino bolezni, ki se epidemično širijo in je zaradi svojih zapletov med glavnimi vzroki smrti po svetu. Porast obolelih je zagotovo odraz sodobnega načina življenja (slabe prehranjevalne navade, pomanjkanje fizičnih aktivnosti), pri sladkorni bolezni tipa 2 pa ima pomemben vpliv tudi dednost. Na trgu obstaja že veliko skupin zdravil za preprečevanje in zdravljenje sladkorne bolezni, ki delujejo na različne tarče. Med njimi so tudi zdravila, ki zavirajo encimsko aktivnost alfa-glukozidaze, alfa-amilaze in dipeptidil-peptidaze 4. Alfa-glukozidaza in alfa-amilaza omogočata razgradnjo ogljikovih hidratov do enostavnih sladkorjev, ki se absorbirajo v krvni obtok. Po zaužitju obroka lahko pride do postprandialne hiperglikemije, ki je pri sladkornih bolnikih tipa 2 neuspešno uravnana na začetku zaradi neodzivnosti celic na inzulin, kasneje pa tudi zaradi pomanjkanja inzulina. Encima predstavljata pomembno tarčo v zdravljenju sladkorne bolezni tipa 2, saj z zaviranjem njunega delovanja preprečimo nenaden porast glukoze v krvi po obroku. Dipeptidil-peptidaza 4 (DPP IV) je encim, ki je posredno udeležen pri uravnavanju sladkorja v krvi. Njegova funkcija je med drugim inaktivacija inkretinov (GLP-1, GIP), ki se v obtok izločita kot odgovor na absorbirana hranila in pomembno prispevata k homeostazi glukoze v krvi. Z zaviranjem delovanja encima DPP IV tako lahko podaljšamo razpolovni čas inkretinov in preprečimo pojav postprandialne hiperglikemije.

V magistrski nalogi smo preiskovali morebitne zaviralne lastnosti izvlečkov lesnih gob na encim alfa-glukozidaza, alfa-amilaza in DPP IV. Izbrali smo 16 lesnih gob in iz njih pripravili etanolne ter vodne izvlečke. Pripravili smo ustrezne koncentracije encimov in substrate za vsak posamezni encim. 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glukopiranozid nam je služil kot substrat za alfa-glukozidazo, škrob kot substrat za alfa-amilazo in Gly-Pro-aminometilkumarin kot substrat za DPP IV. Zaviralne aktivnosti izvlečkov na encim alfa-glukozidaza smo ugotavljali z merjenjem fluorescence, aktivnosti izvlečkov na encim alfa-amilaza z merjenjem absorbance in aktivnosti izvlečkov na encim DPP IV z merjenjem kinetike. Za primerjavo smo kot negativno kontrolo za encim alfa-glukozidaza izbrali akarbozo ter za encim DPP IV sitagliptin. Obe učinkovini zelo uspešno zavirata encimsko aktivnost in predstavljata že uveljavljeno terapijo pri zdravljenju sladkorne bolezni tipa 2. S pomočjo pozitivnih kontrol smo za vsak vzorec izračunali % zaviranja encima. Najbolj aktivne vzorce smo separirali z različnimi metodami (ultrafiltracija, dializa, kolonska kromatografija, HPLC) in ugotovili, da goba *Fomes fomentarius* vsebuje aktivno molekulo fomentariol, ki uspešno inihibira encima alfa-glukozidaza in DPP IV. Fomentariol smo izolirali in ga identificirali s pomočjo metode LC-MS ter kot prvi dokazali njegovo antidiabetično delovanje.

***Ključne besede:*** alfa-glukozidaza, alfa-amilaza, dipeptidil-peptidaza 4, lesne gobe, zaviranje

## ABSTRACT

Diabetes belongs to a group of diseases that are spreading epidemically and, due to their complications, are among the main causes of death worldwide. The increase in the number of patients is certainly a reflection of the modern way of life (poor eating habits, lack of physical activity), and heredity is also important in type 2 diabetes. There are already many groups of medicines on the market for prevention and treatment of diabetes, which act on different targets. They also include medicinal products that inhibit the enzyme activity of alpha-glucosidase, alpha-amylase, and dipeptidyl-peptidase 4. Alpha-glucosidase and alpha-amylase cause carbohydrates to degrade into simple sugars that are absorbed into the bloodstream. This leads to postprandial hyperglycemia, which is in type 2 diabetes mellitus unsuccessfully controlled initially due to the non-responsiveness of the cells to insulin, and subsequently due to lack of insulin. Thus, enzymes represent a major target for the treatment of type 2 diabetes, as their inhibition prevents a sudden increase in blood glucose following a meal. Dipeptidyl-peptidase 4 (DPP IV) is an enzyme which is indirectly involved in the regulation of glycemic control. Its function is, inter alia, inactivation of incretins (GLP-1, GIP), which are excreted into the circulation in response to absorbed nutrients and significantly contribute to blood glucose homeostasis. By inhibiting DPP IV, the half-life of incretins can be prolonged and the occurrence of postprandial hyperglycemia is avoided.

We investigated the possible inhibitory properties of wood mushroom extracts on the alpha-glucosidase, alpha-amylase and DPP IV. We selected 16 mushrooms and prepared ethanol and water extracts from them. Suitable concentrations of enzymes and substrates for each single enzyme were prepared. 4-methyl-aminomethyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside served as a substrate for alpha-glucosidase, starch as a substrate for alpha-amylase and Gly-Pro-aminomethylcoumarin as a substrate for DPP IV. The inhibitory activity of the extracts on the alpha-glucosidase was determined by measuring the fluorescence, the activity of the extracts on the alpha-amylase by measuring the absorbance and activity of the extracts on the DPP IV by kinetics measurement. Acarbose was chosen as the negative control for the alpha-glucosidase, and for the DPP IV sitagliptin. Both active substances successfully inhibit the enzymatic activity and are already well-established treatment of type 2 diabetes. Positive controls for each sample served us for calculation of % of inhibition. The most potent samples were separated by different methods (ultrafiltration, dialysis, column chromatography, HPLC). We found out that the wood mushroom *Fomes fomentarius* contains the active molecule fomentariol which successfully inhibits alpha-glucosidase and DPP IV enzyme. Fomentariol was then isolated and identified by the LC-MS method. We were the first who have proven its antidiabetic activity.

**Key words:** alpha-glucosidase, alpha-amylase, dipeptidyl-peptidase 4, wood mushrooms, inhibition

## SEZNAM OKRAJŠAV

A - absorbanca

DMSO - dimetil sulfoksid

DPP IV - dipeptidil-peptidaza 4

DTT - ditiotreitol

E - encim

EDTA - etilendiamintetraocetna kislina

GIP - od glukoze odvisni inzulinotropni polipeptid

GLP-1 - glukagonu podoben peptid

GP-AMC - Gly-Pro-aminometilkumarin

I - zaviralec

MUG - 4-metilumbeliferon- $\alpha$ -D-glukopiranozid

S - substrat

SF - stacionarna faza

TRIS - tris(hidroksimetil)aminometan

ESI – ionizacija z razprševanjem raztopin v električnem polju (electrospray ionisation)

TOF - analizator na osnovi časa preleta (time of flight)

dH<sub>2</sub>O – demineralizirana voda

# 1. UVOD

## 1.1. SLADKORNA BOLEZEN

Sladkorna bolezen (diabetes mellitus) predstavlja skupino bolezni za katere so značilni kronična hiperglikemija (kronično povišanje glukoze v krvi) in ostali zapleti zaradi metabolnih motenj, ki nastanejo ob pomanjkanju učinkov inzulina. V klinični praksi sladkorno bolezen opredeljujemo kot koncentracijo glukoze v krvi na tešče nad 7,0 mmol/L oziroma nad 11,1 mmol/L, merjeno kadarkoli [1]. Poleg merjenja koncentracije glukoze v krvi nam pri postavljanju diagnoze pomaga tudi določanje glikiranega hemoglobina HbA<sub>1c</sub>, ki nam pokaže povprečno raven glukoze v telesu v zadnjih nekaj mesecih [2].

Poznamo akutne in kronične zaplete sladkorne bolezni. Med akutne zaplete spadata diabetična ketoacidoza pri sladkorni bolezni tipa 1 in diabetični aketotični hiperosmolarni sindrom pri sladkorni bolezni tipa 2. Oba zapleta predstavljata življenje ogrožajoči stanji presnovne iztirjenosti, ki lahko vodita v smrt, če nista ustrezno in pravočasno zdravljeni. Glavno težavo sladkornih bolnikov predstavljajo kronični zapleti, ki povzročajo okvare v organizmu. Med te spadajo makroangiopatije (napredujoča ateroskleroza), mikroangiopatije (retinopatije in nefropatije), diabetične nevropatije in okvare drugih organov [1].

Vzroki za pomanjkanje delovanja inzulina so različni in jih zaznamo na vseh nivojih organizacije delovanja inzulina, od signaliziranja  $\beta$  celic v Langerhansovih otočkih trebušne slinavke, potovanja inzulina po krvnem obtoku, proženja učinkov v jetrnih in drugih tarčnih celicah, do odstranjevanja inzulina iz obtoka [1].

Sladkorno bolezen lahko razdelimo na tri glavne skupine:

- sladkorna bolezen tipa 1, do katere pride zaradi avtoimunega uničenja  $\beta$  celic Langerhansovih otočkov in po navadi privede do absolutne odsotnosti inzulina,
- sladkorna bolezen tipa 2, kjer pride najprej do inzulinske rezistence nato pa postopoma tudi do zmanjšane izločanja inzulina iz  $\beta$  celic,
- nosečnostna sladkorna bolezen ali gestacijski diabetes, ki se lahko pojavi v drugem ali tretjem trimesečju nosečnosti [2].

Sladkorna bolezen tipa 1 in 2 sta heterogeni bolezni, ki se zdravita z različnimi pristopi, zato je ob začetku postavljanja diagnoze pomembno določiti tip sladkorne bolezni. Paradigma, da se sladkorna bolezen tipa 1 pojavlja samo pri otrocih in sladkorna bolezen tipa 2 samo pri odraslih, dandanes ne velja več. Simptomi sladkorne bolezni tipa 1 so največkrat poliurija in polidipsija, medtem, ko imajo odrasli pogosto različne simptome [2].



### 1.1.1. SLADKORNA BOLEZEN TIPA 2

Sladkorno bolezen tipa 2 lahko imenujemo tudi od inzulina neodvisna sladkorna bolezen, saj pri večini bolnikov ne gre za okvarjeno izločanje inzulina, temveč za neodzivnost tarčnih celic na učinke inzulina [1]. Inzulinska rezistenca, ki je po navadi prisotna pred začetkom sladkorne bolezni, je lahko posledica številnih dejavnikov: genetika, starost, debelost [3]. Kljub temu se veliko bolnikov zdravi z inzulinom z namenom upočasnjevanja kroničnih zapletov. Za bolnike, pri katerih pride sčasoma tudi do nezmožnosti celic  $\beta$  za izločanje inzulina, je tako kot pri sladkorni bolezni tipa 1 vsakodnevna aplikacija inzulina življenjskega pomena [1]. Med peroralna antidiabetična zdravila spadajo skupine zdravil z različnimi tarčami: zaviralci alfa-glukozidaze, ki zavirajo razgradnjo in posledično absorpcijo ogljikovih hidratov v črevesju, bigvanidi in glitazoni, ki povečajo senzibilnost celic za inzulin ter sulfonilsečnine in glitinidi, ki povečajo izločanje pankreasnega inzulina [3].

80 – 90 % bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 2 ima presnovni sindrom, kar pomeni, da imajo poleg sladkorne bolezni tudi hipertenzijo, hipertrigliceridemijo, zvišano koncentracijo LDL in znižano koncentracijo HDL. V Sloveniji ima po raziskavi Inštituta za varovanje zdravja iz leta 2007 sladkorno bolezen 6,9 % prebivalstva, od tega ima 80 - 90 % bolnikov sladkorno bolezen tipa 2. Ocenjujejo, da naj bi bilo na Svetu okoli 200 milijonov bolnikov s sladkorno boleznijo tipa 2, število bolnikov pa narašča predvsem v razvitem svetu [1].

## 1.2. GOBE

Gobe spadajo v kraljestvo gliv. Med poznanimi vrstami gliv je približno 20.000 gob, od tega je 2.000 užitnih. Gobe so evkariontski heterotrofni organizmi, kar pomeni, da za rast potrebujejo organske snovi v nasprotju z avtotrofi, ki hranilne snovi dobijo s fotosintezo. Celice obdaja celična stena, skozi katero prehajajo hranilne snovi v topni obliki [4].

Gobe so glive, ki tvorijo vidno nadzemno ali podzemno plodišče in jih lahko naberejo. V plodiščih se razvijejo in sproščajo spore, ki so pomembne za razmnoževanje gliv. Poznamo prostotrosnice (*Basidiomycetes*) in zaprtotrosnice (*Ascomycetes*). Razmnožujejo se na spolni in nespolni način [5].

Številni metaboliti (fenoli, triterpenoidi in drugi) nastanejo kot posledica okoljskega stresa glive v njenem naravnem okolju. Proizvodnjo nekaterih metabolitov so že povezali z morebitno vlogo pri obrambi glive pred antagonističnimi mikroorganizmi. Z laboratorijskimi eksperimenti so dokazali, da pomanjkanje stresnih dejavnikov rezultira v manjši proizvodnji metabolitov [6].

Glive delimo na gniloživke (saprofite), zajedalke (parazite) in soživke (simbionte) [5].

### **1.2.1. GNILOŽIVKE**

Gniložive gobe so odgovorne za razgradnjo kompleksnih organskih snovi (listni odpad, odmrli les, itd ) in so tako glavna skupina recikliranja v naravi. Slednje jim omogoča njihova oblika rasti ter hidrolizni in oksidoreduktivni encimi, ki povzročijo gnitje in razpad celuloze in lignina [5]. V naravi je v primerjavi s simbioznimi glivami malo saprofitnih gliv, ki so uporabne, so pa številne saprofitne glive cenjene zaradi svojih zdravilnih lastnosti [7].

### **1.2.2. ZAJEDALKE**

Zajedalske gobe razgrajujejo les rastočih dreves in povzročajo trohnenje debel, kar lahko vodi tudi do propada drevesa. To lahko predstavlja ogromno ekološko in ekonomsko težavo v gozdarstvu. Večina zajedalk lahko raste tudi na odmrlem lesu kot fakultativne zajedalke [5].

### **1.2.3. SOŽIVKE**

Soživke predstavljajo največjo skupino gob. Živijo v sožitju z rastlinami, kar imenujemo mikoriza. Gre za zavezništvo med glivnim micelijem in rastlinskimi koreninami, kjer gliva rastlini omogoči intenzivnejše sprejemanje hranil in mineralov iz tal, saj poveča površino njenih korenin, rastlina pa glivo v zameno preskrbuje z ogljikovimi hidrati, vitamini in rastnimi dejavniki. Mikoriza omogoča pospešeno rast in razvoj tako rastline kot glive [5].

## **1.3. LESNE GOBE**

Lesne gobe so raznolika skupina gliv, ki se hrani z lesom kot organsko snovjo. S tem povzročajo razpadanje lesa ali trohnenje, ne pa gnitja. Ko je les vlažen in je ustrezna temperatura ozračja, vznikne iz trosov podgobje, ki prodre v notranjost in s pomočjo svojih ekstracelularnih encimov razkrajja lesne komponente ter absorbira organske snovi. Če gliva razkrajja predvsem lignin, se les obarva belo (bela trohnoba), če pa gliva z encimi razkrajja predvsem celulozo, se les zaradi presežka lignina obarva rjavo (rjava trohnoba). Zaradi trohnobe se poslabšajo mehanske lastnosti lesa, ki se v zadnji fazi spremeni v prah [8].

### **1.3.1. KRESILNA GOBA ALI BUKOVA KRESILKA (*FOMES FOMENTARIUS*)**

Kresilno gobo ali bukovo kresilko najdemo tako na živih poškodovanih drevesih kot tudi na posekanem drevju in je ena pogostejših lesnih gliv v naših mešanih gozdovih. Drevesa okuži tako, da s svojimi miceliji prodre skozi poškodovane dele drevesa do stržena. Od tam se trohnoba širi proti periferiji. Na lesu lahko povzroča belo trohnobo, če pa les okuži več vrst gliv, nastane neenakomerna trohnoba imenovana piravost. Glive se lahko dopolnjujejo pri

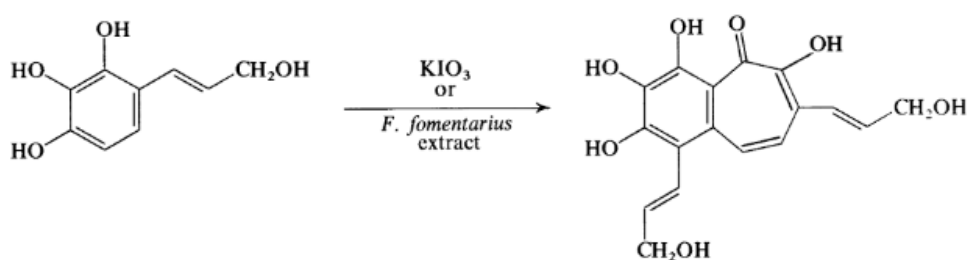
razgradnji lesa, zato je razkroj intenzivnejši. Če pa delujejo antagonistično, do razkroja lesa ne pride [9].

Za kresilno gobo so značilni veliki kopasti trosnjaki. Na začetku rasti je klobuk gobe mehak in svetlo rjave do sivkaste barve, v roku enega leta pa površina postane trda, siva in se naguba. Trosovnica je luknjičasta, v starosti je okrasta ali celo potemni. Meso gobe je trdo in zateglo. Klobuki rastejo več let in lahko dosežejo velikost 40 cm [9].

Kresilno gobo so stoletja dolgo uporabljali za netenje in vzdrževanje ognja ter kot kadilo v religioznih obredih, od koder izhaja tudi njeno ime. Dim kresilne gobe ima prijeten vonj in deluje pomirjevalno. Položena na rano naj bi zaustavljala krvavitve in celila rane [9]. S farmakološkimi in kliničnimi študijami so že dokazali, da kresilna goba deluje protitumorno ter protibakterijsko in protiparazitsko [4]. Z nedavno študijo, kjer so preučevali polisaharid MFKF-API $\beta$  izoliran iz gobe *Fomes fomentarius*, so uspeli dokazati, da omenjeni polisaharid inducira celično smrt rakavih celic v odvisnosti od odmerka, kot tudi apoptozo [10]. Prav tako so z eksperimenti na miših dokazali, da ekstrakt parazitne glive *Fomes fomentarius* zniža nivo glukoze v krvi za 31,35 % in nivo holesterola za 5,23 % [11].

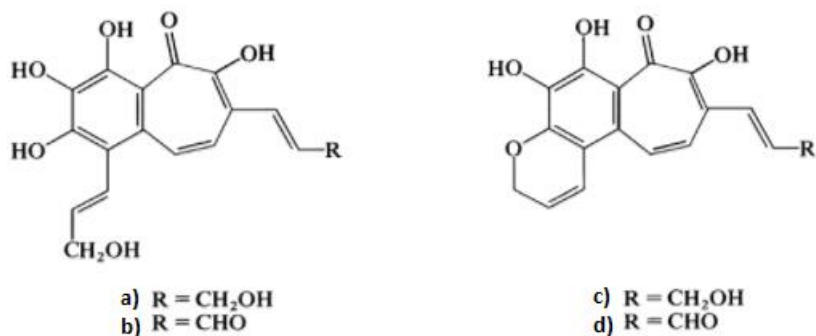
#### 1.3.1.1. FOMENTARIOL

Fomentariol je rjavo-rdeč derivat purpurogalina. Nahaja se v trdi skorji kresilne gobe in ji daje rjavo-rdečo barvo [12]. Odgovoren je za intenzivno krvavo rdečo barvo, ki nastane pri stiku fomentariola z bazo. Fomentariol se sintetizira s pomočjo oksidacije dveh molekul 2,3,4-trihidroksicinamil alkohola, kjer nastane purpurogalin iz pirogalola. Oksidacija alkohola je bila dosežena tudi v *in vitro* pogojih, ki so jo dosegli z oksidantom KIO<sub>3</sub> (kalijev jodat) (Slika 1) [13].



Slika 1 Prikaz sinteze fomentariola

Pri oksidaciji fomentariola nastane dehidrofomentariol, ki skupaj s piranskimi derivati anhidrofomentariola in anhidrodehidrofomentariola tvori glavne sestavine kresilne gobe (Slika 2) [13].



**Slika 2** Fomentariol in njegovi derivati: a) fomentariol, b) dehidrofomentariol, c) anhidrofomentariol in d) anhidrodehidrofomentariol

### 1.3.2. DIŠEČA TRAMOVKA (*GLEOPHYLLUM ODORATUM*)

Dišečo tramovko ali smrekov dišavnik najpogosteje najdemo na čelih smrekovih štorov. Povzročajo značilno rjavo trohnobo na iglavcih. Večinoma okuži oslABLJENA, stoječa, ranjena smrekova drevesa. Z razkrojem štorov pripomore k hitrejšemu kroženju ogljika in nastanku humusa.

Klobuki dišeče tramovke rastejo več let, so blazinaste ali nepravilne konzolaste oblike z zlato rumenim robom. Starejši deli trosnjaka so temno rjavi do črni, brazde jih delijo v široke pasove. Površina klobukov je nepravilne oblike, grobo žametasta in z različnimi izrastki. Plodišče je zelo trdno priraščeno na podlago, zato je gobo težko odtrgati. Meso je neužitno, žilavo, rjavo, plutasto in prijetno dišeče po janežu, vaniliji, komarčku in pomarančah.

Dišeča tramovka se v tradicionalni medicini ne uporablja, kljub temu, da ima nekatere zdravilne učinke. Iz plodišč so izolirali triterpene, ki zmanjšujejo verjetnost tromboze. Izločeni mikosteroli imajo sposobnost zaviranja nekaterih rakavih celičnih linij. Identificirali so tudi 16 aromatičnih sestavin, ki so potencialno uporabne v kozmetični industriji. Citronelol, metabolit glive, se že dodaja pri izdelavi parfumov [14].

## 1.4. ALFA-GLUKOZIDAZA

Encim alfa-glukozidaza spada v skupino hidrolaz. Nahaja se v epiteliju tankega črevesa, ki je prekrit z mikrovili [15]. Alfa-glukozidaza katalizira hidrolizo terminalnih, nereducirajočih D-glukoznih ostankov različnih substratov: disaharidov, oligosaharidov in drugih aril- in alkil- $\alpha$ -glukopiranozidov. Je končni encim vključen v presnovo škroba in drugih ogljikovih hidratov do glukoze, ki se nato absorbira v krvni obtok [16].

Alfa-glukozidaza pri sladkorni bolezni tipa 2 predstavlja pomembno terapevtsko tarčo, saj lahko z zaviranjem encima vplivamo na nivo absorbiranega sladkorja [17]. Sladkorno bolezen tipa 2 zdravimo z različnimi skupinami zdravil (bigvanidi, sulfoniluree, tiazolidindioni, zaviralci alfa-glukozidaze), ki predstavljajo peroralne antidiabetike [15]. Učinkoviti zaviralci alfa-glukozidaze lahko na ta način omejijo presnovo ogljikovih hidratov in z zakasnjeno absorpcijo ogljikovih hidratov zmanjšajo verjetnost pojava postprandialne hiperglikemije [17]. Zdravljenje z zaviralci alfa-glukozidaze je smotno v fazi prediabetesa (mejna bazalna glikemija in motena toleranca za glukozo) [15]. Predstavniki zaviralcev encima so akarboza, miglitol in vogliboza, ki se že uporabljajo v klinični praksi zdravljenja sladkorne bolezni tipa 2, vendar je zaradi neželenih učinkov (driska, napenjanje, abdominalna bolečina) njihova komplanca slaba. Zato je toliko večja težnja po iskanju novih zaviralcev alfa-glukozidaze z manj neželenih učinkov. Tako rastline kot tudi gobe predstavljajo pester vir različnih spojin s potencialnimi zaviralnimi učinki na encime. Pri preskušanju spojin so že ugotovili zaviralno delovanje nekaterih naravnih spojin na encim alfa-glukozidaza [17].

## **1.5. ALFA-AMILAZA**

Encim alfa-amilaza je eden največjih sekretornih produktov trebušne slinavke (približno 5 – 6 %) in žlez slinavk. V svoji strukturi vsebuje kalcij kot alosterični modulator. Sestavljena je iz 512 aminokislin v oligosaharidni verigi z molekulsko maso 57,6 kDa [18]. Encimsko delovanje alfa-amilaze je najbolj optimalno v območju pH 6,7 – 7,2, aktivna pa je v širokem območju pH 3,8 – 9,4. Je termostabilna, tudi pri temperaturi 50 °C. Bromidni, kloridni in jodidni ioni aktivirajo njeno delovanje, oksalatni, citratni fluoridni ioni in skoraj vsi antikoagulantni (razen heparina) pa jo zavirajo [19].

Alfa-amilaza spada v skupino hidrolaz in ima pomembno vlogo pri prebavi škroba in glikogena. Nahaja se v mikroorganizmih, rastlinah in višjih organizmih, kjer katalizira začetno hidrolizo škroba do krajših oligosaharidov preko cepitve alfa-D-(1,4)-glikozidne vezi. Končni produkti alfa-amilaze so oligosaharidi različnih dolžin in dekstrini, ki jih sestavljajo disaharid maltoza, trisaharid maltotrioza in razvejani oligosaharidi s 6 – 8 glukoznimi enotami z alfa-(1,4) in alfa-(1,6) vezmi [18].

Rastline uporabljajo zaviralce alfa-amilaze kot obrambni mehanizem za zaščito pred žuželkami. Ti zaviralci spreminjajo aktivnosti alfa-amilaz in proteaz v črevesju žuželk in zavirajo njihovo normalno presnovo. Zato imajo zaviralci alfa-amilaze potencialno vlogo pri uravnavanju ravni sladkorja v krvi in pri zaščiti rastlin [20].

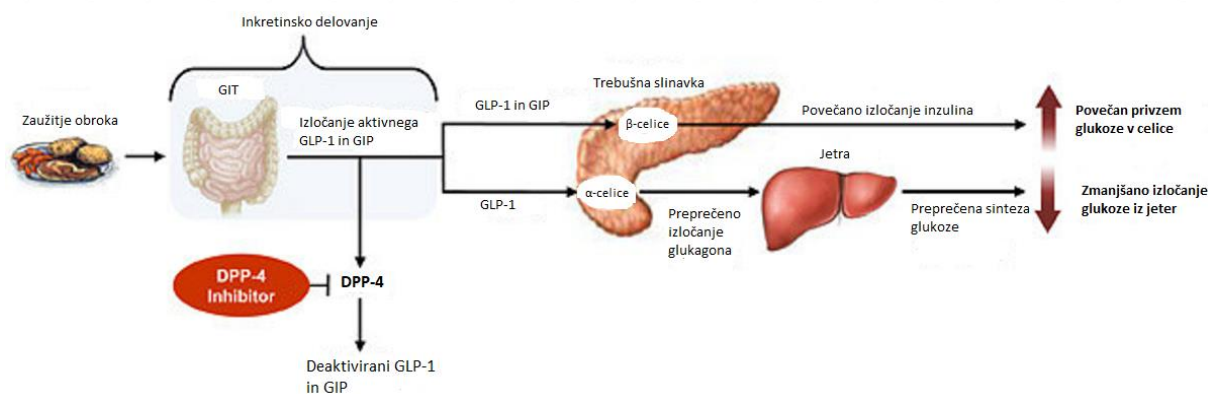
V terapiji sladkorne bolezni tipa 2 imajo pomembno vlogo zaviralci alfa-amilaze, ki zmanjšajo učinek postprandialne hiperglikemije (manj absorbirane glukoze) in s tem pojav

neželenih dogodkov. Pomemben vir zaviralcev predstavljajo rastline z raznovrstnimi spojinami, ki imajo potencialni terapevtski učinek in imajo pomembno vlogo predvsem v državah v razvoju, kjer je omejen dostop do konvencionalnih zdravil [21]. O naravnih zaviralcih so poročali že različni avtorji, najboljše zaviranje so pokazali flavonoidi, peptidoglikani, terpenoidi, polisaharidi, steroidi in gvanidini [18].

## **1.6. DIPEPTIDIL-PEPTIDAZA 4**

Encim dipeptidil-peptidaza 4 (CD26) je 240 kDa velik membranski glikoprotein in spada v skupino serinskih peptidaz [22]. DPP IV je antigenski encim in je visoko specifičen - katalizira cepitev dipeptidnih vezi med X-Pro ali X-Ala (kjer je X katera koli aminokislina) na N-terminalnem koncu peptida. Funkcije encima so prenašanje signalov, imunska regulacija ter regulacija apoptoze in zato pokriva površine skoraj vseh vrst celic [23]. Nahaja se v ledvicah, jetrih, črevesju, vranici, adrenalnih žlezah, limfocitih, endotelijskih celicah, krvnem obtoku in placenti. Glavni biološki substrati encima so inkretini (glukagonu podoben peptid (GLP-1), od glukoze odvisni inzulinotropni polipeptid (GIP)), inzulinu podoben rastni faktor-1 (IGF-1), peptid YY, substanca P, neuropeptid Y, pankreatični polipeptid ter različni kemokini. Tako je razvidno, da je encim DPP IV vključen tudi v regulacijo drugih homeostatskih mehanizmov, kot je nevrogeno vnetje, krvni pritisk in imunski sistem [22].

