

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA VIRAJ

**REŠETANJE IN VREDNOTENJE ZA VIRALNE AKTIVNOSTI
SPOJIN NARAVNEGA IZVORA IN IZVLEČKA SKORJE BELE
JELKE NA ENCIM ALFA-GLUKOZIDAZA**

SCREENING AND EVALUATION OF INHIBITORY ACTIVITY
AGAINST ALPHA-GLUCOSIDASE BY NATURAL COMPOUNDS AND
ABIES ALBA BARK EXTRACT

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom doc. dr. MOJCE LUNDER, mag. farm.

Iskreno se zahvaljujem svoji mentorici doc. dr. MOJCI LUNDER, mag. farm. za nasvete, pomoč, usmerjanje in potrpežljivost pri izdelavi magistrske naloge.

Iskrena hvala tudi prof. dr. BORUTU ŠTRUKLJU mag. farm. za pomoč, usmerjanje in prijaznost.

Hvala tudi vsem, ki ste mi na kakršenkoli način pomagali pri izdelavi magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Mojce Lunder mag. farm.

Ljubljana, 2014

Tanja Viraj

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanko Srčič

Član diplomske komisije: doc. dr. Mojca Lunder

Član diplomske komisije: doc. dr. Simon Žakelj

VSEBINA

1. UVOD	1
1.1. Sladkorna bolezen	1
1.1.1. Sladkorna bolezen tipa 2	1
1.1.2. Zaviralci alfa-glukozidaze	2
1.2. O encimu alfa-glukozidaza	3
1.3. Inhibicija encimov	3
1.3.1. Kompetitivna inhibicija	3
1.3.2. Nekompetitivna inhibicija	4
1.3.2.1. Mešan tip nekompetitivne inhibicije	4
1.3.3. Akompetitivna inhibicija	5
1.3.4. Določevanje vrste inhibicije	5
1.4. Fenolne spojine in flavonoidi	6
1.4.1. Izvleček lubja bele jelke in piknogenol	8
2. NAMEN MAGISTRSKEGA DELA	9
3. MATERIALI IN METODE	10
3.1. Materiali	10
3.1.1. Biološki material	10
3.1.2. Kemikalije	10
3.1.3. Laboratorijska oprema	11
3.2. Metode	12
3.2.1. Izolacija encima α -glukozidaze iz ekstrakta podganjega črevesa	12
3.2.1.1. Izolacija encima α -glukozidaze (protokol, oznaka E1)	12
3.2.1.2. Izolacija encima α -glukozidaze (nadgrajen protokol, oznaka E2)	13
3.2.2. Merjenje aktivnosti encima v prisotnosti substrata 4-metilumbeliferil- α -D-glukopiranozida (MUG)	14

3.2.2.1 Določanje K_i	15
3.2.2.2. Določanje IC_{50}	16
3.2.3. Izračun kinetičnih parametrov K_m , V_{max} , K_i in določanje IC_{50}	16
4. REZULTATI	18
4.1. Reševanje med naravnimi inhibitorji α-glukozidaze	18
4.2. Inhibitorno delovanje abiPEG, abiW in pikW	18
4.3. Določanje K_i izbranim spojinam in akarbozi	19
4.4. Določanje IC_{50}	23
5. RAZPRAVA	25
6. SKLEP	28
7. LITERATURA	29

POVZETEK

Debelost in sladkorna bolezen tipa 2 sta bolezni, pri katerih v zadnjem stoletju beležimo porast obolelih. Poleg dedne nagnjenosti je ta porast prav gotovo odraz novodobnega načina življenja (način prehranjevanja, fizična aktivnost posameznika). Pri njunem preprečevanju, kot tudi zdravljenju se uporabljajo različna zdravila. Med drugim tudi zdravila iz skupine inhibitorjev encima α -glukozidaze. Ta encim se nahaja v prebavnem traktu večine sesalcev in skrbi za zadnji korak pri pretvorbi sestavljenih ogljikovih hidratov do glukoze. Glukoza se nato absorbira in povzroči porast sladkorja v krvi, kar pa ima pri omenjenih bolnikih neželjene učinke. Glede na hitrost porasta glukoze v krvi po obroku, se živila delijo na tista z visokim glikemičnim indeksom (hiter porast glukoze v krvi