Inkretinski hormoni (GLP-1 in GIP) so del endogenega sistema za fiziološko uravnavanje homeostaze glukoze. L- in K-celice črevesne mukoze v krvni obtok izločajo GLP-1 in GIP ob prisotnosti absorbiranih hranil. Aktivna inkretina pospešita sintezo in izločanje inzulina iz  $\beta$ -celic Langerhansovih otočkov trebušne slinavke kot odgovor na porast glukoze v krvi, zmanjšata izločanje glukagona iz  $\alpha$ -celic trebušne slinavke, zmanjšata občutek lakote in upočasnita praznjenje želodca. Približno 60 % izločenega postprandialnega inzulina je rezultat delovanja GLP-1 in GIP. Razpolovni čas GLP-1 je 1 – 2 minuti, razpolovni čas GIP pa 7 minut, saj ju v obtoku zelo hitro inaktivira DPP IV s proteolitsko cepitvijo dipeptidne vezi na N-terminalnem koncu peptidne verige. Zaradi svojih učinkov na inkretine (GLP-1 in GIP) je DPP IV tarča številnih kliničnih raziskav in zaviralci encima so del terapije sladkorne bolezni tipa 2. Na trgu je že veliko število zaviralcev DPP IV kot so sitagliptin, vildagliptin, saxagliptin. Zaviralci DPP IV so dobro tolerirani in omogočajo boljše ter dolgoročneje urejeno glikemijo (brez hipoglikemij) kot ostala konvencionalna zdravila za sladkorno bolezen tipa 2 [22].



**Slika 3** Prikaz delovanja encima DPP IV

## 1.7. KROMATOGRFSKE METODE

Kromatografske metode spadajo med separacijske metode, ki temeljijo na ločitvi posameznih komponent vzorca, ki jih nato zaznamo z različnimi detektorji. So široko uporabne in zelo učinkovite. Ko molekule potujejo vzdolž kolone, stalno prehajajo med mobilno in stacionarno fazo [24]. Pri kromatografiji ločujemo komponente na osnovi njihove molekulske mase, hidrofилnosti, lipofilnosti, oblike in afinitete do drugih substanc. Kromatografske metode so procesi izolacije in čiščenja produktov in običajno vključujejo vsaj dva ali tri kromatografske korake. S pomočjo kromatografskih metod lahko biološke učinkovine (proteine) izoliramo iz kompleksnih tekočin (gojišča, bakterijske fermentacijske brozge) in živalskih ali rastlinskih ekstraktov. Poznamo več vrst kromatografij glede na obliko interakcij med stacionarno fazo in komponentami vzorca: adsorpcijska kromatografija, porazdelitvena kromatografija, ionsko izmenjevalna kromatografija, gelska izključitvena kromatografija in afinitetna kromatografija [25].

### 1.7.1. KOLONSKA KROMATOGRAFIJA

Kolonska kromatografija je metoda, katere del je stacionarna faza, ki se nahaja v ozkih kolonah in skozi katero zaradi gravitacije ali tlaka potuje mobilna faza. Ločimo tri osnovne skupine kolonske kromatografije glede na vrsto mobilne faze: tekočinska kromatografija, plinska kromatografija in kromatografija superkritičnih plinov [25].

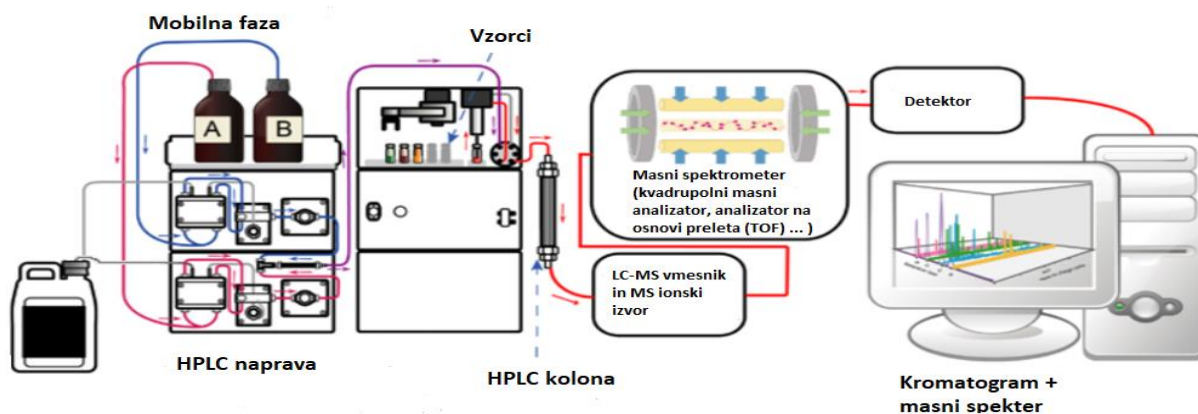
Potek ločitve vzorca poteka tako, da v kolono nanese vzorec in mobilno fazo. Potovanje vzorca in mobilne faze skozi kolono imenujemo elucija. V tej fazi pride do ločitve komponent zaradi različnega porazdeljevanja komponent med stacionarno in mobilno fazo – najprej se eluirajo komponente z manjšo afiniteto do stacionarne faze in kasneje komponente z večjo afiniteto [25].

## 1.7.2. HPLC

HPLC oziroma tekočinska kromatografija visoke ločljivosti predstavlja glavno tehniko za analizo in čiščenje širokega spektra molekul. Predvsem se uporablja za karakterizacijo in izolacijo peptidov, ki jih lahko ločujemo na osnovi adsorpcije, ionske izmenjave, porazdelitve, biološke afinitete in velikosti molekul. Vsi biološki procesi so odvisni od specifičnih interakcij med molekulami in afinitetna kromatografija izkorišča te specifične interakcije, ki omogočajo čiščenje vzorca. V nasprotju pa z reverzno fazno HPLC kromatografijo, ionsko izmenjevalno kromatografijo in kromatografijo na osnovi hidrofobnih interakcij ločujemo peptide in beljakovine na podlagi razlik v hidrofobnosti ali v površinskem naboju [26].

## 1.8. LC-MS

LC-MS je metoda, ki s pomočjo tekočinske kromatografije (LC) omogoča separacijo komponent vzorca, masna spektrometrija (MS) pa omogoča identifikacijo posameznih komponent v vzorcu na osnovi molekulske mase. Metodi delujeta sinergistično, zato je ta kombinirana metoda zelo priljubljena pri kemijskih analiznih postopkih [27]. Masna spektrometrija je glavna metoda za analiziranje kompleksnih proteinski zmesi. S pomočjo masnega spektrometra pride do ločitve ionov vzorca glede na njihovo razmerje mase in naboja ( $m/z$ ) v plinski fazi. Ioni se lahko ločijo v homogenem magnetnem polju ali na druge načine (visokofrekvenčna električna polja, ločitev na osnovi časa preleta ionov (TOF), itd.). Glavni deli masnega spektrometra so ionizator, kjer nastanejo ioni, analizator, kjer se ioni ločijo na osnovi mase in naboja ter detektor, ki pri vsaki posamezni  $m/z$  izmeri ionski tok. Rezultat meritve je masni spekter, iz katerega lahko določimo molekulsko maso in sestavo vzorca [28].



Slika 4 Prikaz LC-MS naprave



## 2. NAMEN MAGISTRSKEGA DELA

Namen raziskovalnega magistrskega dela je ugotoviti morebitne zaviralne lastnosti 16 vzorcev lesnih gob na encime, ki so vključeni v presnovo ogljikovih hidratov. Alfa-glukozidaza in alfa-amilaza imata neposredno vlogo pri uravnavanju nivoja sladkorja v krvi, saj s cepitvijo vezi zaužitih ogljikovih hidratov omogočata absorpcijo enostavnih sladkorjev v krvni obtok. DPP IV z deaktivacijo inkretinov posredno vpliva na homeostazo sladkorja v krvi tako, da skrajša razpolovni čas GLP-1 in GIP. Vsi trije encimi predstavljajo pomembno tarčo pri zdravljenju sladkorne bolezni tipa 2.

Gobe so zaradi raznolikega metabolizma pešter vir različnih spojin (terpeni, polisaharidi, steroli, lecitini, proteini), ki predstavljajo nove možnosti zdravljenja najrazličnejših bolezni, tudi sladkorne bolezni tipa 2. Mnogim spojinam v gobah so s kliničnimi preiskavami že dokazali protibakterijsko in protitumorno delovanje, nekatere prav tako znižujejo krvni tlak in koncentracijo maščob v krvi ter krepijo imunski sistem. S pomočjo merjenja fluorescence, absorbance in kinetike bomo preverili zaviralne lastnosti izbranih 16 lesnih gob na prebavne encime alfa-glukozidaza, alfa-amilaza in DPP IV, ki bi s svojimi učinkovinami lahko prispevale k novim možnostim zdravljenja sladkorne bolezni tipa 2. Iz lesnih gob bomo pripravili vodne in etanolne izvlečke, ki jih bomo z različnimi postopki separirali na osnovi velikosti delcev (ultrafiltracija, dializa) in s pomočjo kromatografskih metod (kolonska kromatografija, HPLC). Na vsaki stopnji čiščenja bomo izračunali % zaviranja encima. Za primerjavo bomo akarbozo uporabili kot negativno kontrolo za encim alfa-glukozidaza ter sitagliptin kot negativno kontrolo za encim DPP IV. Za identifikacijo aktivnih spojin v vzorcih bomo uporabili metodo LC-MS.

## 3. MATERIALI IN METODE

### 3.1. MATERIALI

#### 3.1.1. BIOLOŠKI MATERIAL

Ekstrakt podganjega črevesa - Intestinal acetone powder from rat (I1630 Sigma)

Alfa-amilaza – Alpha-amylase from porcine pancreas (Sigma, kat. št. 647-015-00-4)

#### 3.1.2. KEMIKALIJE

DL-Ditiotreitol (DTT) (Sigma, kat. št. 3483-12-3)

Etilendiamintetraocetna kislina (EDTA) (Sigma, kat. št. 6318-92-6)

Triton X 100 (Sigma, kat. št. 9002-93-1)

Amonijev sulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Sigma, kat. št. 7783-20-2)

Prečiščena voda

0,05 M fosfatni pufer s pH 6,8

0,1 M fosfatni pufer s 5 mM EDTA in 1 mM DTT s pH 7,0

0,1 M fosfatni pufer s pH 7,0

PEG 400 (Sigma, kat. št. 25322-68-3) – polietilenglikol z molsko maso 400 g/mol

Dimetilsulfoksid (DMSO) (Sigma, kat. št. 67-68-5)

0,2 M natrijev karbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

Substrat 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glukopiranozid (M9766 Sigma, kat. št. 17833-43-1)

Akarboza (Sigma Aldrich), osnovna raztopina 50 mM (Sigma, kat. št. 56180-94-0)

Dipeptidil-peptidaza 4 (DPP IV) (Abnova, kat. št. P3467)

Tris(hidroksimetil)aminometan (Sigma, kat. št. 77-86-1)

Substrat Gly-Pro-aminometilkumarin (GP-AMC) (Sigma, kat. št. 115035-46-6)

1 M klorovodikova kislina (HCl) (Sigma, kat. št. 7647-01-0)

Sitagliptin (Sigma, kat. št. 654671-77-9)

Metanol (Sigma, kat. št. 67-56-1)

20 mM pufer A (natrijev fosfat ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) (Sigma, kat. št. 7601-54-9) in natrijev klorid ( $\text{NaCl}$ ) (Sigma, kat. št. 7647-598-3) s pH 6,9

Substrat škrob (Sigma, kat. št. 9005-25-8)

Kalijev natrijev tartrat tetrahidrat ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma, kat. št. 6381-59-5)

2 M natrijev hidroksid ( $\text{NaOH}$ )

3,5-dinitrosalicilna kislina (Sigma, kat. št. 609-99-4)

Maltoza monohidrat (Sigma, kat. št. 6363-53-7)

Stacionarna faza Dow-styrene

Stacionarna faza Diaion HP-20

### **3.1.3. LABORATORIJSKA OPREMA**

Multikanalna pipeta BioHit 8 x 10  $\mu\text{L}$

Pipete BioHit, več vrst

Epruveta za ultrafiltracijo (Amicon 3000 MWCO)

Čaše več vrst ter druga steklovina

Magnetno mešalo

Kadička za multikanalno pipeto

Vibromix 104 EV

Centrifuga z manjšo zmogljivostjo: Eppendorf Centrifuge 5804 R

Centrifuga z višjo zmogljivostjo: ThermoScientific Sorvall WX Ultra Series Centrifuge WX Ultra 100 Semlab

Ročna centrifugirka IKA mini G

Računalniški program za merjenje fluorescence, absorbance in kinetike Magellan

UZ kadička Iskra pio d.o.o. Sonis 3

Hladilnik Gorenje (4 °C – 8 °C)

Hladilnik Alpfrigo (5 °C)

Zamrzovalnik Gorenje (- 20 °C)

pH meter s stekleno elektrodo – 691 pH Meter Metrohm

Tehtnica Exacta 610 EB

Analizna tehtnica Kern ALS 120-4

Termostat WTB Binder (37 °C)

Mikrotitrne ploščice 96 TPP prozorne

Mikrotitrne ploščice 96 Nunclon™ Delta Surface črne

PCR ploščica

Applied Biosystems, GeneAmp®, PCR System 2700

Büchi Rotavapor R-114

Büchi Waterbath B-480

Büchi Vac® V-500

WTB Binder

Thermo Scientific dializna kasetna Slide-a-lyzer® Dialysis Casette 2000 D

Thermo Scientific dializna kasetna Slide-a-lyzer® Dialysis Casette 10000 D

Kolona za kolonsko kromatografijo

Epice različnih volumnov

## **3.2. METODE**

### **3.2.1. PRIPRAVA EKSTRAKTOV**

Pripravili smo vodne in etanolne ekstrakte 16 vzorcev lesnih gob:

1. Prava štorovka ali sivorumena mraznica (*Armillariella mellea*)
2. Kresilna goba ali bukova kresilka (*Fomes fomentarius*)
3. Pisana ploskocevka (*Trametes versicolor*)

4. Kosmata ploskocevka (*Trametes hirsute*)
5. Smrekova obrobljenka (*Fomitopsis pinicola*)
6. Brezova goba (*Piptoporus betulinus*)
7. Podvihana livka (*Clitocybe inversa*)
8. Osmojena bjerkandera (*Bjerkandera adusta*)
9. Rjavordeča žveplenjača (*Hypholoma capnoides*)
10. Užitna sirovka (*Lactarius deliciosus*)
11. Sluzasta širokolistka (*Oudemansiella mucida*)
12. Dišeča tramovka (*Gleophyllum odoratum*)
13. Prosojna črnika (*Psathyrells hydrophila*)
14. Gojeni ostrigar (*Pleurotus sp.*)
15. Žitki luskinar (*Pholiota nameko*)
16. Šitaki ali japonska nazobčenka (*Lentinula edodes*)

Natehtali smo 1 g vsakega vzorca lesnih gob in jih namočili v 15 mL vode oziroma 15 mL etanola. Vzorce smo nato homogenizirali in čez noč pustili na stresalniku. Naslednji dan smo vzorce centrifugirali 15 minut na 15.000 obr/min pri temperaturi 22 °C. Supernatant smo odpipetirali v epice in jih še enkrat centrifugirali 30 minut na 15.000 obr/min pri temperaturi 22 °C. Supernatant smo zatem odpipetirali v čisto epico, usedlino pa zavrgli.

Vodne vzorce smo liofilizirali v čašah čez noč in jih natehtali v epice po 2 mg, nato smo jih zamrznili. Etanolne vzorce smo rotavapirali in preostanek odpipetirali v epico ter jih pustili odprte, da so se do konca posušili v digestoriju (2 dneva), nato smo jih zamrznili. Vodne vzorce smo za meritve pripravili tako, da smo v vsako epico dodali 1 mL demineralizirane vode in dobili vzorce s koncentracijo 2 mg/mL. Etanolnim vzorcem pa smo dodali toliko demineralizirane vode in DMSO (v razmerju demineralizirana voda : DMSO = 3:1), da smo prav tako dobili vzorce s koncentracijo 2 mg/mL.

### **3.2.2. TEST EKSTRAKTOV**

Pripravljenim vodnim in etanolnim vzorcem smo merili zaviralne lastnosti na treh encimih. Aktivnost alfa-glukozidaze po dodatku zaviralcev smo določali s pomočjo merjenja fluorescence, aktivnost alfa-amilaze smo določali s pomočjo merjenja absorbance, aktivnost DPP IV pa s pomočjo merjenja kinetike. Vse meritve smo opravili s pomočjo programa Magellan in opremo Tecan Safire II. Z najbolj obetavnimi vzorci gob smo ponovili meritve in jih z različnimi pristopi ločevali, jih očistili in jim določili strukturo.

#### **3.2.2.1. MERJENJE AKTIVNOSTI ALFA-GLUKOZIDAZE**

Meritve smo opravili po opisanem protokolu v članku [29]. V mikrotitrskih ploščicah smo merili spremembo fluorescence. Kot substrat smo uporabili MUG, ki ga encim alfa-glukozidaza hidrolizira do 4-metilumbeliferona. 4-metilumbeliferon fluorescira veliko bolje kot MUG, zato ob hidrolizi fluorescenca naraste. V vsako vdolbinico smo napipetirali 20  $\mu\text{L}$  vodnih oziroma etanolnih vzorcev gob in 55  $\mu\text{L}$  raztopine encima, 1000 x razredčenega s fosfatnim pufrom s pH 6,8. Sledila je 10 minutna inkubacija na 37  $^{\circ}\text{C}$ . Nato smo v vsako vdolbinico dodali 50  $\mu\text{L}$  0,08 mM MUG in inkubirali v temi pri 37  $^{\circ}\text{C}$  10 minut, saj je MUG fotosenzitiven. Reakcijo smo v različnih časovnih točkah (30, 60, 90, 120 minut) ustavljali s 75  $\mu\text{L}$  0,2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Ko smo ustavili vse reakcije, smo pomerili fluorescenco pri valovni dolžini ekscitacije 365 nm in valovni dolžini emisije 445 nm. Meritve fluorescence smo izvajali v programu Magellan s pogoji: temperatura 37  $^{\circ}\text{C}$ , gain vrednost 34, Z-pozicija 8067  $\mu\text{m}$ , valovna dolžina ekscitacije 356 nm, valovna dolžina emisije 445 nm, ploščica pa se je pred meritvami stresala 10 sekund. Poleg meritev z 32 vzorci smo pri vsaki meritvi merili tudi signal pozitivne kontrole encima, kjer smo namesto zaviralcev v vdolbinico napipetirali 20  $\mu\text{L}$  demineralizirane vode, signal negativne kontrole z dodatkom 50 mM akarboze namesto vzorcev gob in signal slepega vzorca, kjer smo namesto encima dodali fosfatni pufer s pH 6,8. S slepim vzorcem smo ugotavljali vpliv ozadja in morebiten pojav fluorescence preskušanih spojin.

**Preglednica I** Sestava reakcijske mešanice za testiranje izvlečkov gob z alfa-glukozidazo

	test	+ kontrola	- kontrola	slepa
<b>I</b>	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$ dH <sub>2</sub> O	20 $\mu\text{L}$ akarboze	20 $\mu\text{L}$
<b>E</b>	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$	55 $\mu\text{L}$ puфра
<i>t = 10 min, T = 37 <math>^{\circ}\text{C}</math></i>				
<b>S</b>	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
<i>t = 30, 60, 90, 120 min, T = 37 <math>^{\circ}\text{C}</math>, tema</i>				
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	75 $\mu\text{L}$	75 $\mu\text{L}$	75 $\mu\text{L}$	75 $\mu\text{L}$
<i>Merjenje fluorescence pri <math>\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}</math>, <math>\lambda_{em} = 445 \text{ nm}</math></i>				

### 3.2.2.2. MERJENJE AKTIVNOSTI ALFA-AMILAZE

V mikrotitrskih ploščicah smo merili znižanje vrednosti absorbance po protokolu opisanem v članku [21]. Kot substrat smo uporabili škrob, ki ga alfa-amilaza razgradi do maltoze in glukoze. V mikrotitrski ploščici smo 5 minut pri sobni temperaturi inkubirali 25  $\mu\text{L}$  vodnih ali

etanolnih vzorcev ter 25  $\mu\text{L}$  encima. Nato smo dodali 50  $\mu\text{L}$  0,5 % raztopine škroba ter inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. Po tem času smo prenesli 50  $\mu\text{L}$  reakcijske zmesi k 25  $\mu\text{L}$  DNSA reagenta (barvilo), ki smo ga že predhodno napipetirali v PCR ploščico. Ploščico smo zalepili in inkubirali 15 minut pri 95 °C. Nato smo 60  $\mu\text{L}$  zmesi prenesli k 180  $\mu\text{L}$  vode v novi mikrotitrski ploščici in pomerili absorbanco pri 540 nm v programu Magellan. Meritvam vzorcev smo dodali tudi pozitivno kontrolo kjer smo namesto zaviralcev dodali 25  $\mu\text{L}$  demineralizirane vode in slepi vzorec, kjer smo izpustili dodatek encima.

**Preglednica II** Sestava reakcijske mešanice za testiranje izvlečkov gob z alfa-amilazo

	test	+ kontrola	slepa
<b>I</b>	25 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$ dH <sub>2</sub> O	25 $\mu\text{L}$
<b>E</b>	25 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$	/
<i>t = 5 min, sobna T</i>			
<b>S</b>	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
<i>t = 5 min, sobna T</i>			
<b>DNSA</b>	↘ 50 $\mu\text{L}$	↘ 50 $\mu\text{L}$	↘ 37,5 $\mu\text{L}$
	25 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$
	<i>t = 15 min, T = 95 °C</i>		
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	↘ 60 $\mu\text{L}$	↘ 60 $\mu\text{L}$	↘ 60 $\mu\text{L}$
	180 $\mu\text{L}$	180 $\mu\text{L}$	180 $\mu\text{L}$
	<i>Merjenje A pri <math>\lambda = 540 \text{ nm}</math></i>		

### 3.2.2.3. MERJENJE AKTIVNOSTI DIPEPTIDIL-PEPTIDAZE 4

Meritve smo opravili po navodilih Sigmee [30]. V črnih mikrotitrskih ploščicah smo 10 minut v temi pri 37 °C inkubirali 30  $\mu\text{L}$  encima (5000 x razredčen encim DPP IV v 50 mM TRIS pufri s pH 8,3) in 30  $\mu\text{L}$  vodnih in etanolnih vzorcev. Nato smo dodali 50  $\mu\text{L}$  0,5 mM GP-AMC v TRIS pufri ter 30 minut pri 37 °C merili kinetiko pri valovni dolžini 360 nm in 460 nm. GP-AMC (Gly-Pro-aminometilkumarin) smo uporabili kot substrat za DPP IV, saj cepi vez Gly-Pro, pri čemer se sprosti AMC, ki emitira fluorescenčni signal pri valovni dolžini 360 nm in 460 nm. Kot negativno kontrolo smo uporabili substrat sitagliptin, pri pozitivni kontroli pa smo namesto zaviralcev dodali demineralizirano vodo. Za izračun % zaviranja encima smo vrednost zadnje meritve (pri 30 min) odšteli od prve vrednosti (pri 0 min) in vrednost delili s

povprečno vrednostjo pozitivne kontrole. Meritve kinetike smo izvajali v programu Magellan s pogoji: temperatura 35 – 38 °C, gain vrednost 40, Z-pozicija 6500 µm, valovna dolžina ekscitacije 360 nm, valovna dolžina emisije 460 nm, ploščica se je pred začetkom merjenja in med posameznimi meritvami stresala 3 sekunde.

**Preglednica III** Sestava reakcijske mešanice za testiranje izvlečkov gob z DPP IV

	test	+ kontrola	- kontrola
<b>I</b>	30 µL	30 µL dH <sub>2</sub> O	30 µL sitagliptina
<b>E</b>	30 µL	30 µL	30 µL
<i>t = 10 min, T = 37 °C, tema</i>			
<b>S</b>	50 µL	50 µL	50 µL
<i>Merjenje kinetike pri t = 30 min, T = 37 °C, λ<sub>ex</sub> = 360 nm, λ<sub>em</sub> = 460 nm</i>			

### 3.2.3. SEPARACIJA EKSTRAKTOV GOB

Po večkratnih meritvah smo ekstrakte gob, ki so se izkazali kot najboljši zaviralci, nadalje separirali po velikosti (ultrafiltracija in dializa) in s kromatografskimi metodami (kolonska kromatografija, HPLC).

#### 3.2.3.1. ULTRAFILTRACIJA EKSTRAKTOV GOB

Z izbranimi ekstrakti gob smo nadaljevali z ultrafiltracijo po velikosti delcev. Metodo uporabljamo za koncentriranje proteinov z različno molekulsko maso, medtem, ko manjše molekule (soli, sladkorji, manjši peptidi) prehajajo skozi membrano. Vzorce smo centrifugirali 30 minut s hitrostjo 7.500 obr/min. Molekule, manjše od 3 kDa, so se med centrifugiranjem prefiltrirale skozi filter v spodnji del epruvete, večje molekule pa so ostale v zgornjem delu epruvete. Tako smo vzorce razdelili v dve frakciji: z manjšimi (velikost molekul < 3 kDa) in večjimi molekulami (velikost molekul > 3 kDa).

#### 3.2.3.2. DIALIZA EKSTRAKTOV GOB

Dializa je postopek pri katerem molekule prehajajo skozi polprepustno membrano v smeri koncentracijskega gradienta. S pomočjo te metode smo odstranili nizkomolekularne nečistote iz vzorca. Uporabili smo dializne kasete Slide-a-Lyzer<sup>®</sup> z velikostjo por, ki omogočajo



prehajanje molekul manjših od 2 kDa in prehajanje molekul manjših od 10 kDa. Za vzorca 2e(M) in 12e(M) smo uporabili dializni kaseti z velikostjo por 2 kDa. Za vzorce 2e, 12e in 8e pa smo uporabili dializne kasete z velikostjo por 10 kDa. Kot dializni medij smo uporabili prečiščeno vodo. Postopek dialize je potekal eno uro in nato po menjavi vode preko noči pri 4 °C ob konstantnem mešanju. Naslednji dan smo s pomočjo injekcij iz dializnih kaset vzeli vzorce in jih znova testirali z encimi.

- 2e(A) – etanolni ekstrakt gobe *Fomes fomentarius* z molekulami večjimi od 2 kDa in manjšimi od 3 kDa
- 2e(B) – etanolni ekstrakt gobe *Fomes fomentarius* z molekulami večjimi od 10 kDa
- 12e(A) – etanolni ekstrakt gobe *Gleophyllum odoratum* z molekulami večjimi od 2 kDa in manjšimi od 3 kDa
- 12e(B) – etanolni ekstrakt gobe *Gleophyllum odoratum* z molekulami večjimi od 10 kDa
- 8e(B) – etanolni ekstrakt gobe *Bjerkandera adusta* z molekulami večjimi od 10 kDa

### 3.2.3.3. KOLONSKA KROMATOGRAFIJA

Najbolj aktivne ekstrakte (2e(M), 12e(M) in 8e(V)) smo nadalje očistili z metodo kolonske ionsko-izmenjevalne kromatografije. Za vzorec 12e(M) smo najprej izbrali stacionarno fazo (SF) Dow styrene-DVB, ki je kopolimer stirena in divinilbenzena. Za vzorce 2e(M), 12e(M) in 8e(V) pa smo izbrali stacionarno fazo Diaion HP-20, ki je nepolarni kopolimer (stiren-divinilbenzen) in učinkovit adsorbent pri reverzno-fazni kromatografiji. Postopek kolonske kromatografije smo izvajali po navodilih Sigme-Aldrich Co. Obe SF smo pripravili po enakem postopku. SF sta bili v trdni, suhi obliki in zaprti pred zrakom, saj se lahko izsušita. Natehtali smo 2 g vsake SF in ju dali v čaši. Nato smo SF prekrili z metanolom, rahlo premešali in pustili 15 minut, da se je SF omočila. Zatem smo previdno odlili metanol in ga nadomestili z demineralizirano vodo, čašo rahlo premešali in mešanico pustili stati 10 minut. V prazno, suho kolono smo najprej nalili demineralizirano vodo do višine 1 cm, nato smo počasi dolili še stacionarno fazo. Skozi spodnjo odprtino kolone smo izpustili vodo do nivoja SF, zaprli kolono in dolili 2 mL našega ekstrakta. Vse skupaj smo pustili stati pol ure, nato pa začeli z zbiranjem frakcij po 0,5 mL v epice. Na vsako drugo frakcijo smo pretok zaprli za 10 minut. Nato smo dodali še dvakrat po 0,5 mL demineralizirane vode, polovili frakcije in začeli z dodajanjem po 0,5 mL metanola (do volumna 5 mL) in pri vsakem dodatku lovili frakcije, dokler se kolona ni razbarvala. Uporabili smo torej elucijski gradient metanola v vodi (večanje % metanola do 100 %). Frakcije smo pustili v odprtih epicah čez noč v digestoriju, da je izhlapel metanol. Naslednji dan smo epice s frakcijami dopolnili z demineralizirano vodo do volumna 0,5 mL in testirali frakcije z encimi.

Celotni postopek smo ponovili, le da smo tokrat kolonsko kromatografijo opravili le z vzorcema 2(e) in 12(e), ki sta izkazala najmočnejše zaviralne lastnosti na encim DPP IV ter alfa-glukozidaza in za oba vzorca uporabili SF Diaion HP-20, saj se je izkazal kot boljša SF.

#### **3.2.3.4. IZOLACIJA FOMENTARIOLA IZ GOBE *FOMES FOMENTARIUS***

Fomentariol visoke čistote je bil izoliran na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Beogradu s pomočjo HPLC. Vzorec gobe *Fomes fomentarius* je bil ekstrahiran z etanolom in nato topilo odparjeno pri sobni temperaturi. Suh ekstrakt je bil raztopljen v acetonitrilu in vodi v razmerju 1 : 1. Uporabljena je bila kolona Hypersil Gold column (5 µm, 150 x 10 mm) ter mobilna faza A (acetonitril) ter mobilna faza B (0,1 % mravljične kisline v vodi). Zbrane so bile frakcije fomentariola pri retencijskem času 9,3 - 10 min. Frakcijam je bilo nato odparjeno topilo in suhi ekstrakti raztopljeni v metanolu. Dobili smo vzorce s koncentracijo 6 mg/mL.

#### **3.2.3.5. HPLC**

Vzorec 2e, združene frakcije vzorca 2e(M), 12e, združene frakcije vzorca 12e(M), 8e(V), 1. frakcijo vzorca 8e(V) ter 13. frakcijo vzorca 8e(V) smo nadalje separirali s pomočjo metode HPLC. Uporabili smo topilo A (voda, 5 % acetonitril, 0,1 % TFA) ter topilo B (acetonitril, 5 % voda, 0,1 % TFA). Merili smo fluorescenco vzorcev (valovna dolžina ekscitacije 330 nm, valovna dolžina emisije 590 nm), UV-VIS spekter pri valovni dolžini 288 nm in UV-VIS spekter pri valovni dolžini 350 nm.

#### **3.2.4. IDENTIFIKACIJA AKTIVNIH SPOJIN (LC-MS)**

S pomočjo literature (Wikipedija, ChemSpider, SigmaAldrich, PubMed) smo za gobi *Fomes fomentarius* in *Gleophyllum odoratum* poiskali informacije o spojinah, ki se nahajajo v obeh gobah. O vsaki spojini smo želeli pridobiti naslednje informacije: molekulska masa in fragmenti spojine v katerem koli masnem spektru, celotni absorpcijski spekter ter maksimum in minimum spektra z valovno dolžino pri kateri so posneli spekter ter ali spojina fluorescira. Kljub temu, da smo pridobili precej informacij o spojinah, jih nismo mogli povezati z našimi rezultati. Vzorec gobe *Bjerkandera adusta* in njeni frakciji nismo analizirali z LC-MS, saj vsebujejo visokomolekularne komponente, ki niso primerne za obdelavo z metodo LC-MS.

#### **3.2.5. PRIPRAVA ENCIMOV**

##### **3.2.5.1. PRIPRAVA ENCIMA ALFA-GLUKOZIDAZA**

Natehtali smo 0,5 g uprašenega podganjega črevesa in ga homogenizirali v 50 mL 0,1 M fosfatnega pufru s 5 mM EDTA in 1 mM DTT s pH 7,0. Homogenat smo postavili za 30

minut v ultrazvočno kadičko pri temperaturi 4 °C. Zmesi smo nato dodali 2 % Tritona X 100 (kar je pomenilo v našem primeru 1 mL) in dobljeno suspenzijo vorteksirali 20 minut. Sledilo je centrifugiranje pri hitrosti 10.000 obr/min pri 4 °C, ki je trajalo 30 minut. Oborino smo zavrgli, supernatant pa oborili s 30 % amonijevim sulfatom in zmes postavili na led za toliko časa, da se je amonijev sulfat raztopil. Sledilo je ultracentrifugiranje 30 minut pri 50.000 obr/min pri 4 °C. Nato smo oborino zopet zavrgli, saj je vsebovala oborjene proteine, ki predstavljajo nečistoto. Supernatant smo oborili s 70 % amonijevim sulfatom, zmes dali zopet na led in ponovili ultracentrifugiranje na 50.000 obr/min pri 4 °C. Oborino z vmesno frakcijo proteinov smo resuspendirali v 2 mL 0,1 M fosfatnega pufru z 2 mM EDTA s pH 7,0. Zmes smo dializirali v dializnih kasetah čez noč pri 4 °C proti istem pufru. Naslednji dan smo dializatu izmerili aktivnost tako, da smo pripravili vzorce 100 x, 200 x, 500 x in 1000 x redčenega encima v fosfatnem pufru s pH 6,8. Vključili smo tudi slepi vzorec, kjer smo namesto encima dodali fosfatni pufer s pH 6,8. V mikrotitrski ploščici smo napipetirali 55 µL različnih redčitev encima (vsaka redčitev v 3 paralelah) in slepi vzorec (v 3 paralelah) ter 50 µL substrata MUG. Zmes smo inkubirali v temi na 37 °C in reakcijo ustavljali po 30, 60, 90 in 120 minutah s 75 µL 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Nato smo vzorcem pomerili fluorescenco. Meritve fluorescence smo izvajali v programu Magellan s pogoji: temperatura 37 °C, gain vrednost 34, Z-pozicija 8067 µm, valovna dolžina ekscitacije 356 nm, valovna dolžina emisije 445 nm, ploščica pa se je pred meritvami stresala 10 sekund.

### **3.2.5.2. PRIPRAVA ENCI MA ALFA-AMILAZA**

Encim alfa-amilaza smo pripravili tako, da smo 30 mg encima raztopili v 10 mL mrzle demineralizirane vode. Nato smo vzorec dobro premešali in ga postavili v ultrazvočno kadičko. Aktivnost encima smo določili z umeritveno premico po navodilih Sige in za nadaljnja testiranja vzeli 1 - 2 U/mL raztopino encima.

### **3.2.5.3. PRIPRAVA ENCI MA DIPEPTIDIL-PEPTIDAZA 4**

Pripravili smo 5000 x redčen encim DPP IV. Natehtali smo 0,304 g 50 mM TRIS-a za pripravo 50 mL vzorca encima. Z demineralizirano vodo smo dopolnili do polovice celotnega volumna in po kapljicah dodajali 1 M HCl do pH 8,3, nato smo z demineralizirano vodo dopolnili do volumna 50 mL. Tako smo dobili 50 mM TRIS pufer s pH 8,3, v katerem smo encim DPP IV redčili 5000 x.

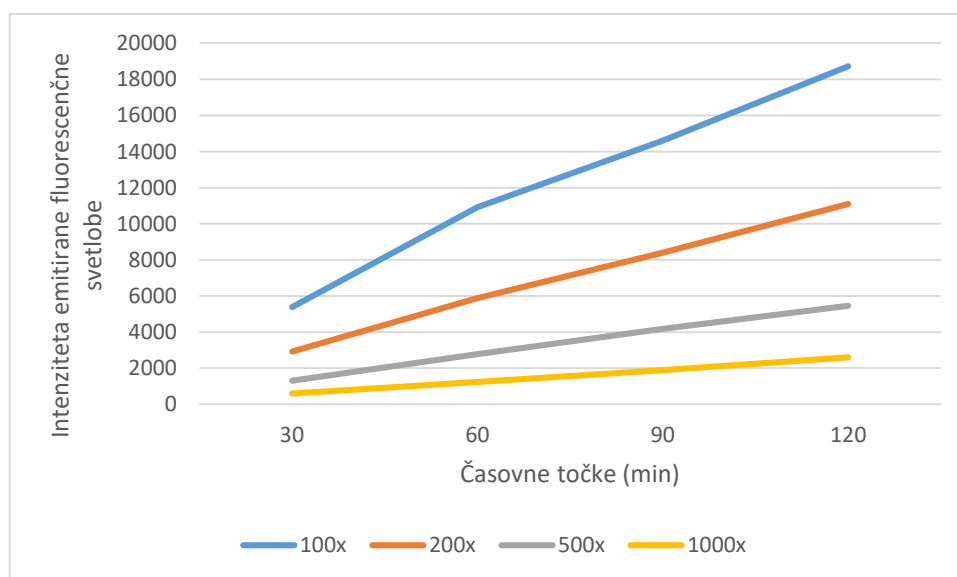
## 4. REZULTATI

### 4.1. PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB Z ALFA-GLUKOZIDAZO

Z merjenjem fluorescence smo želeli preveriti zaviralne lastnosti vodnih in etanolnih izvlečkov 16 lesnih gob na encim alfa-glukozidaza. Učinke na encim so preizkušali že številnim naravnim sestavinam. Preverjali so zaviralne lastnosti flavonoidov, alkaloidov, terpenoidov, antocianinov, glikozidov, ki se nahajajo v rastlinah in jih označili kot potencialne spojine za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2 [31] [32].

#### 4.1.1. MERJENJE AKTIVNOSTI IZOLIRANEGA ENCIMA ALFA-GLUKOZIDAZA

Pripravili smo 100 x, 200 x, 500 x in 1000 x redčen encim alfa-glukozidaza in encimu izmerili aktivnost z merjenjem fluorescence. Vključili smo tudi slepi vzorec, da smo ugotovili vpliv ozadja. Povprečna vrednost fluorescence slepega vzorca je bila zanemarljivo nizka (znašala je 3,5), zato je nismo upoštevali pri izračunu aktivnosti encima. Aktivnosti encima so prikazane na **Sliki 5**.



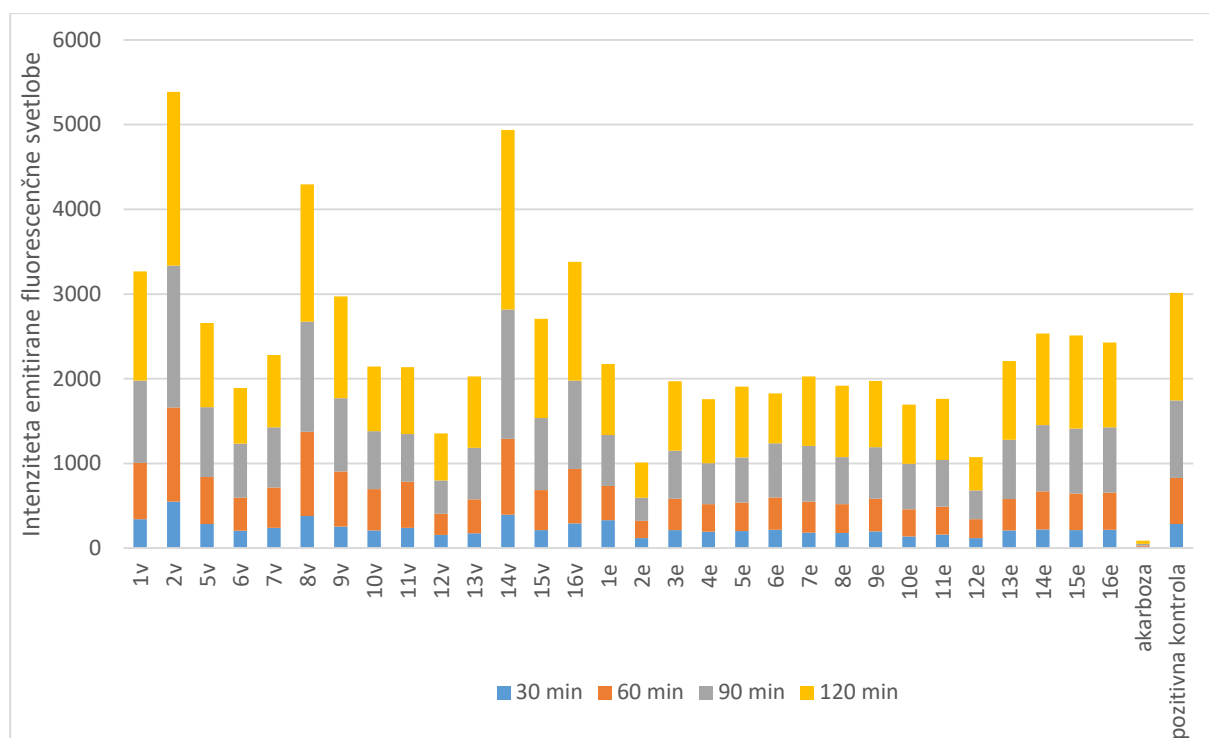
**Slika 5** Aktivnost 100 x, 200 x, 500 x in 1000 x redčenega encima alfa-glukozidaza

Pri vseh nadaljnjih meritvah smo uporabili 1000 x redčen encim alfa-glukozidaza.

#### 4.1.2. PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB Z ALFA-GLUKOZIDAZO

Pripravili smo vodne (označeni s črko v) in etanolne (označeni s črko e) vzorce gob (vse skupaj 32 vzorcev) s koncentracijo 2 mg/mL. Kot negativno kontrolo smo uporabili akarbozo s koncentracijo 50 mM, ki je učinkovit zaviralec alfa-glukozidaze [33].

Vključili smo tudi pozitivno kontrolo, kjer smo namesto zaviralcev dodali demineralizirano vodo in slepi vzorec z dodatkom fosfatnega pufra s pH 6,8 namesto encima. Rezultati so prikazani na **Sliki 6**.



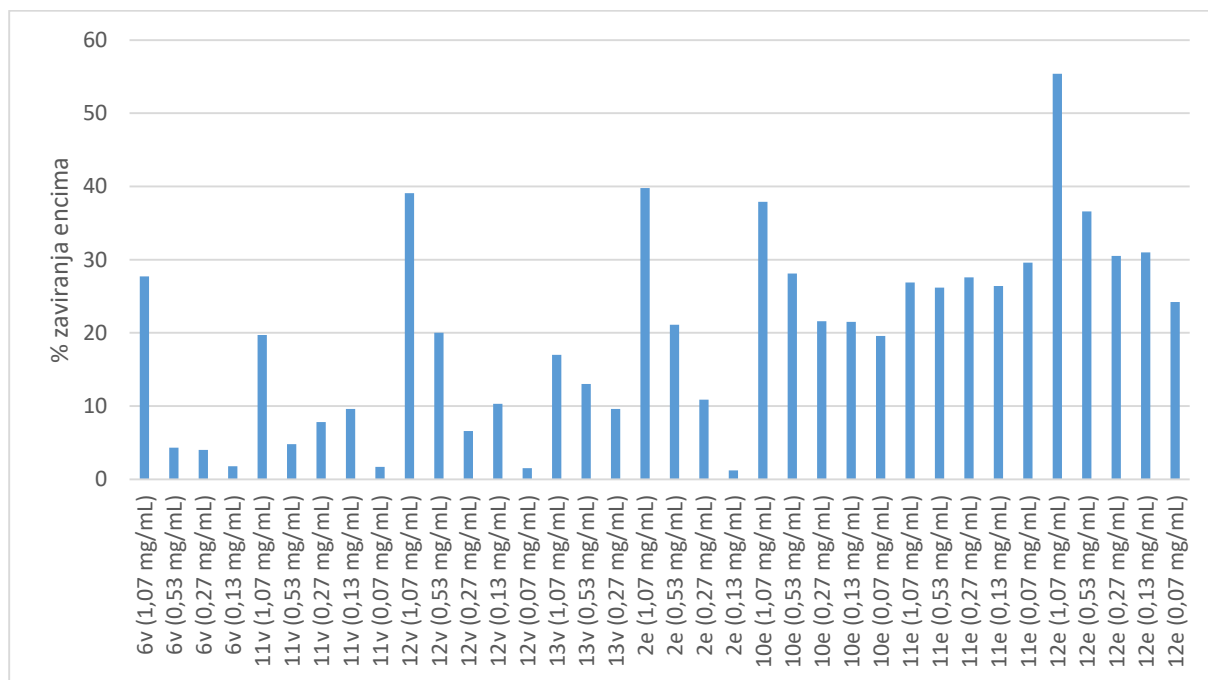
**Slika 6** Zaviralno delovanje vodnih in etanolnih ekstraktov gob na alfa-glukozidazo

V graf nismo vključili vzorca 3v in 4v, saj sta bila signala zelo visoka in spojini verjetno močno fluorescirata. Močen signal imajo tudi vzorci 1v, 2v, 8v, 14v in 16v, prav tako verjetno zaradi lastne fluorescence. Najmočnejše zaviranje encima so pokazali naslednji vzorci: 2e, 10e, 11e, 12e, 6v, 11v, 12v in 13v.

Meritve smo ponovili z vzorci 2e, 10e, 11e, 12e, 6v, 11v, 12v in 13v v različnih koncentracijah: 4 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL ter 0,25 mg/mL (koncentracije v končnih raztopinah (75  $\mu$ L): 1,07 mg/mL, 0,53 mg/mL, 0,27 mg/mL, 0,13 mg/mL ter 0,07 mg/mL). Vrednost pozitivne kontrole v tej točki je znašala 726. S pomočjo vrednosti pozitivne kontrole smo izračunali % zaviranja encima vsake posamezne koncentracije vzorca v časovni točki 90 minut po *Formuli 1*:

$$\% \text{ zaviranja encima} = \left( 1 - \frac{F_{\text{vzorec}} - F_{\text{slepa}}}{F_{\text{pozitivna kontrola}}} \right) \times 100 \%$$

*Formula 1:*  $F_{\text{vzorec}}$  – vrednost fluorescence vzorca,  $F_{\text{slepa}}$  – vrednost fluorescence slepega vzorca,  $F_{\text{pozitivna kontrola}}$  – vrednost fluorescence pozitivne kontrole



**Slika 7** % zaviralnega delovanja posameznih koncentracij vzorcev gob na encim alfa-glukozidaza

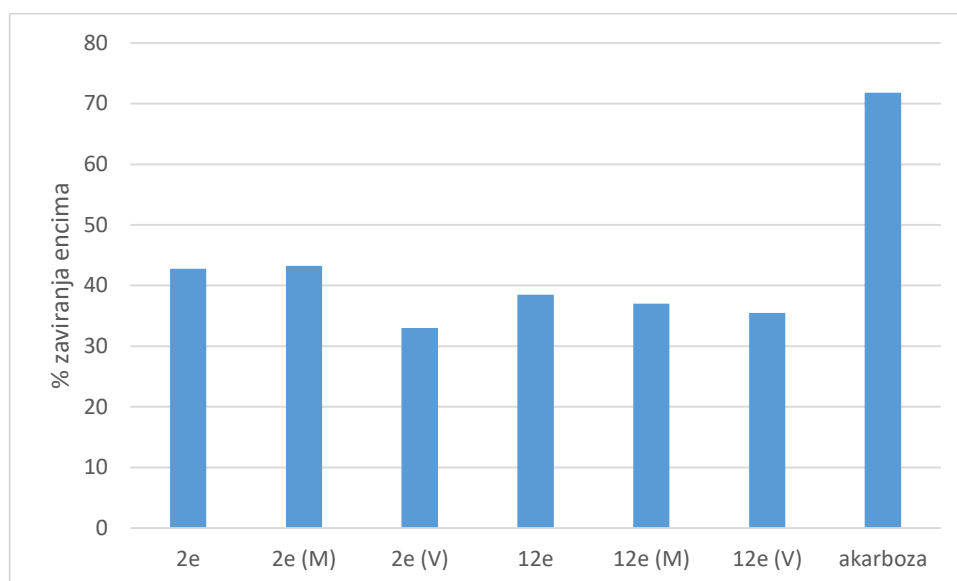
Pri vzorcih 6v (s koncentracijo 0,07 mg/mL), 13v (s koncentracijama 0,13 mg/mL in 0,07 mg/mL) ter 2e (s koncentracijo 0,07 mg/mL) ni prišlo do zaviranja encima, zato vzorci niso vključeni v graf.

Na **Sliki 7** vidimo, da so najboljše zaviranje encima dosegli vzorci gob z najvišjimi koncentracijami (1,07 mg/mL) in sicer 12v, 2e, 10e in 12e. Za nadaljnjo separacijo smo izbrali vzorca 2e in 12e, saj smo imeli na voljo omejeno število epruвет, namenjenih ultrafiltraciji.

#### 4.1.3. PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB PO ULTRAFILTRACIJI

Po ultrafiltraciji smo dobili 4 nove vzorce: 2e(M), 2e(V), 12e(M) in 12e(V), ki smo jim testirali zaviralne lastnosti. Črka M označuje vzorce z molekulami manjšimi od 3 kDa, črka V pa vzorce z molekulami večjimi od 3 kDa. Meritve smo opravili tudi s celima vzorcema 2e in 12e s koncentracijo 2 mg/mL ter pozitivno kontrolo, s pomočjo katere smo izračunali povprečje % zaviranja encima iz vseh 4 časovnih točk (30, 60, 90 in 120 minut) po *Formuli 1*.

Vrednost fluorescence pozitivne kontrole pri 30 min je znašala 275,5, pri 60 min 604,5, pri 90 min 941,5 in pri 120 min 1407. % zaviranja encima smo izračunali po *Formuli 1*.

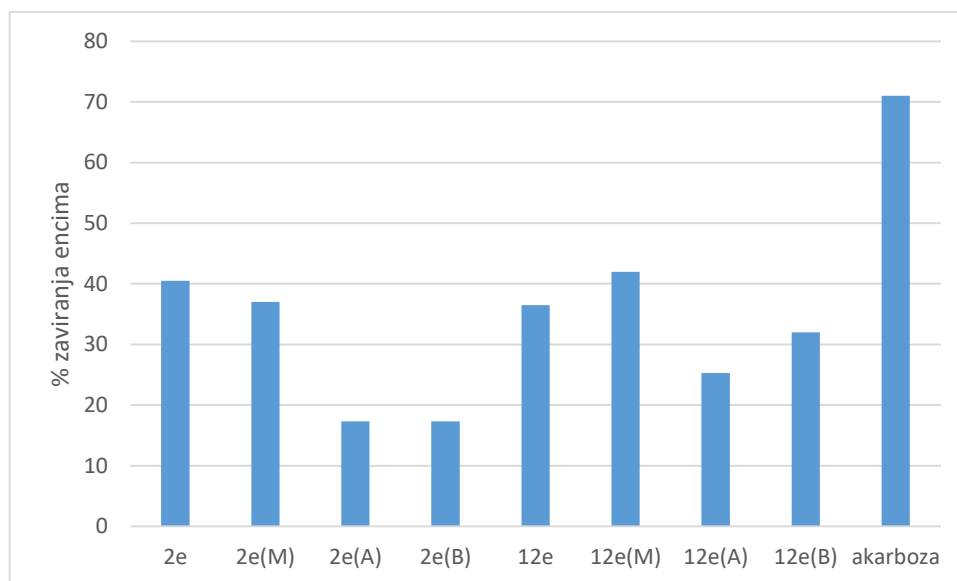


**Slika 8** Povprečje % zaviralnega delovanja filtratov ter vzorcev 2e, 12e in akarboze v časovnih točkah 30, 60, 90 in 120 minut na encim alfa-glukozidaza

Najmočnejše zaviranje smo dosegli s celima vzorcema 2e in 12e (**Slika 8**). Ker so % zaviranja pri vzorcih z malimi (M) in velikimi (V) molekulami približno enaki, smo sklepali, da se vse majhne molekule niso prefiltrirale skozi membrano v spodnjo fazo (M). Če bi se želeli znebiti vseh malih molekul, bi bilo potrebno frakcijo večjih molekul med centrifugiranjem večkrat spirati z vodo ali pufrom.

#### 4.1.4. PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB PO DIALIZI

Vzorci 2e, 12e, 2e(M) in 12e(M) smo dializirali in dobili vzorce 2e(A), 2e(B), 12e(A) in 12e(B). Vzorca 2e(A) in 12e(A) vsebujeta molekule, manjše od 3 kDa in večje od 2 kDa, vzorca 2e(B) in 12e(B) pa molekule večje od 10 kDa. Zaviranje encima smo izmerili tudi vzorcema 2e in 12e s koncentracijo 2 mg/mL. Vrednost fluorescence pozitivne kontrole je pri 30 min znašala 228,7, pri 60 min 471, pri 90 min 730,2 in pri 120 min 1057,2. % zaviranja encima smo izračunali po *Formuli 1*.



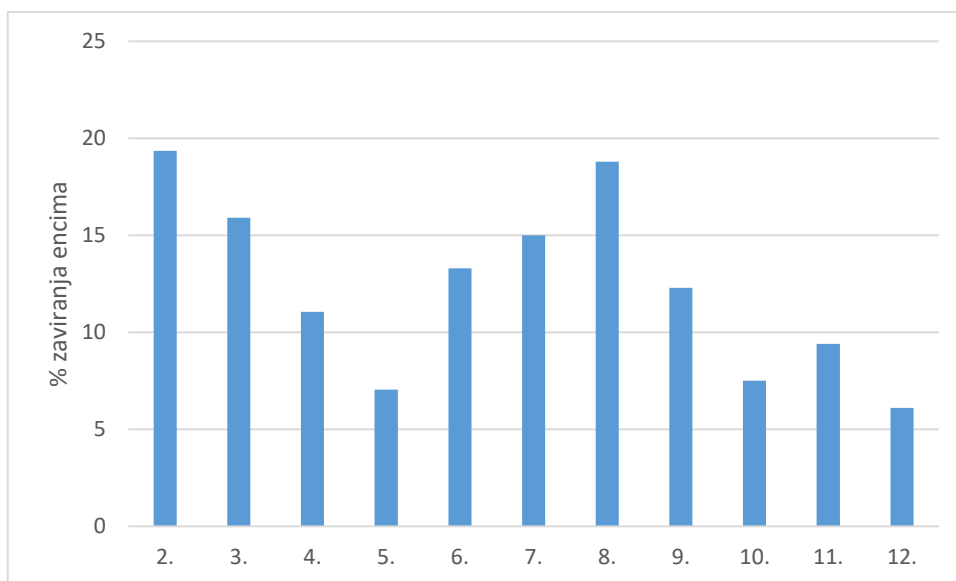
**Slika 9** Povprečje % zaviralnega delovanja vzorcev 2e, 12e, 2e(M), 12e(M), 2e(A), 12e(A), 2e(B) in 12e(B) na encim alfa-glukozidaza

Najmočnejše zaviranje smo dobili z vzorci 2e, 2e(M), 12e in 12e(M) (**Slika 9**). Tako smo ugotovili, da je večina aktivnih spojin nizkomolekularnih (manjših od 3 kDa), približno polovica od teh jih je velikostnega razreda 2 – 3 kDa. Za nadaljnjo separacijo s kolonsko kromatografijo smo izbrali vzorca 2e(M) in 12e(M).

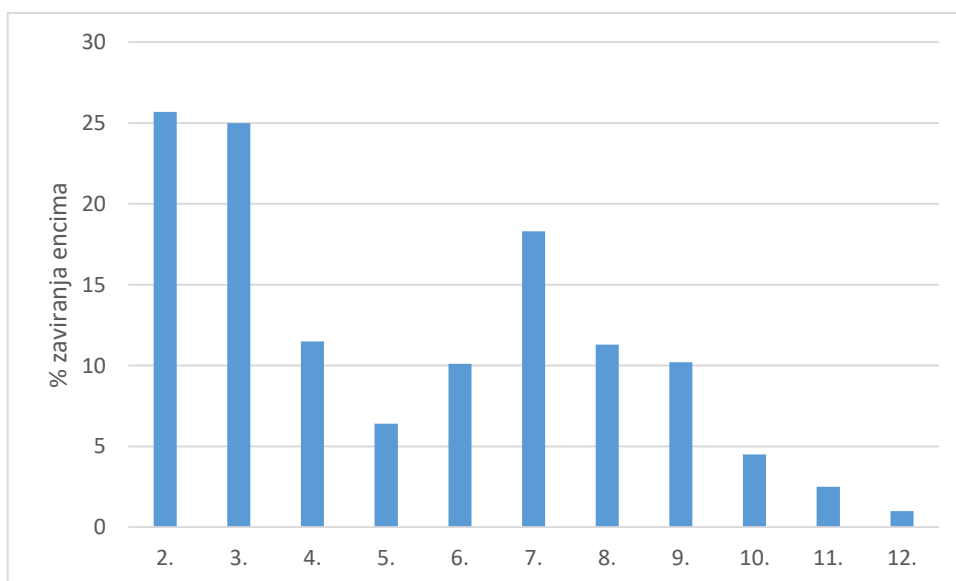
#### 4.1.5. PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB PO KOLONSKI KROMATOGRFIJI

S pomočjo kolonske kromatografije smo zbirali frakcije vzorca 2e(M) in 12e(M). Prvi dve frakciji sta bili eluirani z vodo, vse naslednje pa z večanjem gradienta metanola v vodi. Pri prvi kolonski kromatografiji smo polovili 12 frakcij. Kot stacionarno fazo smo za vzorec 2e(M) uporabili Diaion HP-20, za vzorec 12e(M) pa Dow-styrene. Merili smo fluorescenco frakcij s 1000 x redčenim encimom alfa-glukozidaza. % zaviranja encima smo izračunali po *Formuli 1*.





**Slika 10** Povprečje % zaviralnega delovanja frakcij vzorca 2e(M) na encim alfa-glukozidaza pri prvi koloni

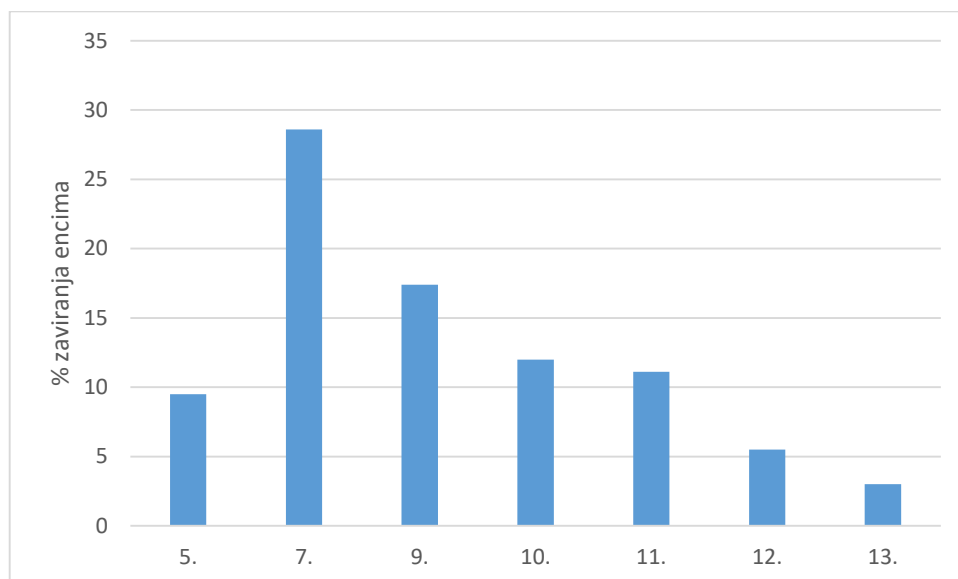


**Slika 11** Povprečje % zaviralnega delovanja frakcij vzorca 12e(M) na encim alfa-glukozidaza pri prvi koloni

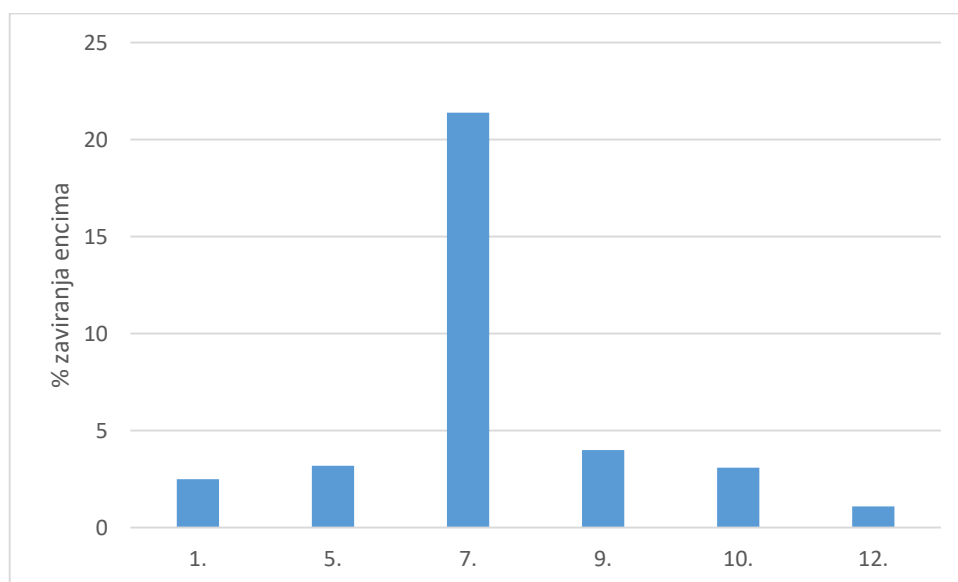
Pri vzorcu 2e(M) so izkazale najmočnejše zaviralne lastnosti 2., 3., 7. in 8. frakcija (**Slika 10**), pri vzorcu 12e(M) pa 2., 3. in 7. frakcija (**Slika 11**). 1. frakciji obeh vzorcev sta bili vodni in smo ju zavrgli.

Ponovili smo kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo tokrat za oba vzorca (2e(M) in 12e(M)) uporabili Diaion HP-20, ki se je pri 1. kolonski kromatografiji izkazal za učinkovitejšega kot Dow-styrene. Pri Dow-styrenu sklepamo, da se spojine niso vezale na

stacionarno fazo in so se takoj sprale z vodo v prvih dveh frakcijah, zato imamo najmočnejše zaviranje pri 2. in 3. frakciji. Medtem pri Diaionu HP-20 opazimo aktivnost spojin tudi v kasnejših frakcijah. Do 9. frakcije smo testirali vsako drugo frakcijo, saj smo sklepali, da najbolj aktivnih spojin ni med prvimi petimi frakcijami.



**Slika 12** Povprečje % zaviralnega delovanja frakcij vzorca 2e(M) na encim alfa-glukozidaza pri drugi koloni



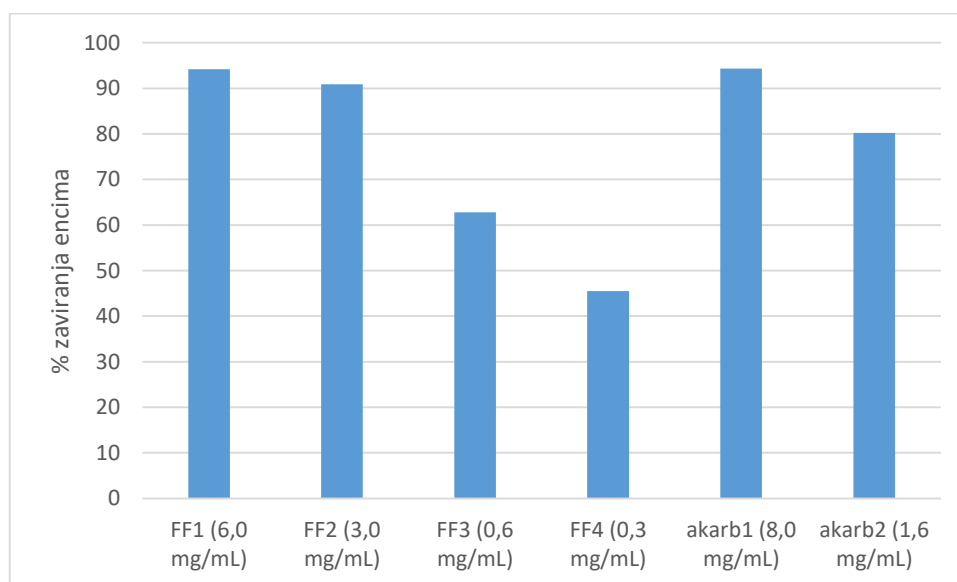
**Slika 13** Povprečje % zaviralnega delovanja frakcij vzorca 12e(M) na encim alfa-glukozidaza pri drugi koloni

1., 3., 14., 15. in 16. frakcija vzorca 2e(M) niso izkazale zaviralnih lastnosti na encim alfa-glukozidaza, zato niso vključene v graf (**Slika 12**).

3., 11., 13., 14., 15. in 16. frakcija vzorca 12e(M) niso vključene v graf (**Slika 13**), saj niso izkazale zaviralnih aktivnosti na encim alfa-glukozidaza. Najboljše rezultate smo dobili pri 7. frakciji obeh vzorcev, zato smo s 7. frakcijo vzorca 2e(M) in 12e(M) nadaljevali s HPLC.

#### 4.1.6. PREIZKUŠANJE FOMENTARIOLA Z ALFA-GLUKOZIDAZO

Testirali smo fomentariol, ki je pričakovano glavna zaviralna spojina gobe *Fomes fomentarius* [12]. Fomentariol je bil iz gobe *Fomes fomentarius* izoliran s pomočjo metode HPLC. Metanolni ekstrakt fomentariola smo redčili z DMSO in demineralizirano vodo v razmerju 1:3. Pripravili smo vzorce s koncentracijami 6 mg/mL (FF1), 3 mg/mL (FF2), 0,6 mg/mL (FF3) ter 0,3 mg/mL (FF4). Kot negativno kontrolo smo uporabili akarbozo s koncentracijama 8 mg/mL (akarb1) in 1,6 mg/mL (akarb2). Meritve vzorcev fomentariola ter meritve pozitivnih in negativnih kontrol smo opravili v dveh paralelah.



**Slika 14** Povprečje % zaviralnega delovanja vzorcev na encim alfa-glukozidaza

Z meritvami fluorescence metanolnih kontrol smo ugotovili, da metanol ne vpliva na fluorescenco, saj so bile vrednosti fluorescence vzorcev z metanolom enako visoke kot vrednosti fluorescence pozitivne kontrole. Najmočnejše zaviranje encima so izkazali vzorci z najvišjimi koncentracijami (tako fomentariol kot akarboza), aktivnost encima pa se večja z zmanjšanjem koncentracije zaviralcev (**Slika 14**). Vzorec fomentariola pri nižji koncentraciji (6 mg/mL) skoraj enako močno zavira delovanje encima kot akarboza s koncentracijo 8 mg/mL. S tem smo dokazali močno zaviralno delovanje fomentariola na encimsko aktivnost alfa-glukozidaze.

## 4.2. PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB Z ALFA-AMILAZO

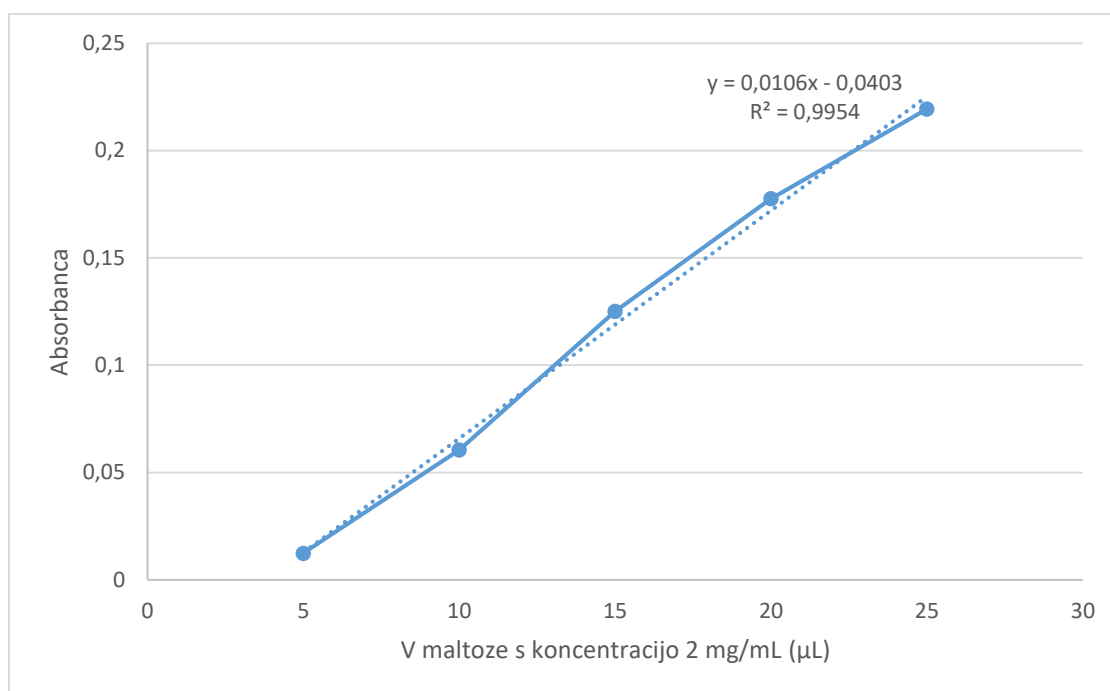
Da bi vodnim in etanolnim izvlečkom lesnih gob preverili zaviralne aktivnosti na encim alfa-amilaza, smo jim merili absorbanco ob dodatku encima in substrata, ki je v tem primer škrob. S številnimi študijami so že dokazali zaviralne lastnosti nekaterih rastlin na encim alfa-amilaza: *Cajanus cajan*, *Allium cepa*, *Ficus bengalensis*, *Allium sativum* in druge [34].

### 4.2.1. PREIZKUŠANJE AKTIVNOSTI ENCIMA ALFA-AMILAZA

Najprej smo pripravili standarde maltoze v različnih koncentracijah (**Preglednica IV**), s pomočjo katerih smo nato izrisali umeritveno premico (**Slika 15**). Pripravili smo tudi slepi vzorec standarda in njeno vrednost absorbance odšteli od absorbanc standardov.

**Preglednica IV** Sestava reakcijske mešanice za merjenje aktivnosti encima alfa-amilaza

	<b>STD 1</b> (0,2 mg/mL)	<b>STD 2</b> (0,4 mg/mL)	<b>STD 3</b> (0,6 mg/mL)	<b>STD 4</b> (0,8 mg/mL)	<b>STD 5</b> (1,0 mg/mL)	<b>STD slepa</b>
<b>Maltoza</b>	5 µL	10 µL	15 µL	20 µL	25 µL	/
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	45 µL	40 µL	35 µL	30 µL	25 µL	50 µL
<b>DNSA</b>	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
<i>t = 15 min, T = 95 °C</i>						
	↘ 75 µL	↘ 75 µL	↘ 75 µL	↘ 75 µL	↘ 75 µL	↘ 75 µL
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	225 µL	225 µL	225 µL	225 µL	225 µL	225 µL
<i>Merjenje A pri λ = 540 nm</i>						



**Slika 15** Umeritvena premica različnih koncentracij standardov maltoze

Pripravili smo 4 različne koncentracije encima: 3 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1 mg/mL in 0,5 mg/mL ter po shemi za testiranje vzorcev gob dodajali reagente ter posneli absorbance pri valovni dolžini 540 nm. Aktivnost encima smo ugotavljali s pomočjo umeritvene premice po navodilih Sigmee in za testiranje vzeli 1 – 2 U/mL encima. 1 U sprosti 1 mg maltoze iz škroba v 3 minutah pri pH 6,9 in T 20 °C.

Iz umeritvene premice smo določili, da bomo za nadaljnje meritve uporabili encim s koncentracijo 0,75 mg/mL.

#### 4.2.2. PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB Z ALFA-AMILAZO

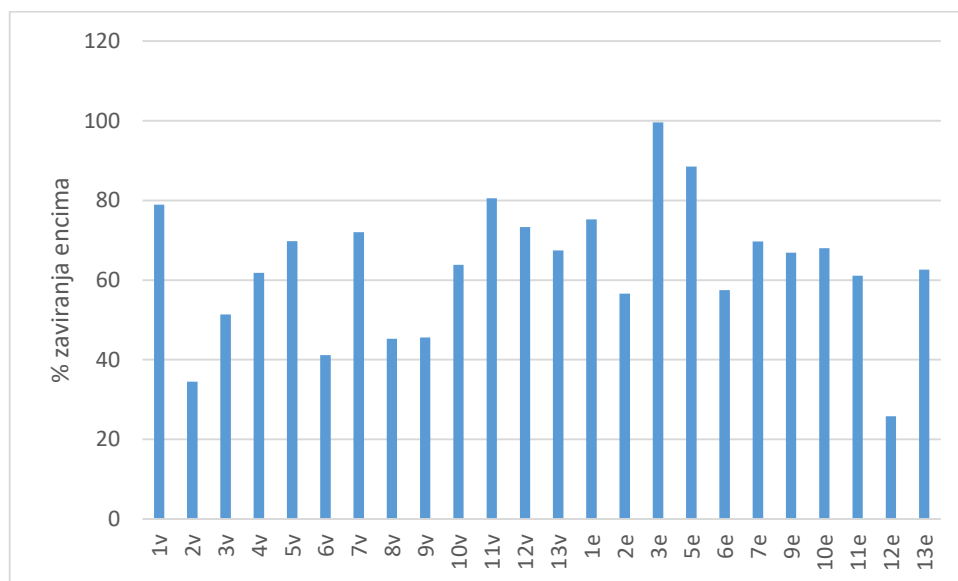
Zaviralno delovanje vodnih (označeni s črko v) in etanolnih (označeni s črko e) vzorcev gob smo določali z merjenjem absorbance. % zaviranja encima smo izračunali po *Formuli 2*:

$$\% \text{ zaviranja encima} = \left( 1 - \frac{A_{\text{vzorec}} - A_{\text{slepa}}}{A_{\text{pozitivna kontrola}}} \right) \times 100 \%$$

*Formula 2*:  $A_{\text{vzorec}}$  – vrednost absorbance vzorca,  $A_{\text{slepa}}$  – vrednost absorbance slepega vzorca,  $A_{\text{pozitivna kontrola}}$  – vrednost absorbance pozitivne kontrole

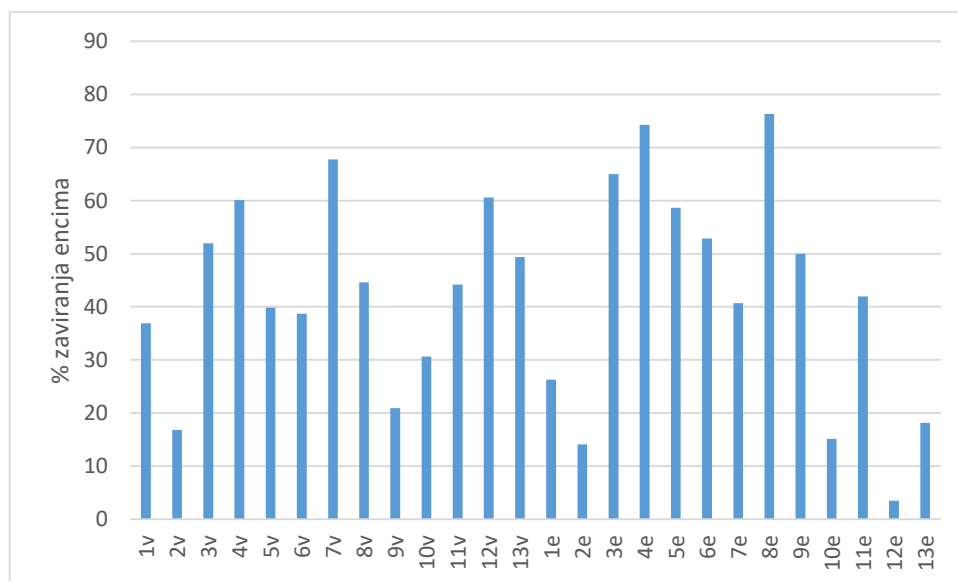
Uporabili smo 4 x redčen encim alfa-amilaza s koncentracijo 0,75 mg/mL in izmerili absorbance vodnim in etanolnim vzorcem s koncentracijo 2 mg/mL. V meritve smo vključili

tudi tri paralele pozitivne kontrole (njihova povprečna absorbanca je znašala 0,160) ter slepo kontrolo vsakega vzorca, kjer smo namesto zaviralcev dodali demineralizirano vodo.



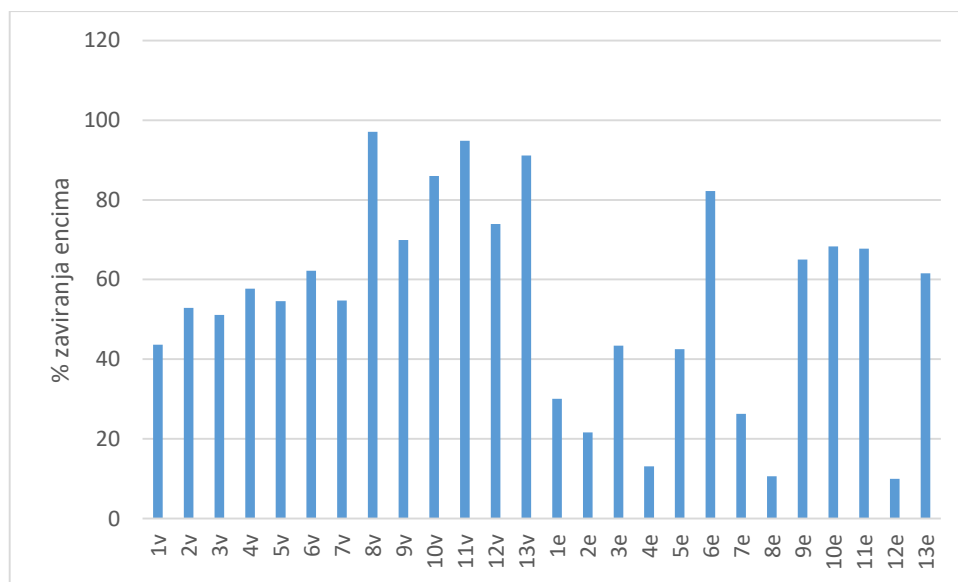
**Slika 16** % zaviralnega delovanja vodnih in etanolnih vzorcev s koncentracijo 2 mg/mL na encim alfa-amilaza pri 1. meritvi

Vzorca 4e in 8e nista vključena v graf (**Slika 16**), saj nista izkazala zaviralnih aktivnosti. Pri vzorcu 3e vidimo, da je prišlo do 100 % zaviranja encima, prav tako so tudi vsi ostali vzorci dosegli precej visok % zaviranja. Odločili smo se, da ponovimo meritve, saj smo podvomili v rezultate, prikazane na **Sliki 16**. Tokrat smo uporabili encim s koncentracijo 1 mg/mL. % zaviralnih lastnosti vzorcev na encim so prikazani na **Sliki 17**.

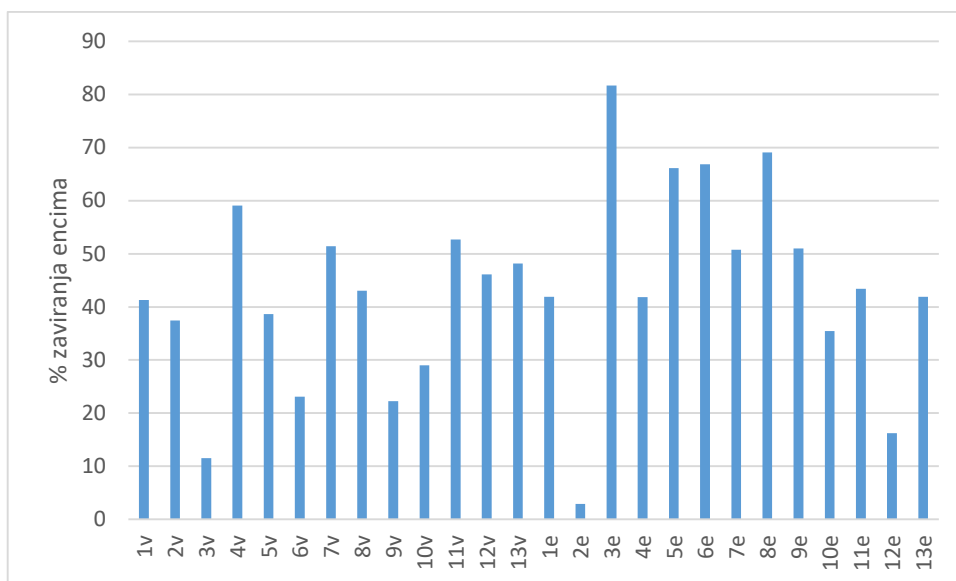


**Slika 17** % zaviralnega delovanja vodnih in etanolnih vzorcev s koncentracijo 2 mg/mL na encim alfa-amilaza pri 2. meritvi

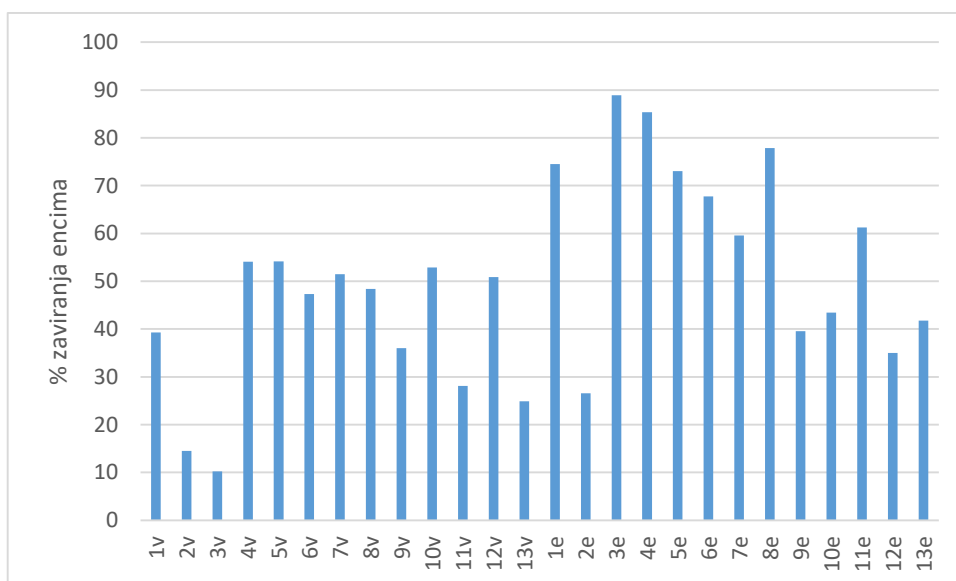
% zaviranja encima na **Sliki 17** so nižji kot na **Sliki 16**, kar je, glede na to, da je koncentracija vzorcev pri obeh meritvah ista, verjetno rezultat višje koncentracije encima. Tokrat opazimo močno inhibicijo vzorca 4e in 8e, ki pri 1. meritvi nista izkazala inhibicije. Sklepamo, da je do teh odstopanj prišlo zaradi napake med postopkom merjenja absorbance pri 1. preizkusu. Želeli smo še preveriti kakšen vpliv imajo bolj in manj koncentrirani vzorci gob, zato smo ponovili še 3 meritve vzorcev. Pri prvi meritvi smo uporabili vzorce zaviralcev s koncentracijo 1,7 mg/mL in encim s koncentracijo 3 mg/mL, pri drugi meritvi smo uporabili vzorce zaviralcev s koncentracijo 1,0 mg/mL in encim s koncentracijo 1 mg/mL ter pri tretji meritvi vzorce zaviralcev s koncentracijo 0,5 mg/mL in encim s koncentracijo 1 mg/mL. Rezultati meritev so prikazani na **Sliki 18**, **Sliki 19** in **Sliki 20**.



**Slika 18** % zaviralnega delovanja vodnih in etanolnih vzorcev s koncentracijo 1,7 mg/mL na encim alfa-amilaza



**Slika 19** % zaviralnega delovanja vodnih in etanolnih vzorcev s koncentracijo 1 mg/mL na encim alfa-amilaza



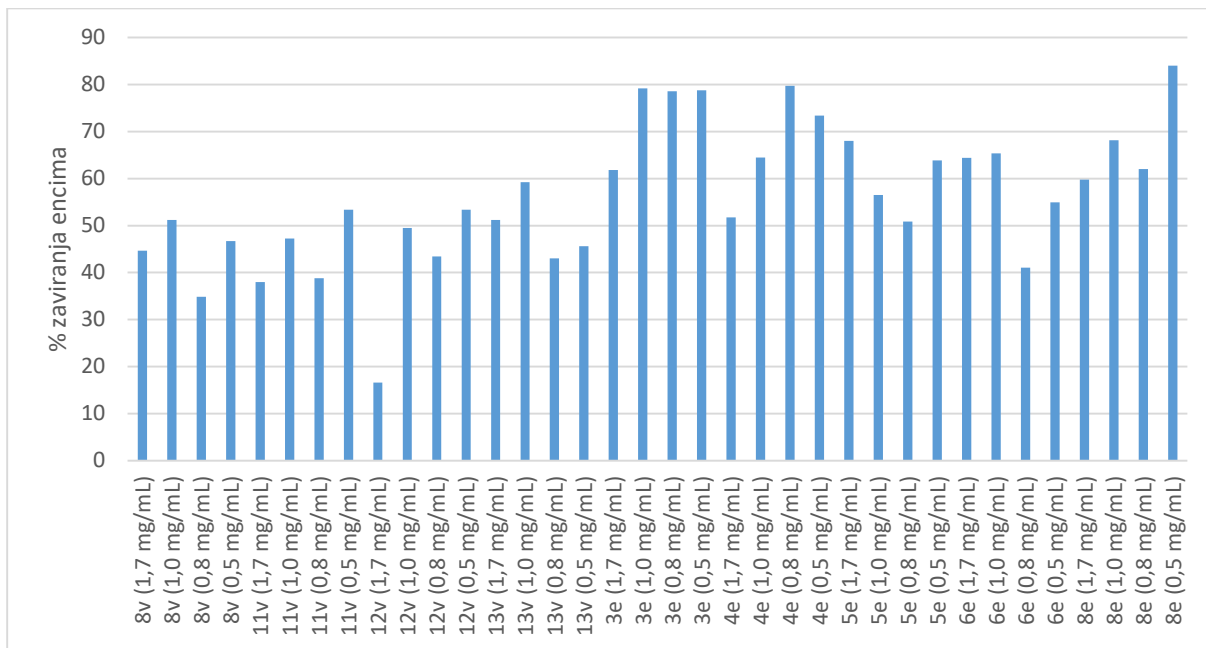
**Slika 20** % zaviralnega delovanja vodnih in etanolnih vzorcev s koncentracijo 0,5 mg/mL na encim alfa-amilaza

Iz predstavljenih rezultatov (**Slika 18**, **Slika 19** in **Slika 20**) lahko razberemo, da vodni vzorci encim bolje zavirajo v višjih koncentracijah, etanolni pa v nižjih koncentracijah.

Med vodnimi vzorci smo za nadaljnje meritve izbrali vzorce 8v, 11v, 12v in 13v, ki v višjih koncentracijah izkazujejo več kot 70 % zaviranje encima. Med etanolnimi vzorci smo za nadaljnje meritve izbrali vzorce 3e, 4e, 5e, 6e in 8e, ki pri koncentraciji 0,5 mg/mL izkazujejo več kot 65 % zaviranje encima. Izbrane vzorce smo zopet pripravili v različnih

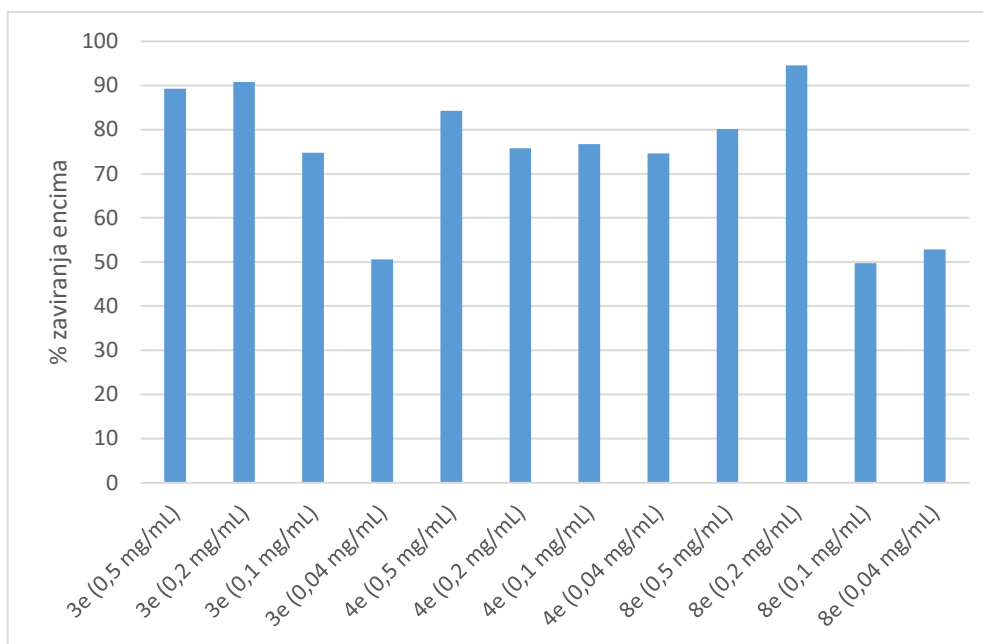


koncentracijah: 1,7 mg/mL, 1,0 mg/mL, 0,8 mg/mL in 0,5 mg/mL, saj smo želeli potrditi zgornje rezultate. Pri vzorcih s koncentracijo zaviralcev 1,7 mg/mL smo dodali encim s koncentracijo 3 mg/mL, pri vseh ostalih pa encim s koncentracijo 1 mg/mL. Izmerili smo tudi absorbanco pozitivne kontrole v 4 paralelah in izračunali povprečje, ki je znašalo 0,205. Vrednost slepega vzorca je bila 0,1. To vrednost smo odšteli od absorbanc vzorcev.



**Slika 21** % zaviralnega delovanja vzorcev: 1v, 8v, 11v, 12v, 13v, 3e, 4e, 5e, 6e in 8e na encim alfa-amilaza

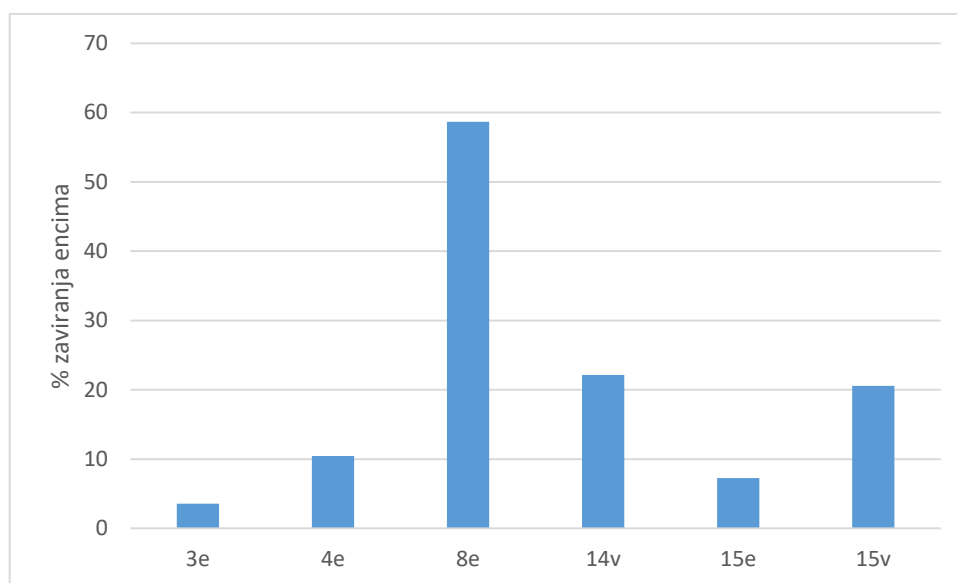
Rezultati, prikazani na **Sliki 21** kažejo, da niti vodni niti etanolni vzorci ne izkazujejo koncentracijsko odvisnega zaviranja encima, čeprav smo to pričakovali. Razlog je mogoče ta, da je prišlo do napake med redčenjem vzorcev, pri pripravi raztopine encima ali pa med samim postopkom merjenja absorbance. Najmočnejše zaviralne lastnosti imajo etanolni vzorci 3e, 4e, 8e in sicer pri nižjih koncentracijah, zato smo slednje pripravili še v nižjih koncentracijah: 0,5 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,1 mg/mL ter 0,04 mg/mL. Koncentracija encima je bila 1 mg/mL. Vrednost pozitivne kontrole je znašala 0,205, vrednost slepega vzorca pa 0,1.



**Slika 22** % zaviralnega delovanja vzorca 3e, 4e in 8e na encim alfa-amilaza

Na **Sliki 22** vidimo, da % zaviranja encima pade pod 75 % pri vzorcih s koncentracijo 0,1 mg/mL in 0,04 mg/mL, kar pomeni, da so ti vzorci premalo koncentrirani za najbolj optimalno delovanje. Sklepali smo, da morajo biti vzorci za maksimalno zaviranje encima v koncentracijskem območju med 0,2 mg/mL in 0,8 mg/mL.

Pomerili smo še absorbanco naknadno dobljenih vzorcev 14v, 14e, 15v, 15e, 16v in 16e, ter ponovno izmerili absorbanco vzorcev 3e, 4e in 8e, da bi potrdili visoke % zaviranja encima teh treh vzorcev iz meritev, predstavljenih na **Sliki 17**. Vzorci so imeli koncentracijo 2 mg/mL, encim pa 1 mg/mL. Vse meritve smo naredili v dveh paralelah. Pozitivna kontrola je znašala 0,788, slepi vzorec pa 0,05.

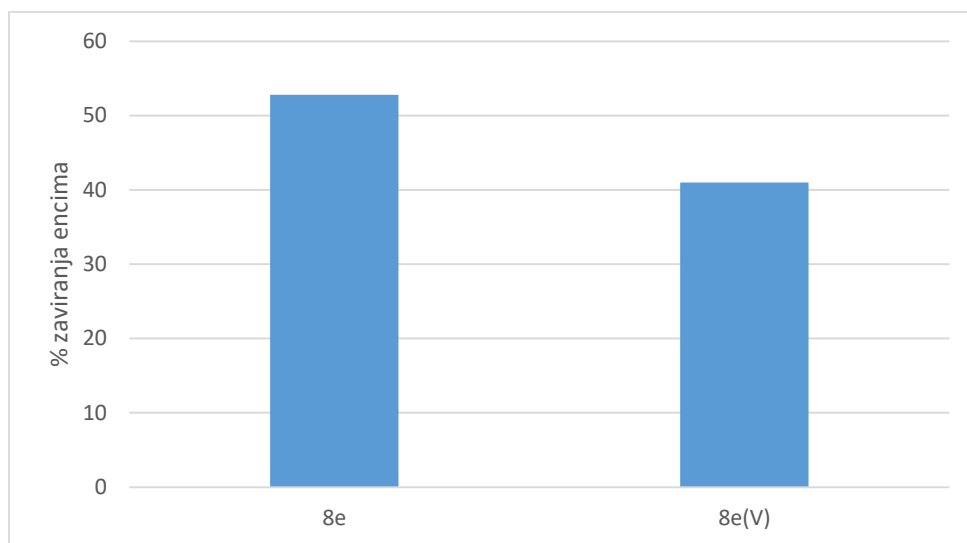


**Slika 23** % zaviralnega delovanja vzorcev 3e, 4e, 8e, 14v, 15e in 15v na encim alfa-amilaza

Vzorci 14e, 15v, 16e in 16v niso vključeni v graf (**Slika 23**), saj niso izkazali zaviralnega delovanja na encim. Vzorec 3e je tokrat izkazal le 3,6 % zaviranje encima, vzorec 4e pa 10,4 % zaviranje, medtem, ko sta pri meritvah, predstavljenih na **Sliki 17**, pri isti koncentraciji dosegla znatno boljše rezultate: vzorec 3e je dosegel 65 % zaviranje, vzorec 4e pa 74,3 % zaviranje pri istih pogojih. Tudi vzorec 8e je izkazal močnejše zaviranje, ki je znašalo 76,3 %, tokrat pa 58,7 %. Razloge lahko iščemo v dejstvu, da je vzorcem gob verjetno padla aktivnost. Vzorec 8e je kljub temu precej izrazito zavrl delovanje encima tudi pri zadnji meritvi, zato smo vzorec izbrali za nadaljnjo separacijo.

#### 4.2.3. PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB PO ULTRAFILTRACIJI

Po ultrafiltraciji vzorca 8e smo dobili nova dva vzorca: 8e(M) z molekulami manjšimi od 3 kDa in 8e(V) z molekulami večjimi od 3 kDa. Testirali smo zaviralno delovanje vzorcev 8e, 8e(M) in 8e(V) na encim alfa-amilaza. Uporabili smo encim s koncentracijo 1 mg/mL. Vse meritve smo izvajali v dveh paralelah. Izmerili smo tudi absorbanco pozitivne kontrole, ki je znašala 0,673 ter slepi vzorec, katerega vrednost je bila 0,05.

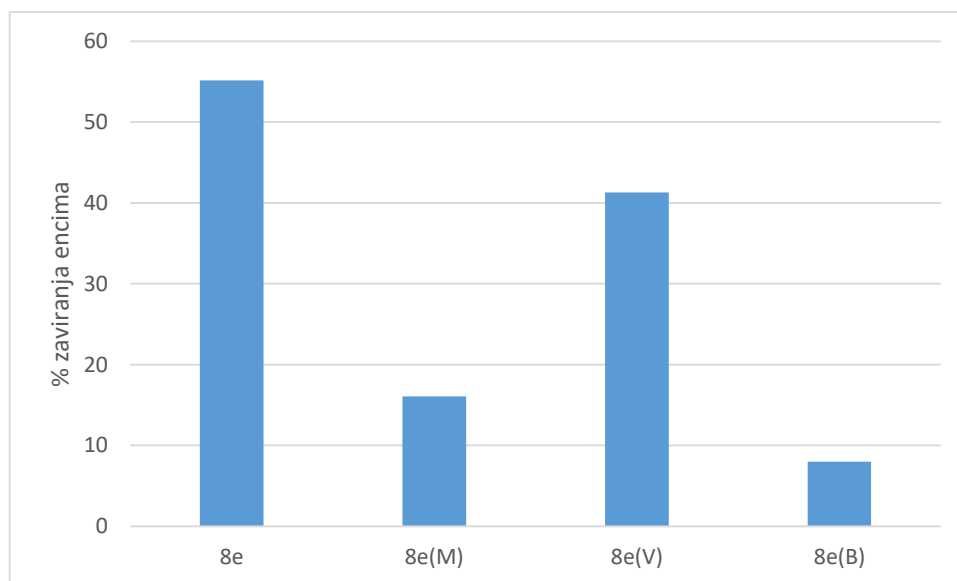


**Slika 24** % zaviralnega delovanja vzorcev 8e in 8e(V) na encim alfa-amilaza

Vzorec 8e(M) ni vključen v graf (**Slika 24**), ker ni izkazal zaviralnih aktivnosti na encim alfa-amilaza. Glede na % zaviranja encima smo sklepali, da so aktivne spojine večje od 3 kDa. Za nadaljnjo separacijo z dializnimi kasetami smo izbrali cel vzorec 8e, saj smo želeli ugotoviti, če so aktivne spojine večje od 10 kDa.

#### 4.2.4. PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB PO DIALIZI

Vzorec 8e smo dializirali z dializno kaseto z velikostjo por 10 kDa. Dobili smo nov vzorec 8e(B) z molekulami večjimi od 10 kDa, ki smo mu testirali zaviralne lastnosti. Ponovno smo izmerili absorbanco tudi vzorcem 8e, 8e(M) ter 8e(V), da bi ugotovili ponovljivost rezultatov. Uporabili smo encim s koncentracijo 1 mg/mL, vse meritve smo naredili v dveh paralelah. Vrednost pozitivne kontrole je znašala 0,421, vrednost slepega vzorca pa 0,06.

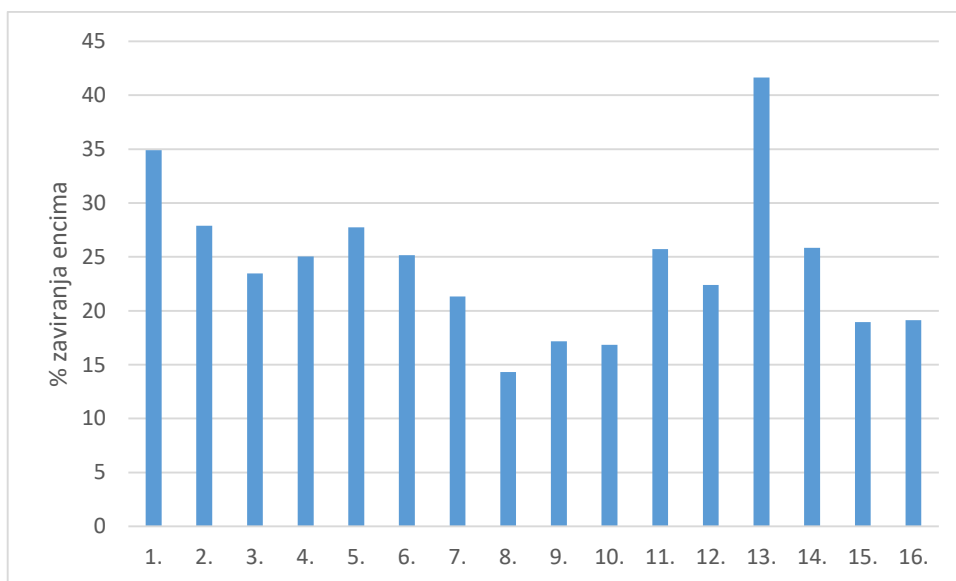


**Slika 25** % zaviralnega delovanja vzorcev 8e, 8e(M), 8e(V) in 8e(B) na encim alfa-amilaza

Rezultati meritev na **Sliki 25** so podobni predstavljenim rezultatom iz **Slike 24**. % zaviranja vzorca 8e je v obeh meritvah približno 50 %, % zaviranja vzorca 8e(V) pa 41 %. Tokrat je nekaj zaviranja encima izkazal tudi vzorec 8e(M). Ponovno je najmočnejše zaviranje izkazal cel vzorec 8e, najslabšo pa 8e(B) (**Slika 25**), kar pomeni, da so aktivne molekule manjše od 10 kDa in večje od 3 kDa.

#### 4.2.5. PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB PO KOLONSKI KROMATOGRAFIJI

Vzorec 8e(V) smo separirali s kolonsko kromatografijo. Uporabili smo stacionarno fazo Diaion HP-20 in polovili 16 frakcij, katerim smo izmerili absorbanco. Uporabili smo encim s koncentracijo 1 mg/mL. Izmerili smo tudi pozitivno kontrolo, ki je znašala 0,2767.



**Slika 26** % zaviralnega delovanja posameznih frakcij vzorca 8e(V) na encim alfa-amilaza

Na **Sliki 26** vidimo, da imata najmočnejše zaviralne lastnosti 1. in 13. frakcija vzorca 8e(V). Obe frakciji in cel vzorec 8e(V) smo nadalje separirali s pomočjo metode HPLC.

### 4.3. PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB Z DIPEPTIDIL-PEPTIDAZO 4

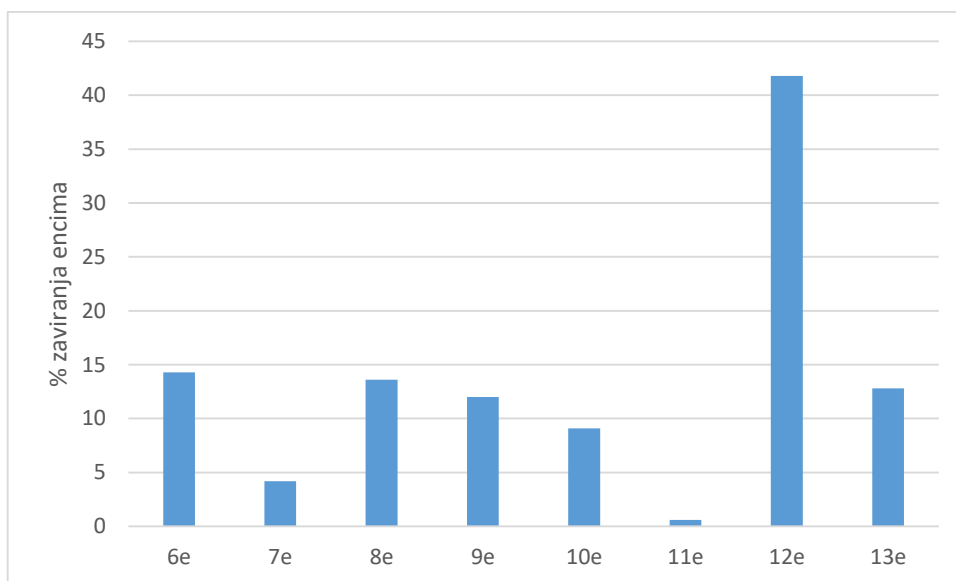
#### 4.3.1. PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB Z DIPEPTIDIL-PEPTIDAZO 4

Zaviralno delovanje vodnih (označeni s črko v) in etanolnih (označeni s črko e) vzorcev gob na encim DPP IV smo določali s pomočjo merjenja kinetike. % zaviranja encima smo izračunali po *Formuli 3*:

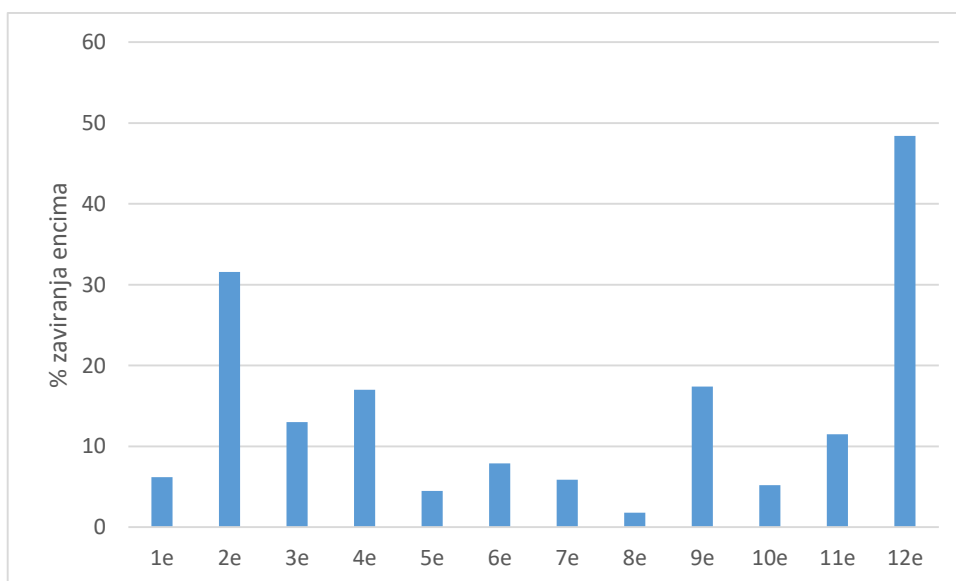
$$\% \text{ zaviranja encima} = \left( 1 - \frac{(K30 - K0)_{\text{vzorec}} - (K30 - K0)_{\text{slepa}}}{(K30 - K0)_{\text{pozitivna kontrola}}} \right) \times 100 \%$$

*Formula 3*:  $K30$  – vrednost pri časovni točki 30 min,  $K0$  – vrednost pri časovni točki 0 min,  $(K30 - K0)_{\text{vzorec}}$  – razlika vrednosti med 30 in 0 min vzorca,  $(K30 - K0)_{\text{slepa}}$  – razlika vrednosti med 30 in 0 min slepega vzorca,  $(K30 - K0)_{\text{pozitivna kontrola}}$  – razlika vrednosti med 30 in 0 min pozitivne kontrole

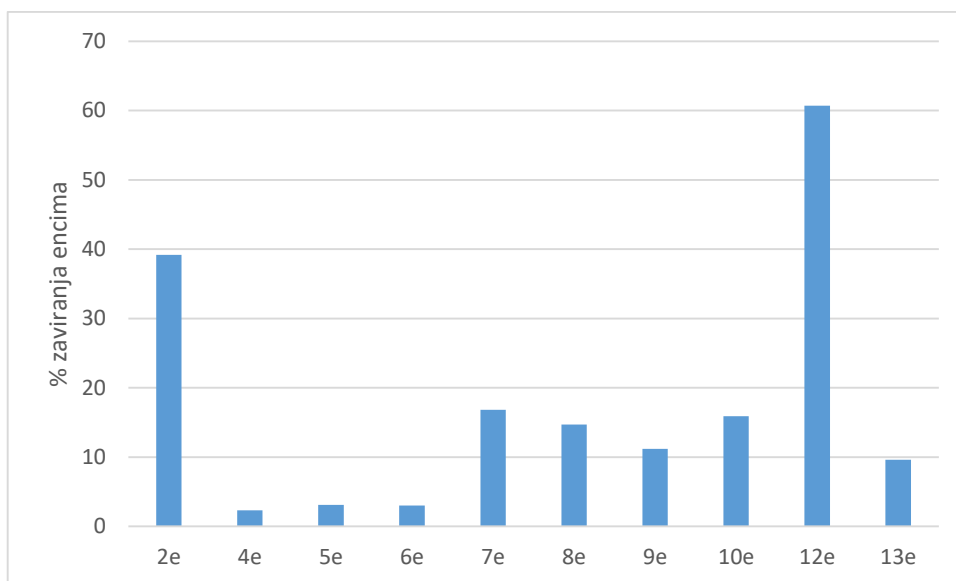
Pri vsakem merjenju smo merili tudi vrednost pozitivne kontrole, kjer smo namesto zaviralcev dodali demineralizirano vodo. Vzorce smo pripravili v treh koncentracijah: 1 mg/mL (**Slika 27**), 1,5 mg/mL (**Slika 28**) in 2 mg/mL (**Slika 29**). Vzorcev, ki so presegli vrednost pozitivne kontrole, nismo vključili v graf, saj ne zavirajo delovanja encima.



**Slika 27** % zaviralnega delovanja etanolnih vzorcev s koncentracijo 1 mg/mL na encim DPP IV

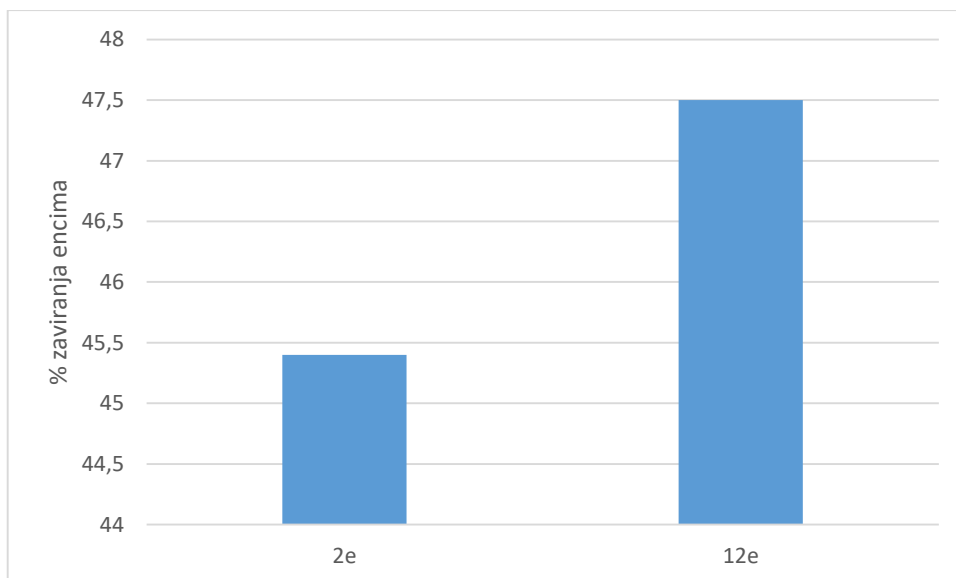


**Slika 28** % zaviralnega delovanja etanolnih vzorcev s koncentracijo 1,5 mg/mL na encim DPP IV



**Slika 29** % zaviralnega delovanja etanolnih vzorcev s koncentracijo 2 mg/mL na encim DPP IV

Iz **Slike 27**, **Slike 28** in **Slike 29** vidimo, da imata najmočnejše zaviralne lastnosti na encim DPP IV vzorca 2e in 12e, vodni vzorci niso izkazali zaviralnih aktivnosti. Intenziteta zaviranja encima korelira s koncentracijo vzorcev. Meritve smo ponovili z dvema paralelama vzorcev 2e in 12e s koncentracijo 2 mg/mL ter štirim paralelam pozitivne kontrole, da bi potrdili zgornje ugotovitve.



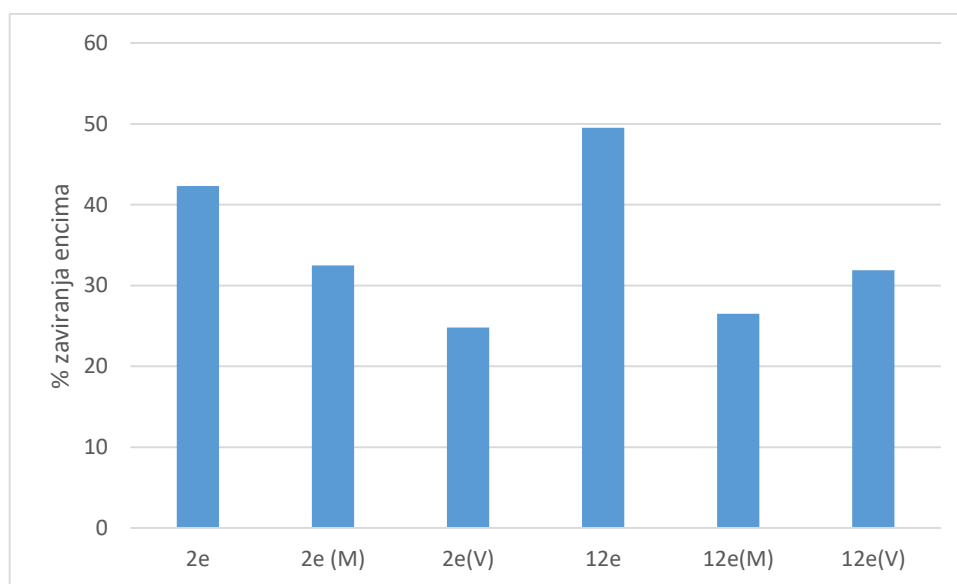
**Slika 30** % zaviralnega delovanja etanolnih vzorcev 2e in 12e s koncentracijo 2 mg/mL na encim DPP IV



Etanolna vzorca 2e in 12e sta ponovno izkazala močne zaviralne lastnosti, saj se je delovanje encima DPP IV zmanjšalo za skoraj 50 % (**Slika 30**). Vzorca smo nadalje separirali z ultrafiltracijo in ponovili meritve kinetike.

#### 4.3.2. PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB PO ULTRAFILTRACIJI

Vzorca 2e in 12e smo filtrirali in dobili vzorce: 2e(M), 2e(V), 12e(M) in 12e(V). Črka M označuje frakcijo z molekulami, manjšimi od 3 kDa, črka V pa frakcijo z molekulami, večjimi od 3 kDa. Meritve kinetike smo ponovili tudi z vzorcema 2e in 12e s koncentracijo 2 mg/mL. Vključili smo pozitivno kontrolo, s pomočjo katere smo računali % zaviranja po *Formuli 3*. Meritve smo opravili v dveh paralelah.



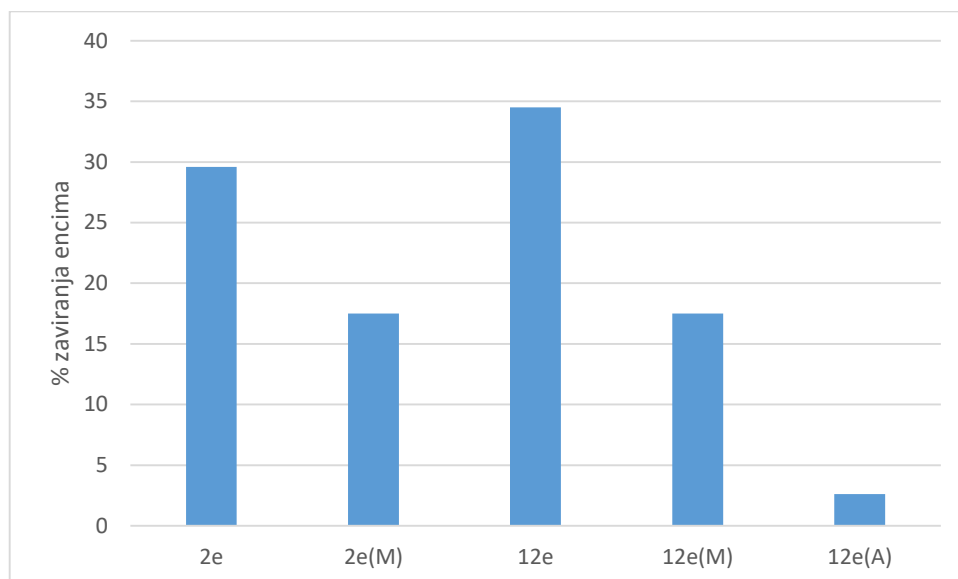
**Slika 31** % zaviralnega delovanja vzorcev 2e, 2e(M), 2e(V), 12e, 12e(M) ter 12e(V) na encim DPP IV

Sklicujoč se na **Sliko 31** sta encim močno zavirala vzorca 2e in 12e, ki sta vsebovala tako male kot velike molekule. Prav tako smo ugotovili visoko ponovljivost rezultatov vzorcev 2e in 12e, saj sta tudi tokrat zavrla delovanje encima za skoraj 50 %. Razlog, da nismo dobili izrazitega zaviranja encima pri velikih (V) ali malih (M) molekulah je najbrž ta, da se vse molekule niso uspele prefiltrirati in je precej malih molekul ostalo v zgornji frakciji z velikimi molekulami.

#### 4.3.3. PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB PO DIALIZI

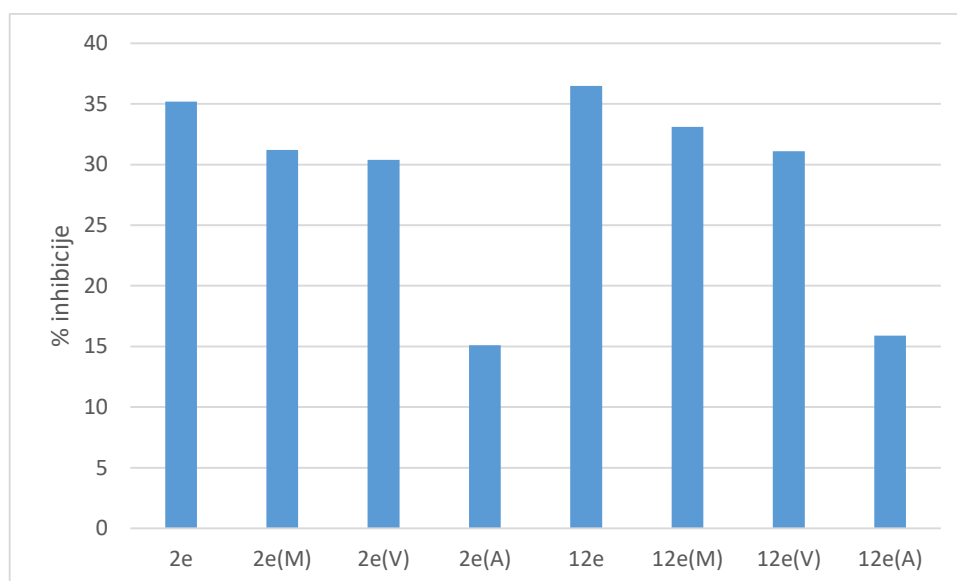
Nadaljevali smo z dializo vzorcev 2e, 2e(M), 12e in 12e(M). Meritve zaviranja encima smo izvedli na novih vzorcih 2e(A) in 12e(A), kjer je velikost molekul večja od 2 kDa in manjša

od 3 kDa, ter na vzorcih 2e(B) ter 12e(B), kjer je velikost molekul večja od 10 kDa. Ponovno smo izmerili absorbanco tudi vzorcem 2e, 2e(M), 12e in 12e(M), da bi preverili, če je aktivnost vzorcev med shranjevanjem padla. Vključili smo tudi pozitivno kontrolo, meritve smo opravili v dveh paralelah in % zaviranja encima izračunali po *Formuli 3*.



**Slika 32** % zaviralnega delovanja vzorcev 2e, 2e(M), 12e, 12e(M) in 12e(A) na encim DPP IV

Vzorci 2e(A), 2e(B) in 12e(B) niso vključeni v graf (**Slika 32**), saj niso izkazali zaviralnega delovanja na encim. Iz tega lahko sklepamo, da so aktivne molekule nedvoumno manjše od 10 kDa. % zaviranja vzorcev 2e, 12e, 2e(M) in 12e(M) je rahlo padel v primerjavi z rezultati na **Sliki 31** – aktivnost gob s časom shranjevanja verjetno pada ali pa do razlik pride zaradi napak pri redčenju vzorcev. Encim sta zopet najbolje zavirala cela vzorca 2e in 12e s koncentracijo 2 mg/mL. Meritev smo ponovili z vsemi vzorci in dodali še vzorca 2e(V) in 12e(V), da bi potrdili dosedanje ugotovitve.

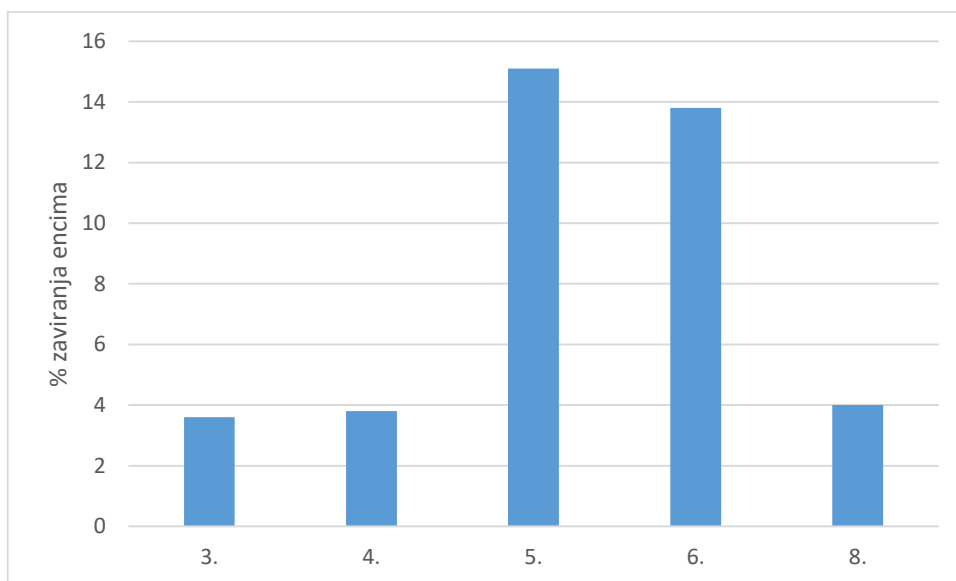


**Slika 33** % zaviralnega delovanja vzorcev 2e, 2e(M), 2e(V), 2e(A), 12e, 12e(M), 12e(V) in 12e(A) na encim DPP IV

Vzorca 2e(B) in 12e(B) nista vključena v graf (**Slika 33**), saj sta bili vrednosti meritve višji kot pozitivna kontrola. S tem smo potrdili, da so aktivne molekule obeh vzorcev manjše od 10 kDa. Močno zaviranje encima izražajo tako vzorci z velikimi (V) in malimi molekulami (M), zato lahko sklepamo, da se aktivne molekule nahajajo v obeh frakcijah. Nadaljevali smo s kolonsko kromatografijo, za katero smo izbrali vzorca 2e(M) in 12e(M), saj smo sklepali, da so aktivne molekule v večji meri manjše od 3 kDa.

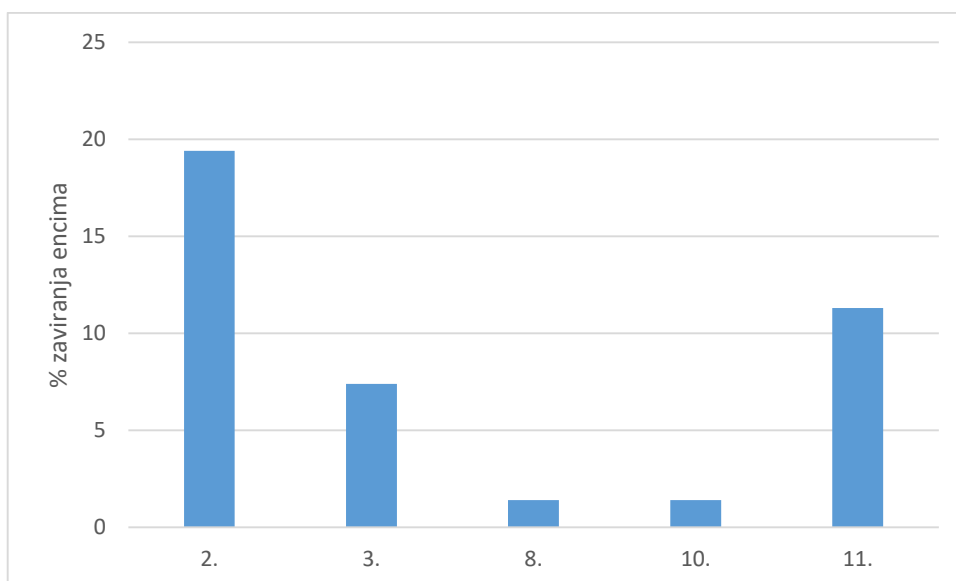
#### 4.3.4. PREIZKUŠANJE EKSTRAKTOV GOB PO KOLONSKI KROMATOGRFIJI

S kolonsko kromatografijo smo separirali molekule vzorcev 2e(M) in 12e(M) in lovili frakcije, ki smo jim merili kinetiko. Prvi dve frakciji smo spirali z vodo, vse naslednje pa z večanjem gradienta metanola v vodi. Za vzorec 2e(M) smo uporabili stacionarno fazo Diaion HP-20, za vzorec 12e(M) pa Dow-styrene. Polovili smo 12 frakcij. Vključili smo tudi pozitivno kontrolo v dveh paralelah.



**Slika 34** % zaviralnega delovanja frakcij vzorca 2e(M) na encim DPP IV pri prvi koloni

Fracije, ki niso izkazale zaviralnih lastnosti, niso vključene v graf (**Slika 34**).

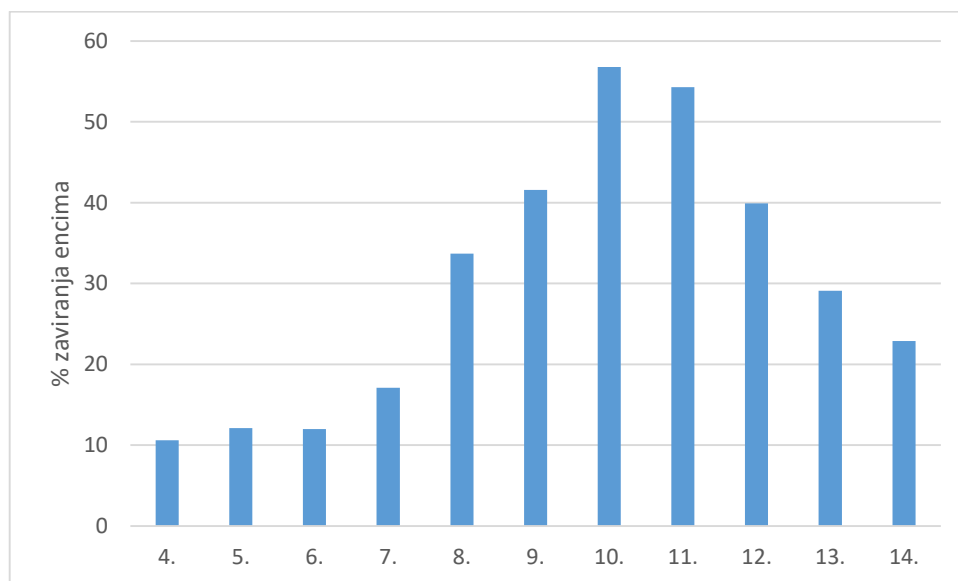


**Slika 35** % zaviralnega delovanja frakcij vzorca 12e(M) na encim DPP IV pri prvi koloni

Fracije, ki niso izkazale zaviralnih lastnosti na encim, niso vključene v graf (**Slika 35**).

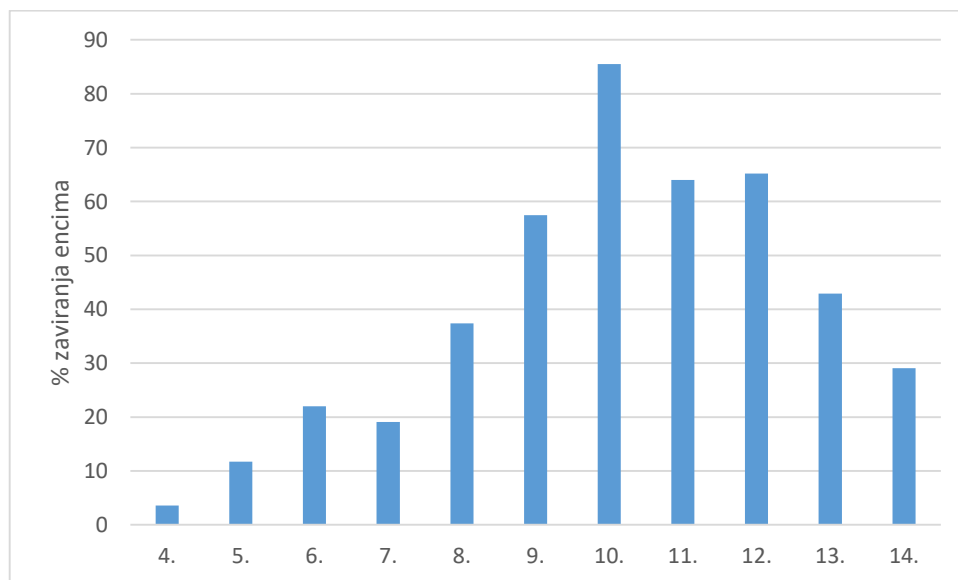
Pri vzorcu 2e(M) encim najmočneje zavirata 5. in 6. frakcija (**Slika 34**), pri vzorcu 12e(M) pa 2. frakcija (**Slika 35**). Tudi tokrat se je stacionarna faza Diaion HP-20 izkazala za učinkovitejšo, saj so se molekule očitno boljše vezale na stacionarno fazo in se niso sprale pri prvem eluiranju z vodo. Zato smo ponovili kolonsko kromatografijo in tokrat za oba vzorca izbrali stacionarno fazo Diaion HP-20. Polovili smo 14 frakcij. Merili smo tudi vrednost

pozitivne kontrole v dveh paralelah, vrednosti pa so nam služile za izračun % zaviranja encima po *Formuli 3*.



**Slika 36** % zaviralnega delovanja frakcij vzorca 2e(M) na encim DPP IV pri drugi koloni

V graf (**Slika 36**) smo zajeli vse frakcije razen prvih treh, saj smo pri prvem merjenju ugotovili, da nimajo izrazitih zaviralnih lastnosti.



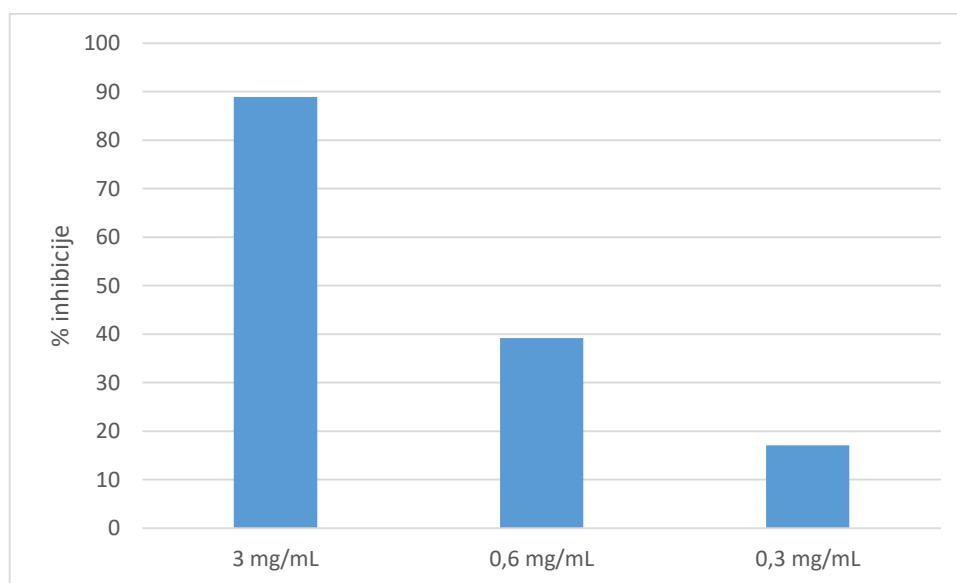
**Slika 37** % zaviralnega delovanja frakcij vzorca 12e(M) na encim DPP IV pri drugi koloni

Na prvih treh frakcijah nismo naredili meritev, saj smo na podlagi prve meritve na vzorcu 2e(M) s stacionarno fazo Diaion HP-20 sklepali, da se aktivne molekule eluirajo kasneje in zato niso vključene v graf (**Slika 37**). Potrdimo lahko, da je Diaion HP-20 dobra stacionarna

faza, saj se aktivne molekule spirajo v kasnejših frakcijah – najmočnejše zaviranje encima so pokazale frakcije 9., 10., 11. in 12., ki smo jih nadalje separirali z metodo HPLC.

#### 4.3.5. PREIZKUŠANJE FOMENTARIOLA Z DIPEPTIDIL-PEPTIDAZO 4

Zaviralne aktivnosti smo merili izoliranem fomentariolu, ki je po literaturi sodeč pričakovano glavna zaviralna spojina gobe *Fomes fomentarius* [12]. Vzorce fomentariola smo pripravili v treh koncentracijah: 3 mg/mL, 0,6 mg/mL in 0,3 mg/mL. Vključili smo tudi pozitivno kontrolo, vzorce sitagliptina in metanolne kontrole. Vse meritve smo naredili v treh paralelah in % zaviranja encima izračunali s pomočjo *Formule 3*.



**Slika 38** % zaviralnega delovanja fomentariola na encim DPP IV

Vzorci sitagliptina niso vključeni v graf (**Slika 38**), saj je njihov naklon premice negativen, kar pomeni, da je sitagliptin popolnoma zavrl delovanje encima. Signali metanolnih kontrol so bili skoraj enako visoki kot signali pozitivne kontrole, kar pomeni, da prisotnost metanola v vzorcih fomentariola ne vpliva na signale. Iz rezultatov meritev lahko zaključimo, da fomentariol v višjih koncentracijah (3 mg/mL) zelo močno zavira delovanje encima DPP IV.

#### 4.4. HPLC REZULTATI

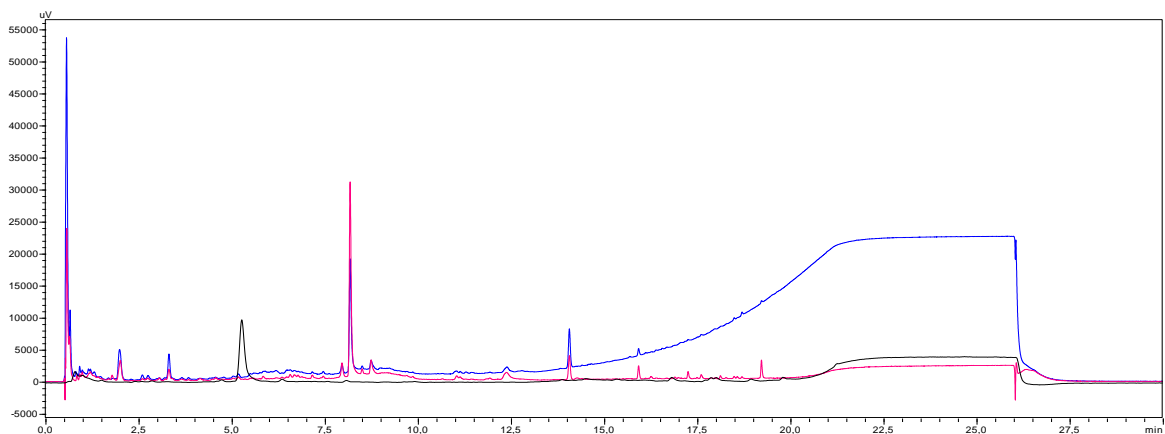
Z metodo HPLC smo separirali vzorce, ki so najbolj zavirali delovanje alfa-glukozidaze, alfa-amilaze in DPP IV (**Preglednica V**). Posneli smo kromatograme in absorpcijske spektre izbranih vzorcev.

**Preglednica V** Pregled analiziranih vzorcev s HPLC

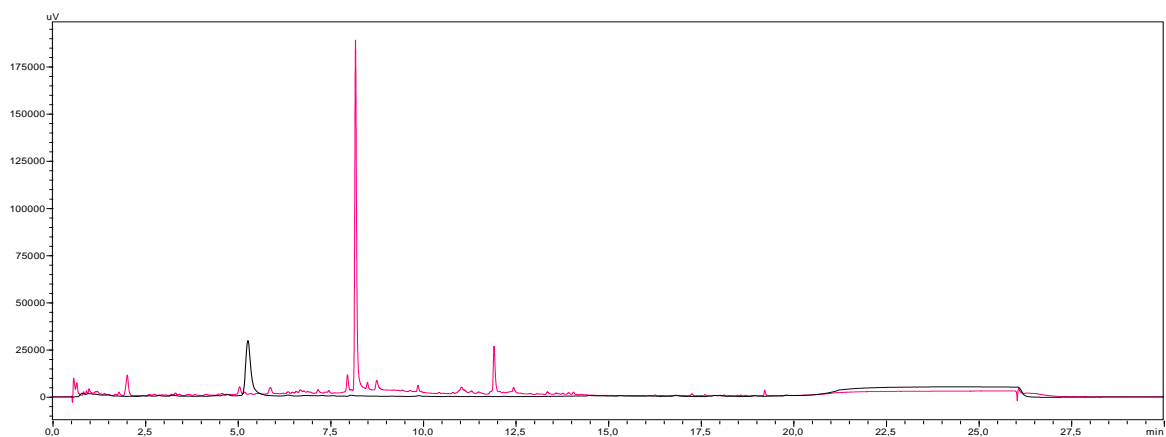
Vzorec	Vrsta gobe
2e	<i>Fomes fomentarius</i>
2e(M) – združene 7., 9., 10., 11. in 12. frakcija	<i>Fomes fomentarius</i>
12e	<i>Gleophyllum odoratum</i>
12e(M) – združene 7., 9., 10., 11. in 12. frakcija	<i>Gleophyllum odoratum</i>
8e(V)	<i>Bjerkandera adusta</i>
8e(V) – 1. frakcija	<i>Bjerkandera adusta</i>
8e(V) – 13. frakcija	<i>Bjerkandera adusta</i>

Legenda:

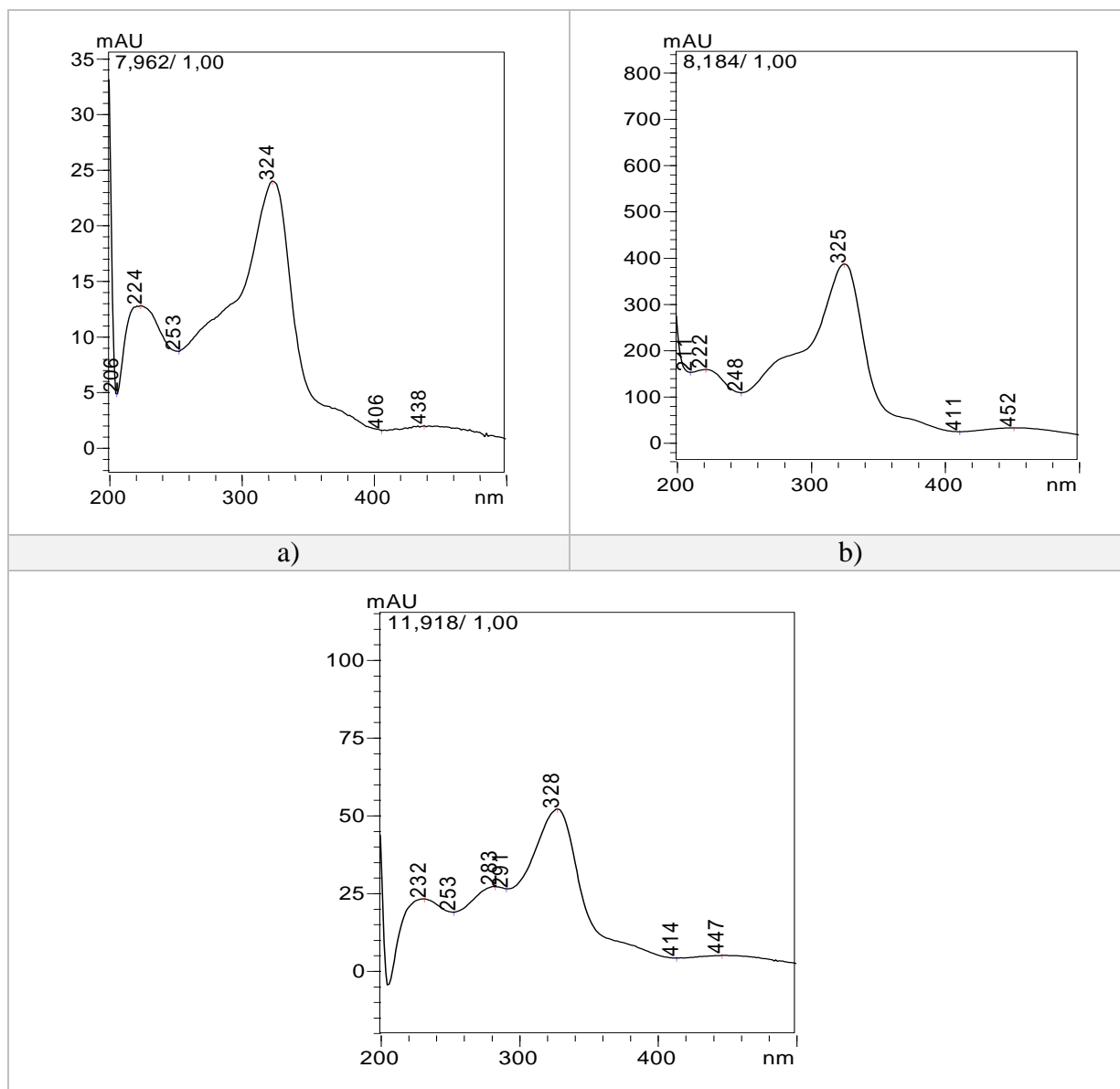
- Črna – fluorescenca ( $\lambda_{\text{ex}} = 330 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ )
- Roza – UV-VIS ( $\lambda = 288 \text{ nm}$ )
- Modra – UV-VIS ( $\lambda = 350 \text{ nm}$ )



Slika 39 HPLC kromatogram vzorca 2e



**Slika 40** HPLC kromatogram združenih frakcij vzorca 2e(M)

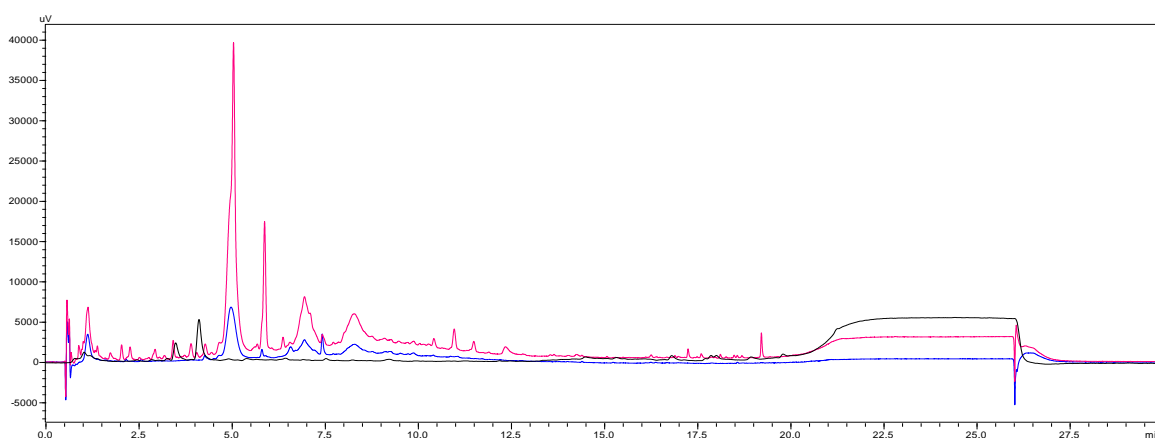




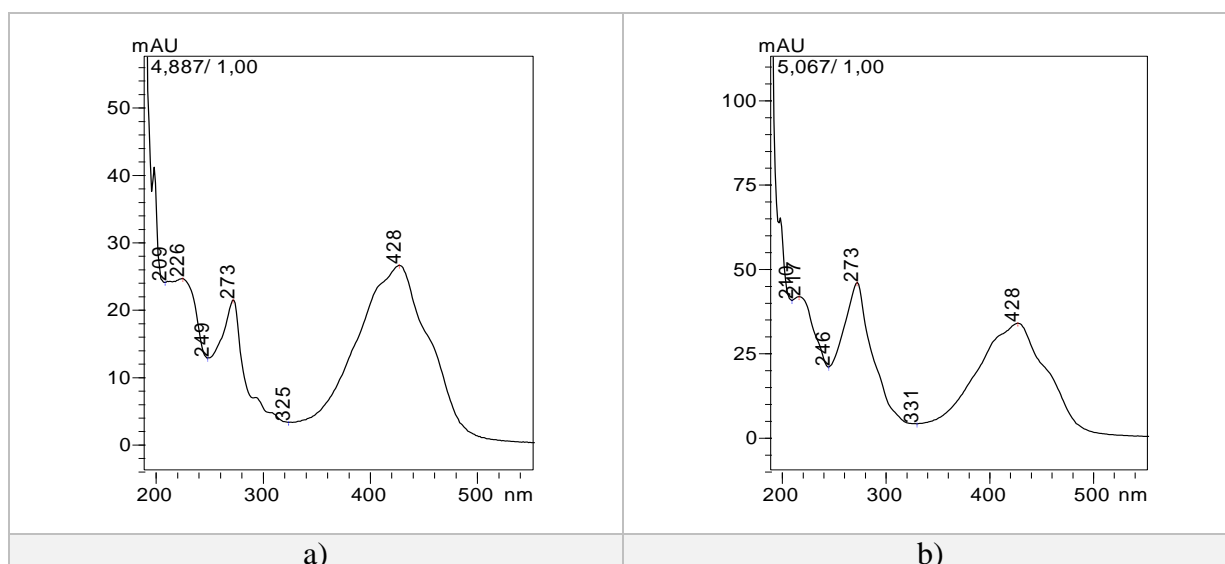
c)

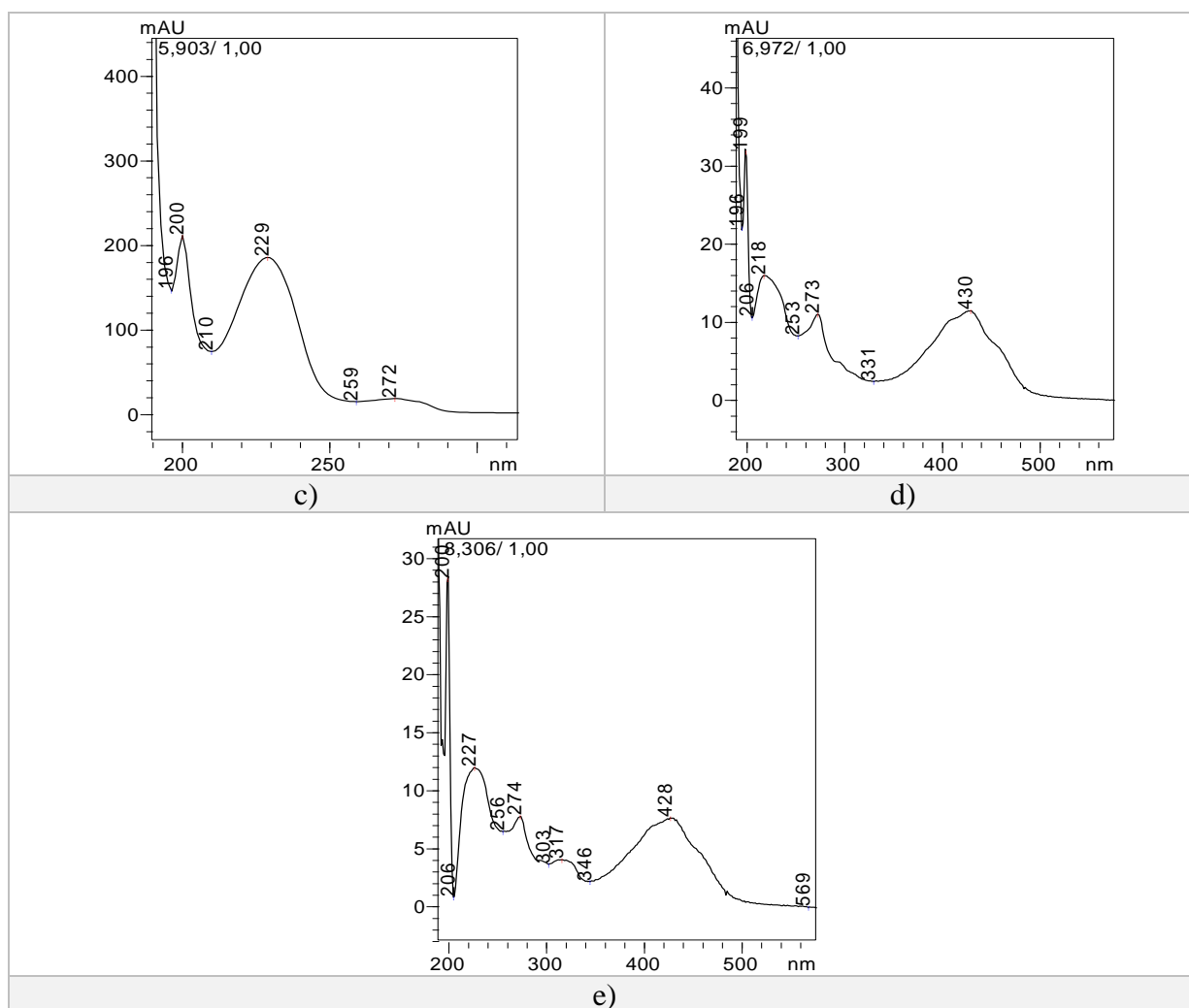
**Slika 41** Absorpcijski spektri aktivnih frakcij vzorca 2e(M) pri a)  $t_R = 7,962$ , b)  $t_R = 8,184$  in c)  $t_R = 11,918$

Na **Sliki 39** vidimo več signalov pri  $\lambda = 288$  nm in pri  $\lambda = 350$  nm ter en močnejši signal molekule, ki fluorescira. Gre za celoten vzorec 2e, kjer je prisotno veliko število spojin. **Slika 40** prikazuje kromatogram očiščenega vzorca 2e, kjer je prisotnih manj molekul. Vse so manjše od 3 kDa. Rezultat tega je tudi manjše število spektrov: vidimo tri močnejše signale, ki so prikazani z absorpcijskimi spektri na **Sliki 41**. Signal spojine, ki fluorescira, se ponovi na **Sliki 39** in **Sliki 40**, prav tako močnejši signal pri retencijskem času približno 8,2 min.



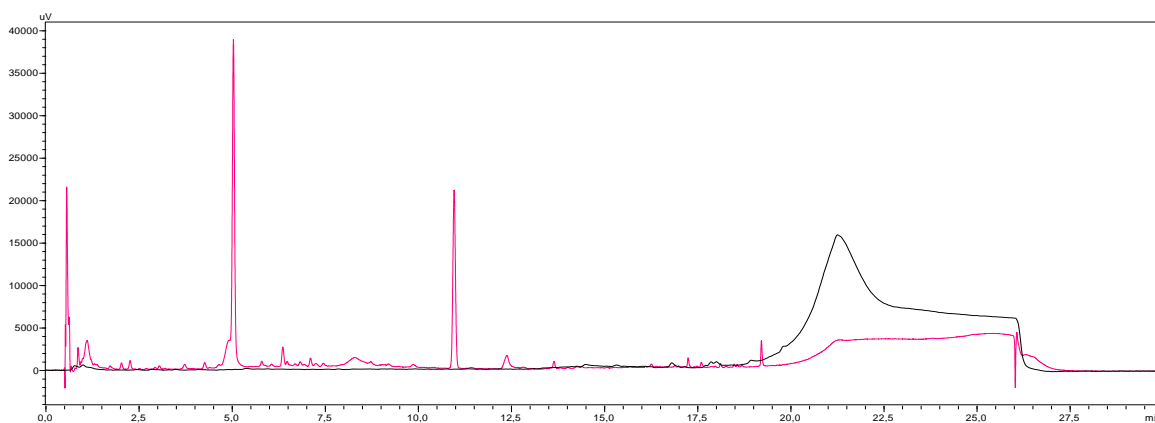
**Slika 42** HPLC kromatogram vzorca 12e



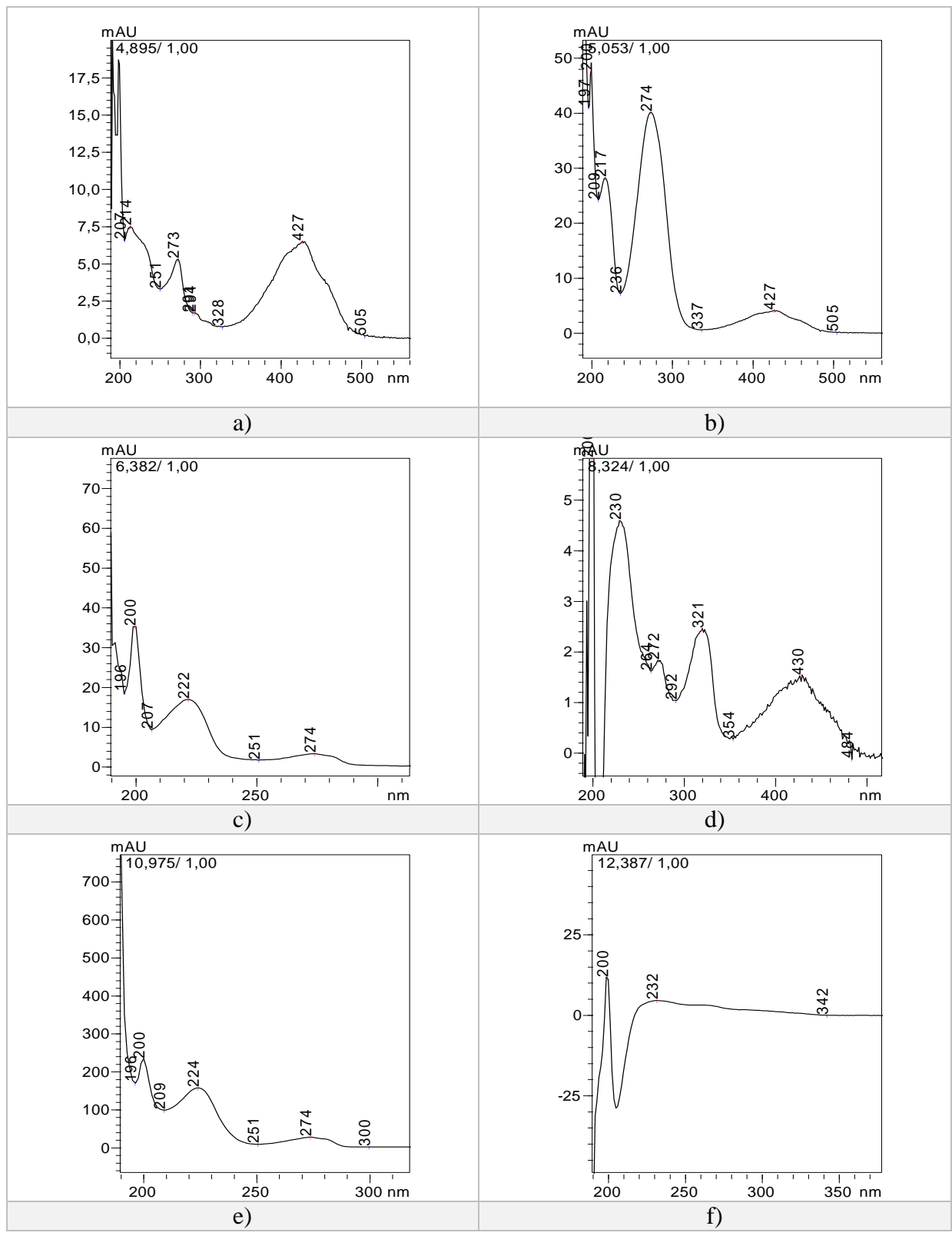


**Slika 43** Absorpcijski spektri vzorca 12e pri a) t<sub>R</sub> = 4,887, b) t<sub>R</sub> = 5,067, c) t<sub>R</sub> = 5,903, d) t<sub>R</sub> = 6,972 in e) t<sub>R</sub> = 8,306

**Slika 42** predstavlja vzorec 12e. Opazimo več signalov pri  $\lambda = 288$  nm in pri  $\lambda = 350$  nm ter dva signala molekul, ki fluorescirata. Absorpcijski spektri spojin z močnejšimi signali so prikazani na **Sliki 43**.

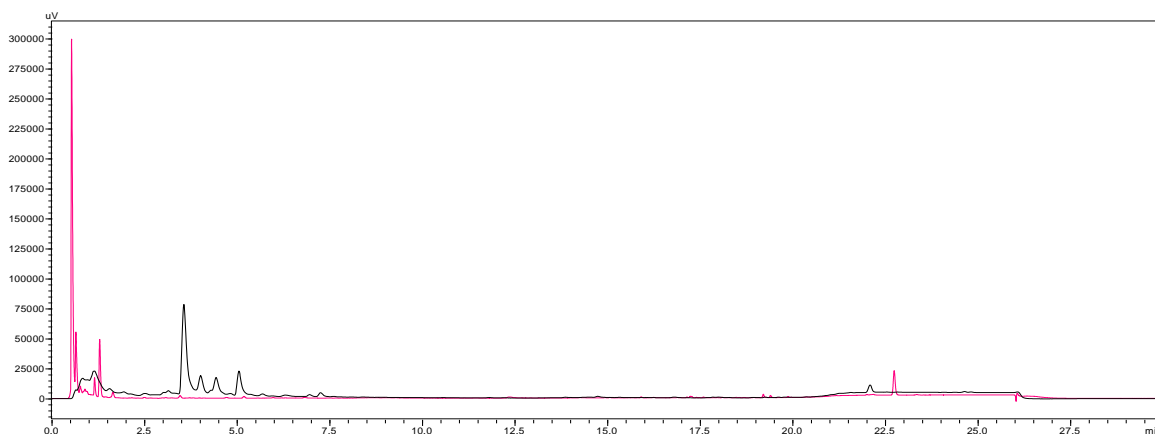


**Slika 44** HPLC kromatogram združenih frakcij vzorca 12e(M)

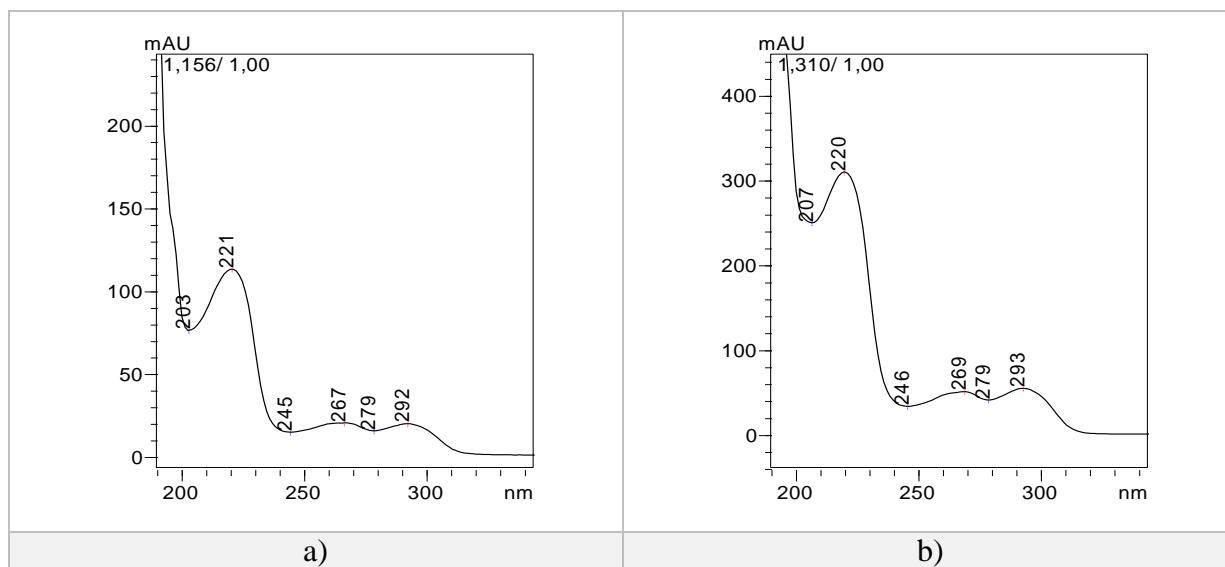


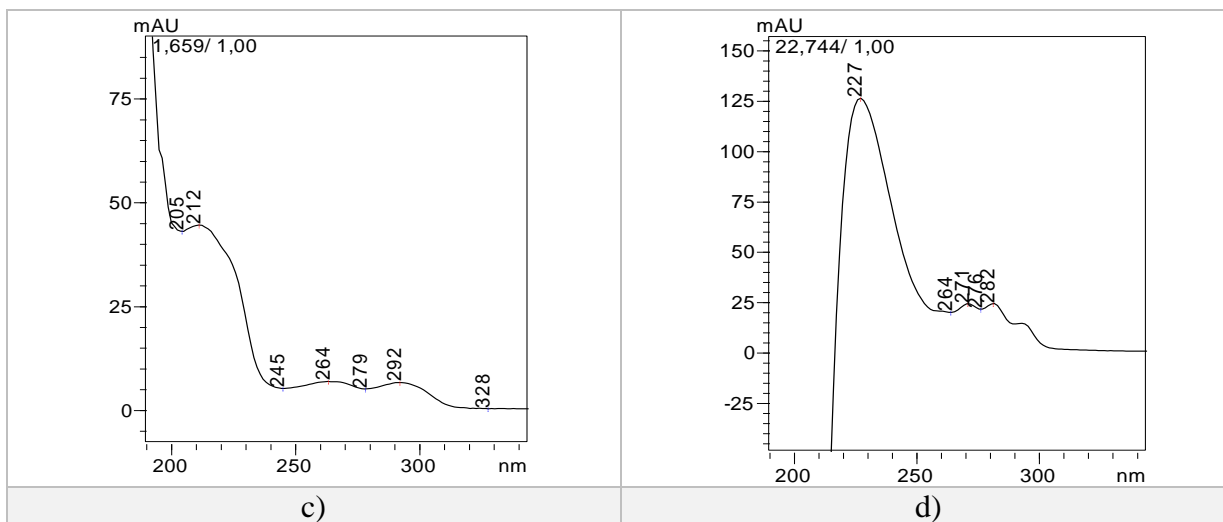
**Slika 45** Absorpcijski spektri združenih frakcij vzorca 12e(M) pri a)  $t_R = 4,895$ , b)  $t_R = 5,053$ , c)  $t_R = 6,382$ , d)  $t_R = 8,324$ , e)  $t_R = 10,975$  in f)  $t_R = 12,387$

**Slika 44** prikazuje HPLC kromatogram združenih aktivnih frakcij vzorca 12e(M), kjer vidimo več signalov pri  $\lambda = 288$  nm. Signalov je manj kot pri celem vzorcu 12e, kar pomeni, da smo vzorec uspeli precej očistiti. Šest močnejših signalov je prikazanih na **Sliki 45** v obliki absorpcijskih spektrov. Močan signal iz **Slike 44** pri retencijskem času približno 5 min opazimo tudi na **Sliki 42**.

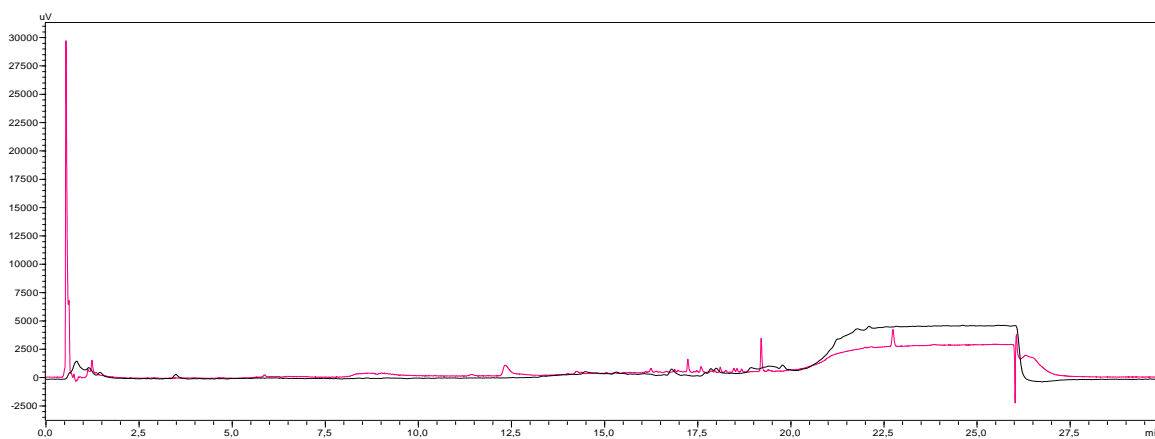


**Slika 46** HPLC kromatogram vzorca 8e(V)

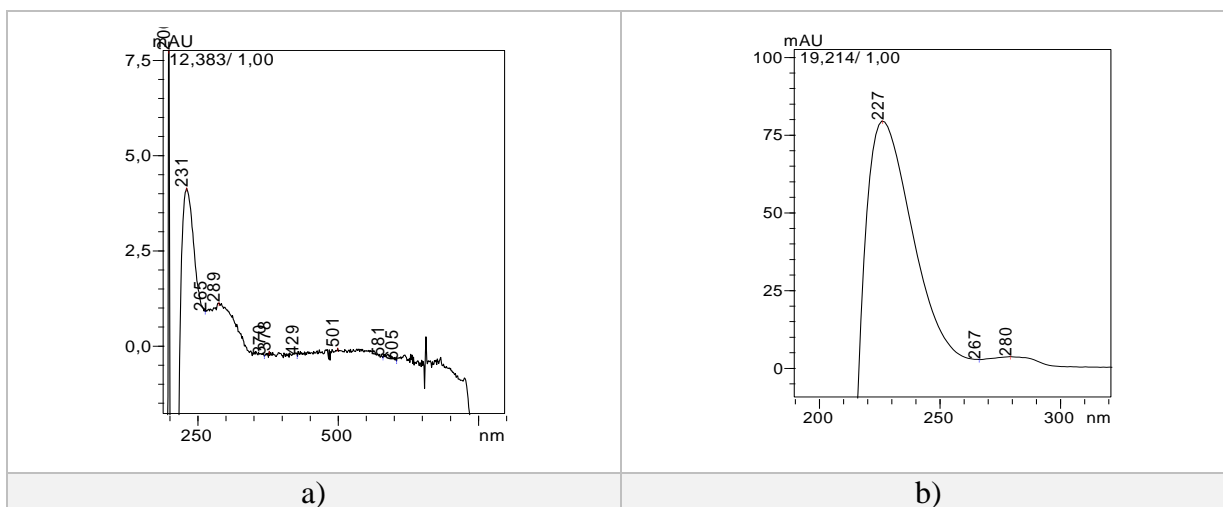


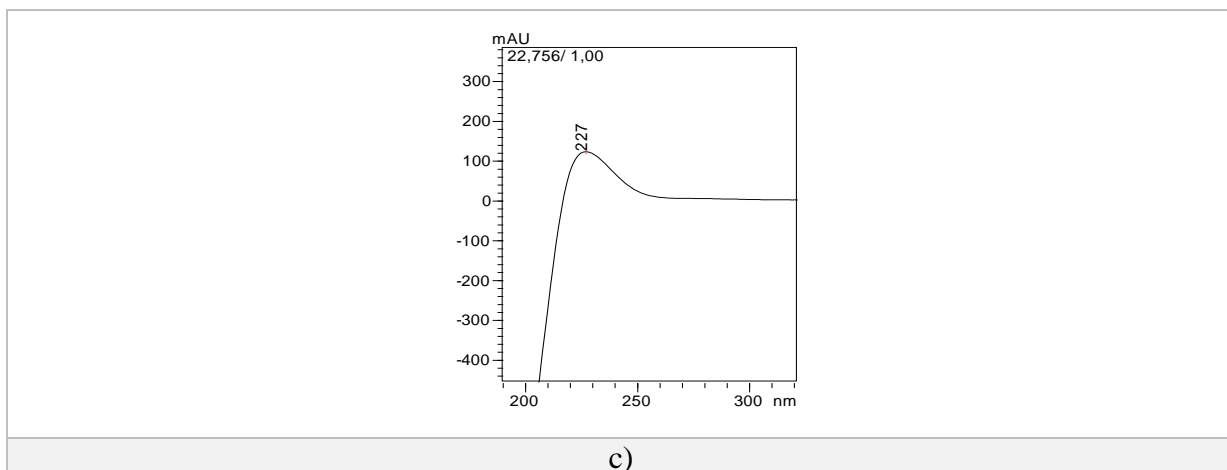


**Slika 47** Absorpcijski spektri vzorca 8e(V) pri a)  $t_R = 1,156$ , b)  $t_R = 1,310$ , c)  $t_R = 1,659$  in d)  $t_R = 22,744$

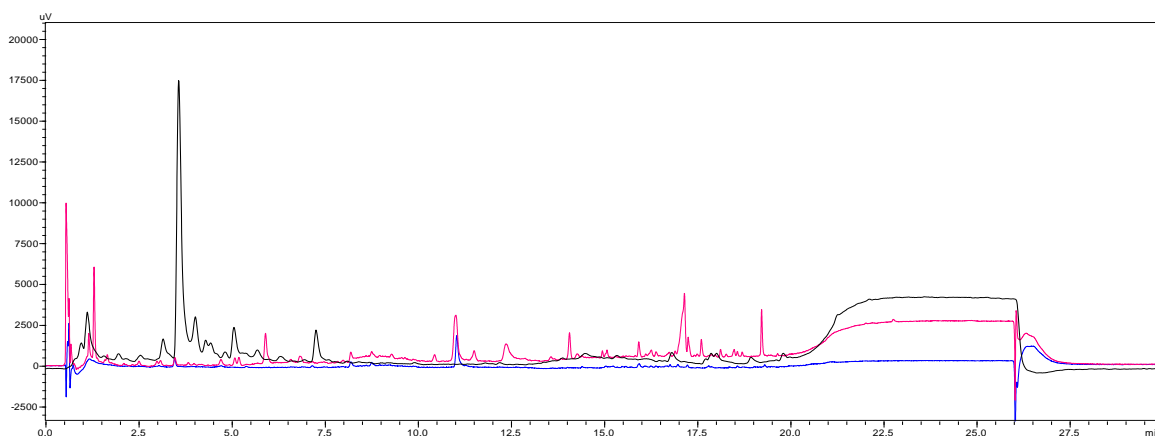


**Slika 48** HPLC kromatogram 1. frakcije vzorca 8e(V)

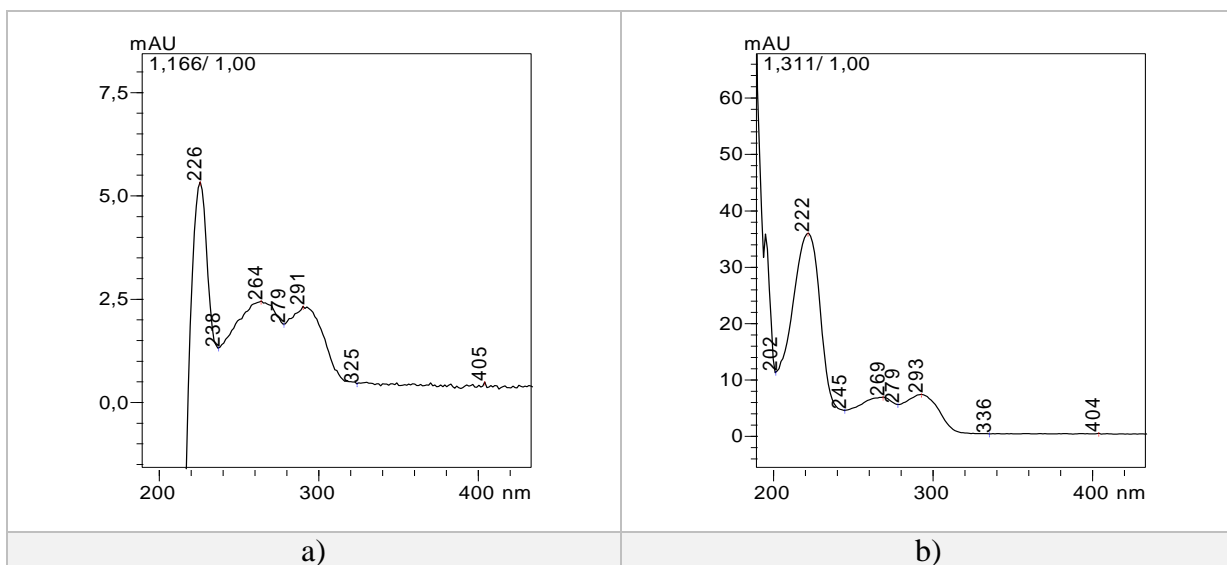


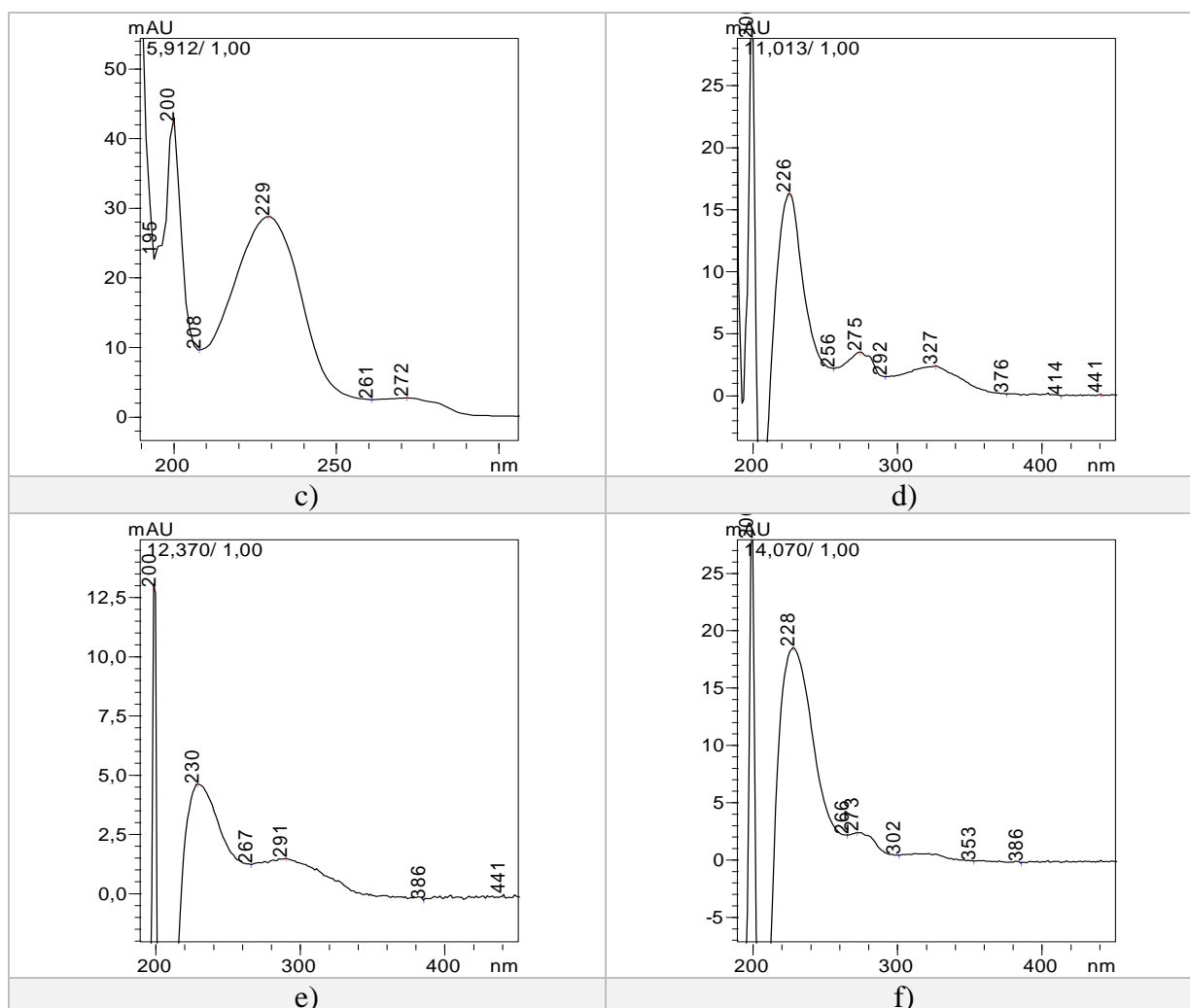


**Slika 49** Absorpcijski spektri 1. frakcije vzorca 8e(V) pri a)  $t_R = 12,383$ , b)  $t_R = 19,214$ , c)  $t_R = 22,756$



**Slika 50** HPLC kromatogram 13. frakcije vzorca 8e(V)





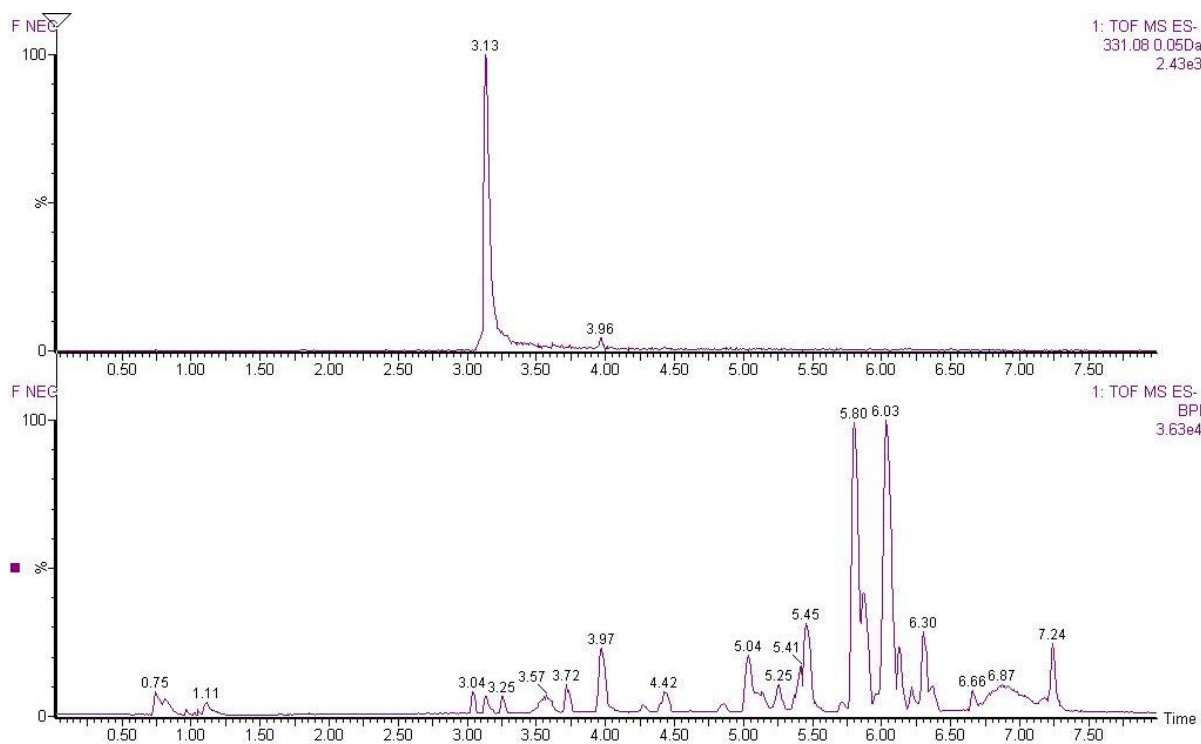
**Slika 51** Absorpcijski spektri 13. frakcije vzorca 8e(V) pri a)  $t_R = 1,166$ , b)  $t_R = 1,311$ , c)  $t_R = 5,912$ , d)  $t_R = 11,013$ , e)  $t_R = 12,370$  in f)  $t_R = 14,070$

Na **Sliki 46** je prikazan kromatogram celega vzorca 8e(V), kjer vidimo štiri močnejše signale molekul, ki fluorescirajo in nekaj signalov pri  $\lambda = 288$  nm. Absorpcijski spektri so predstavljeni na **Sliki 47**. 1. frakcija vzorca 8e(V) na **Sliki 48** ne vsebuje veliko molekul, saj vidimo le nekaj vrhov pri  $\lambda = 288$  nm. Razlog za malo število vrhov je mogoče ta, da se je večina molekul vezala na stacionarno fazo in se ni sprala z vodo, se pa je eluirala molekula, ki je povzročila zaviranje encima. Absorpcijske spektre treh močnejših signalov prikazuje **Slika 49**. Iz **Slike 50** je razvidno, da ima 13. frakcija vzorca 8e(V) veliko število molekul pri obeh valovnih dolžinah, nekaj jih tudi fluorescira. Na **Sliki 51** vidimo absorpcijske spektre izbranih vrhov. Zanimivo je, da je pri tej frakciji večje število zaznanih molekul kot v celem vzorcu 8e(V). Možno je, da sta bila vzorca zamenjana ali pa je prišlo do napake med meritvami.

Ker smo želeli preveriti vsebnost separiranih vzorcev in identificirati komponente, smo vzorce analizirali z metodo LC-MS.

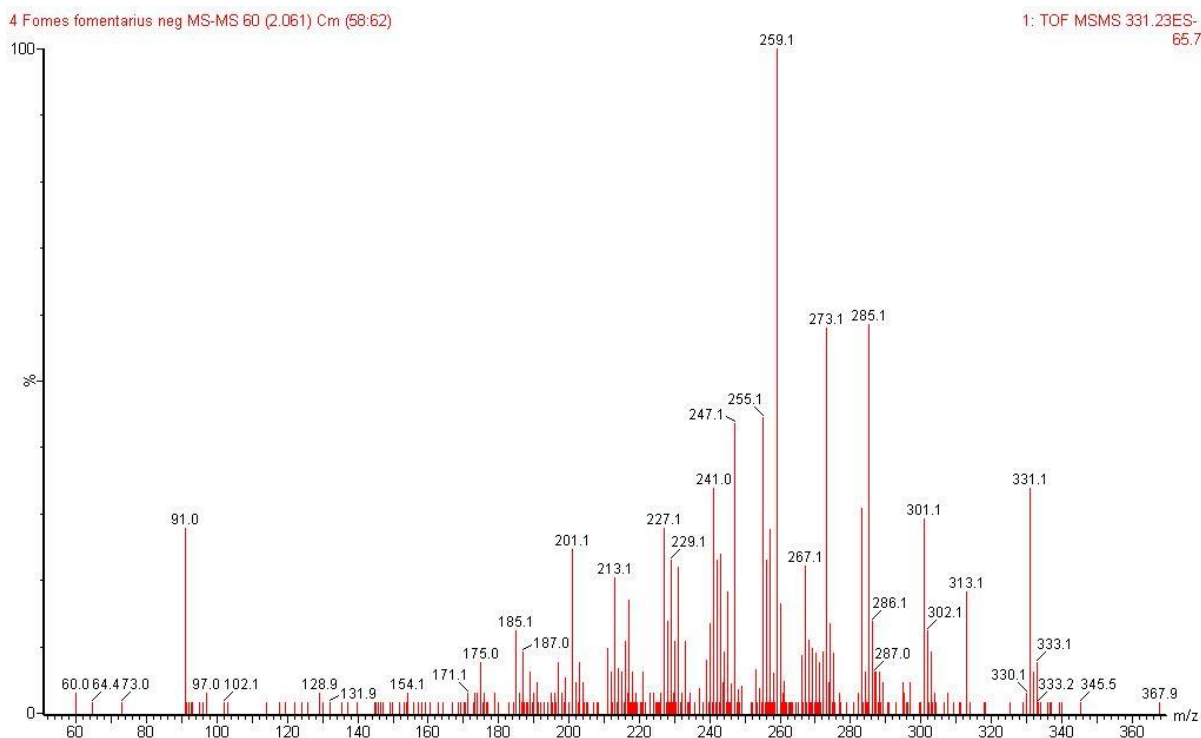
## 4.5. REZULTATI MERITEV LC-MS

Pred začetkom analiziranja in identificiranja molekul v vzorcih smo zbrali informacije glede sestave gob *Fomes fomentarius* in *Gleophyllum odoratum*. Vzorcev gobe *Bjerkandera adusta* nismo vključili, saj so aktivne spojine visokomolekularne, ki niso primerne za analizo z našo metodo LC-MS. Za ionizacijo smo uporabili metodo razprševanja raztopin v električnem polju (ESI) in masni analizator na osnovi časa preleta (TOF).



**Slika 52** Masni spekter fomentariola (zgoraj) in masni spekter združenih frakcij vzorca 2e(M)



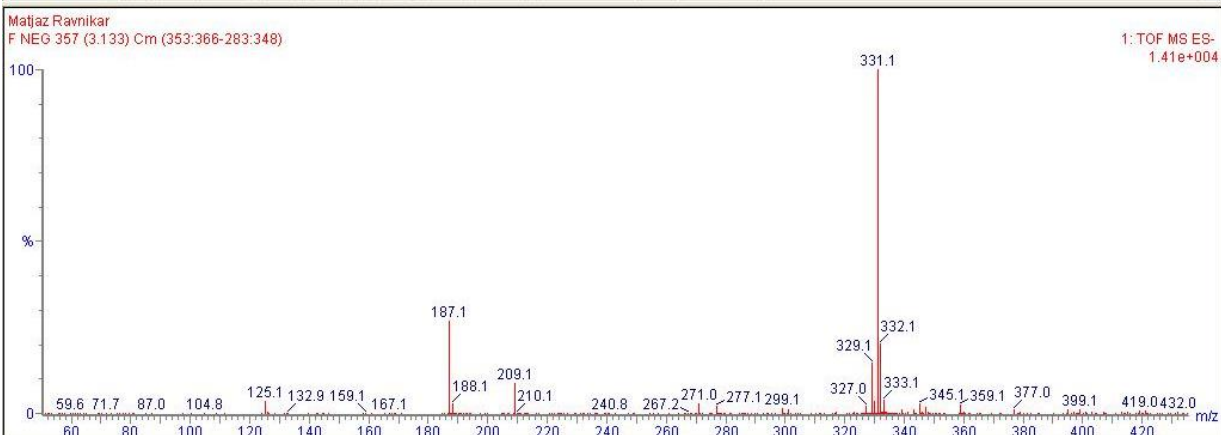


Slika 53 Masni spekter združenih frakcij vzorca 2e(M)

Single  1: TOF MS ES-1.41e+004

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 100.0  
 Element prediction: Off  
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3  
 Monoisotopic Mass, Even Electron Ions  
 765 formula(e) evaluated with 9 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)  
 Elements Used:

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT (Norm)	C	H	N	O
331.0820	331.0818	0.2	0.6	10.5	C17 H15 O7	204.3	0.0	17	15		7
331.0831	331.0831	-1.1	-3.3	15.5	C18 H11 N4 O3	208.0	3.7	18	11	4	3
331.0791	331.0791	2.9	8.8	11.5	C13 H11 N6 O5	210.4	6.1	13	11	6	5
331.0804	331.0804	1.6	4.8	16.5	C14 H7 N10 O	210.7	6.4	14	7	10	1
331.0850	331.0850	-3.0	-9.1	2.5	C6 H15 N6 O10	215.5	11.2	6	15	6	10
331.0836	331.0836	-1.6	-4.8	8.5	C3 H7 N16 O4	217.5	13.3	3	7	16	4
331.0823	331.0823	-0.3	-0.9	3.5	C2 H11 N12 O8	217.8	13.6	2	11	12	8
331.0850	331.0850	-3.0	-9.1	13.5	C4 H3 N20	217.9	13.6	4	3	20	
331.0809	331.0809	1.1	3.3	-1.5	C H15 N8 O12	218.3	14.0	1	15	8	12



Slika 54 Masni spekter in elementna sestava fomentariola

Posneli smo masne spektre vseh vzorcev in frakcij. Na **Sliki 52** zgoraj vidimo masni spekter, kjer opazimo močnejši vrh, ki pripada molekuli fomentariola. Na isti sliki spodaj je predstavljen masni spekter združenih frakcij vzorca 2e(M), kjer vidimo več vrhov, ki pripadajo različnim spojinam v vzorcu. **Slika 53** predstavlja rezultate meritve tandemске masne spektrometrije MS/MS za vzorec združenih frakcij 2e(M). Vidimo veliko zaznanih vrhov, med drugim tudi vrh z molekulsko maso 331,1. Isti vrh smo nato identificirali tudi s tandemsko masno spektrometrijo v vzorcu fomentariola, ki je prikazan na **Sliki 54** in nam je služil kot standard. Vrhu smo določili tudi elementno sestavo C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>, ki pripada molekuli fomentariola z monoizotopno molekulsko maso 332,09 g/mol [35]. Prisoten je v ESI+ (MH+333) in ESI- (M-H- 331) in smo ga zato edinega lahko z gotovostjo potrdili.

## 5. RAZPRAVA

Zaviralne lastnosti spojin, ki se nahajajo v rastlinah (flavonoidi, alkaloidi, terpenoidi, antocianini, glikozidi) so v nedavnih študijah že preizkušali na encimu alfa-glukozidaza in jih označili kot potencialne spojine za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2 [31] [32]. Znano je, da naj bi prehrana, bogata s sadjem in zelenjavo, zmanjšala tveganje za razvoj sladkorne bolezni. Ugotovljeno je bilo, da polifenoli kvercin, kvercitrin in rutin uspešno zavirajo delovanje encima alfa-glukozidaza in DPP IV, salicilna kislina zavira delovanje encima alfa-amilaza ter nordihidrogvaiaretinska kislina uspešno zavira vse tri encime [36].

Predstavljeni rezultati na **Sliki 6** kažejo močno zaviralno delovanje etanolnega vzorca gobe *Fomes fomentarius* (2e) in *Gleophyllum odoratum* (12e) na encim alfa-glukozidaza. Prvi je zavrl delovanje encima za 67,2 %, drugi pa za 69,1 %. Na **Sliki 29** so predstavljene zaviralne aktivnosti vzorcev gob na encim DPP IV. Razberemo lahko, da najmočnejše zaviranje encima zopet povzročita ista vzorca gob. Etanolni vzorec gobe *Fomes fomentarius* (2e) je zavrl delovanje encima DPP IV za 39,2 %, etanolni vzorec gobe *Gleophyllum odoratum* (12e) pa za 60,7 %. Zanimivo je, da smo tako mi, kot tudi raziskovalci v študiji [36] ugotovili, da encim alfa-glukozidaza in DPP IV zavirajo iste spojine oziroma isti vzorci. Pričakovali smo namreč, da bodo zaviralci encima alfa-glukozidaza po strukturi podobni zaviralcem encima alfa-amilaza, glede na to, da oba katalizirata hidrolizo ogljikovih hidratov, medtem, ko so endogeni substrati encima DPP IV peptidi. S separacijskimi metodami smo uspeli ugotoviti, da so aktivne spojine v obeh vzorcih nizkomolekularne (manjše od 3 kDa).

Izolirali so že precej spojin, ki se nahajajo v gobi *Fomes fomentarius*: fomentariol [12], ergosteroli, ergostenoni [37], steroidi, fenil-etandoli [38], ter v gobi *Gleophyllum odoratum*: ergosteroli, derivati lanostana, steroli [37]. Sami smo na podlagi zbranih informacij o dosedanjih izoliranih spojinah iz obeh gob želeli identificirati aktivne spojine s pomočjo

metode LC-MS, a smo z zagotovostjo lahko potrdili le prisotnost fomentariola v vzorcu gobe *Fomes fomentarius*, ki je uspešno zavirala delovanje encima alfa-glukozidaza in DPP IV. V pomoč nam je bila le molekulska masa fomentariola, saj druge informacije o molekuli (absorpcijski spekter, fluorescenca) niso na voljo.

Da je za zmanjšano aktivnost encima alfa-glukozidaza odgovoren prav fomentariol, nam kažejo rezultati meritev na **Sliki 14**. Vidimo, da je izoliran fomentariol s koncentracijo 6,0 mg/mL zavrl delovanje encima za 94,2 %, akarboza, ki je znana kot močan zaviralec encima alfa-glukozidaza, pa je s koncentracijo 8,0 mg/mL zavrla encimsko aktivnost za 94,3 %. **Slika 38** pa nam potrjuje, da je fomentariol odgovoren tudi za zaviralno aktivnost gobe *Fomes fomentarius* na encim DPP IV, saj je s koncentracijo 3,0 mg/mL zavrl delovanje encima za 88,9 %.

Mnogo raziskav je bilo narejenih tudi na temo inhibitorjev alfa-amilaze. Odkrili so že preko 800 rastlin z zaviralnim delovanjem na encim, med drugim so zaviralne aktivnosti pokazali *Ginkgo biloba*, *Melissa officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Punica granatum*. V študiji sta izjemne zaviralne učinke na encim alfa-amilaza pokazala flavon luteolin in polifenol fisetin, ki sta zmanjšala delovanje encima za približno 50 – 100 %. Prav tako sta pokazala dobre zaviralne aktivnosti tudi rožmarinska kislina in izoflavon daidzein [18]. Izmed naših 16 lesnih gob je najmočnejše zaviranje encima izkazal etanolni ekstrakt gobe *Bjerkandera adusta*. Na **Sliki 25** vidimo, da je s koncentracijo 2 mg/mL zavrl delovanje encima za 58,7 %. S kasnejšimi separacijskimi metodami smo ugotovili, da so aktivne spojine v gobi večinoma visokomolekularne (večje od 3 kDa), vendar vzorca nismo mogli analizirati z izbrano metodo LC-MS, saj je bila primerna za identifikacijo nizkomolekularnih spojin.

Z zgornjimi rezultati smo prvi uspeli ugotoviti in dokazati, da ima fomentariol v gobi *Fomes fomentarius* antidiabetične učinke. Nedavno je že bila narejena študija, kjer so na miškah preizkušali antidiabetično delovanje izvlečkov iz gobe *Fomes fomentarius*. Dokazali so, da ti izvlečki povzročijo znižanje nivoja glukoze v krvi za 31,35 % in znižanje nivoja holesterola za 5,23 %. Sklepali so, da so za znižanje koncentracije glukoze v krvi odgovorne inzulinu podobne spojine v gobi oziroma spojine, ki povečajo porabo sladkorja v periferiji [11], niso pa uspeli identificirati aktivne spojine.

## 6. SKLEP

V okviru magistrske naloge smo želeli ugotoviti morebitne zaviralne aktivnosti naravnih spojin, ki se nahajajo v lesnih gobah in so široko zastopane v slovenskih gozdovih. Zaviralne lastnosti smo preverjali na presnovnih encimih, ki predstavljajo pomembno tarčo za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2: alfa-glukozidaza, alfa-amilaza in DPP IV. S pomočjo separacijskih metod smo poskušali pridobiti čim bolj očiščene vzorce. Najbolj obetavne rezultate so pokazali vzorci gob:

- *Fomes fomentarius* na encim alfa-glukozidaza in DPP IV
- *Gleophyllum odoratum* na encim alfa-glukozidaza in DPP IV ter
- *Bjerkandera adusta* na encim alfa-amilaza.

Iz gobe *Fomes fomentarius* smo uspeli izolirati aktivno molekulo fomentariol, ki je zavirala delovanje encima DPP IV in alfa-glukozidaze za približno 90 %, kar je primerljivo z zaviralci, ki že obstajajo na trgu in se uporabljajo pri zdravljenju sladkorne bolezni tipa 2. S pomočjo metode LC-MS smo v gobi *Fomes fomentarius* identificirali in potrdili prisotnost fomentariola, ki predstavlja potencialno alternativo zdravljenja sladkorne bolezni tipa 2, saj bi z uživanjem te aktivne molekule lahko preprečili postprandialno hiperglikemijo na dveh mestih. Povzamemo lahko, da je narava bogat vir spojin, ki lahko pripomorejo k preventivnemu, kurativnemu in podpornemu zdravljenju mnogih bolezni. Ena izmed naravnih aktivnih molekul, ki obetajo veliko, je zagotovo tudi fomentariol, ki smo mu prvi uspeli dokazati antidiabetično delovanje.

## 7. LITERATURA

- [1] Ribarič S, Temelji patološke fiziologije, 2. izdaja, UL MF Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2011: 86-93.
- [2] Cefalu WT, Standards of Medical Care in Diabetes, The journal of clinical and applied research and education, 2017, 40(1): 14-17.
- [3] Cheng AYY et al, Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus, Canadian Medical Association Journal, 2005, 172(2): 213-226.
- [4] Kreft S in Kočevar Glavač N, Sodobna fitoterapija: z dokazi podprta uporaba zdravilnih rastlin, 2. izdaja, Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo, 2013: 631-633.
- [5] Petre M, Mushroom Biotechnology, Developments and Applications, Chapter 7: Sclerotium-forming mushrooms as an emerging source of medicinals: current perspectives, Academic Press, 2016(1): 111-136.
- [6] Boa E, Wild edible fungi, Food and agriculture organization of the united nations, Rome, 2004: 8-10.
- [7] [https://sl.wikipedia.org/wiki/lesne\\_glive](https://sl.wikipedia.org/wiki/lesne_glive) (Dostop: 9. september 2017).
- [8] [eprints.gozdis.si/1562/1/Pohleven\\_kresilna\\_goba.pdf](http://eprints.gozdis.si/1562/1/Pohleven_kresilna_goba.pdf) (Dostop: 9. september 2017).
- [9] Kreft S in Kočevar Glavač N, Sodobna fitoterapija: z dokazi podprta uporaba zdravilnih rastlin, 2. izdaja, Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo, 2013: 646.
- [10] Kim SH et al, Apoptotic properties of polysaccharide isolated from fruiting bodies of medicinal mushroom *Fomes fomentarius* in human lung carcinoma cell line, Saudi Journal of Biological Sciences, 2015, 22: 484-490.
- [11] Mircea C et al, The protective effect of mushrooms in experimentally induced diabetes in mice, Farmacia, 2013, 61(2): 268-275.
- [12] Arpin N, Le fomentariol: nouvelle benzotropolone isolee de *Fomes fomentarius*, Phytochemistry, 1974, 13: 1949-1952.

- [13] Herz W et al, Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Wien: Springer-Verlag Wien, 1987: 87-88.
- [14] [eprints.gozdis.si/1568/1/Humar\\_dišeča\\_tramovka.pdf](http://eprints.gozdis.si/1568/1/Humar_dišeča_tramovka.pdf) (Dostop: 9. september 2017).
- [15] Muhammad T et al, Synthesis of new oxadiazole as  $\alpha$ -glucosidase inhibitors, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2015, 23: 4155-4162.
- [16] Constantino HR et al, Purification and Characterisation of an  $\alpha$ -Glucosidase from a Hyperthermophilic Archaeobacterium, Pyrococcus furiosus, Exhibiting a Temperature Optimum of 105 to 115, Journal of Bacteriology, 1990: 3654-3660.
- [17] Xi Peng et al, Inhibitory kinetics and mechanism of kaempferol on  $\alpha$ -glucosidase, Food Chemistry, 2016, 190: 207-215.
- [18] De Sales PM et al,  $\alpha$ -amylase inhibitors: A review of Raw Material and Isolated Compounds from Plant Source, Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences, 2012: 141-183.
- [19] Jeraj M, Določanje aktivnosti amilaze in lipaze pri bolnikih z akutnim in kroničnim pankreatitisom, Diplomaska naloga, Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2014.
- [20] Nair SS et al, In vitro studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts, European Journal of Experimental Biology, 2013, 3(1): 128-132.
- [21] Ali H et al,  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to Phyllanthus amarus, Journal of Ethnopharmacology, 2016: 449-455.
- [22] Patel BD et al, Recent approaches to medicinal chemistry and therapeutic potential of dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors, European Journal of Medicinal Chemistry, 2014, 74: 574-605.
- [23] Thompson A et al, Type 2 Diabetes Mellitus and Glucagon Like Peptide-1 Receptor Signalling, Clinical & Experimental Pharmacology, 2013: 3-4.

- [24] Vončina DB, Analizna kemija II, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru, Maribor, 2006: 77.
- [25] Štrukelj B in Kos J, Biološka zdravila: od gena do učinkovine, 1. izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 338-339.
- [26] Arguilar MS, HPLC of Peptides and Proteins, Methods and Protocols, Humana Press Totowa, New Jersey, 2004, 251: 3-5.
- [27] [https://en.wikipedia.org/wiki/liquid\\_chromatography\\_mass\\_spectrometry](https://en.wikipedia.org/wiki/liquid_chromatography_mass_spectrometry) (Dostop: 9. september 2017).
- [28] Povše R et al, PROTEOMIKA-OSNOVE IN UPORABA PRI PROUČEVANJU SUŠNEGA STRESA RASTLIN, Hmeljarski bilten/Hop Bulletin, 2013: 21-37.
- [29] Matsui T et al, Alpha-glucosidase inhibition assay in an enzyme-immobilized amino-microplate, Analytical Sciences, 2009, 25: 559-562.
- [30] [www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/1/mak088bul.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/1/mak088bul.pdf) (Dostop: 8. september 2017).
- [31] Kumar S et al,  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes, Pharmacognosy Review, 2011, 5(9): 19-29.
- [32] Yin Z et al,  $\alpha$ -glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants, Food Science and Human Wellness, 2014, 3: 136-174.
- [33] Povzetek glavnih značilnosti zdravila Glucobay (Dostop: 9. september 2017).
- [34] Grover JK et al, Medicinal plants of India with antidiabetic potential, Journal of Ethnopharmacology, 2002, 81(1): 81-100.
- [35] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/21675848#section=Top> (Dostop: 24. avgust 2017).
- [36] Roškar I et al, Screening of phenolic compounds reveals inhibitory activity of nordihydroguaiaretic acid against three enzymes involved in the regulation of blood

glucose level, *Plant Foods for Human Nutrition*, 2016, 71(1): 88-89.

[37] Rösecke J et al, Constituents of various wood-rotting basidiomycetes, *Phytochemistry*, 2000: 603-610.

[38] Zhao J et al, Three new phenyl-ethanediols from the fruiting bodies of the mushroom *Fomes fomentarius*, *Journal of Asian Natural Products Research*, 2013, 15(3): 310-314.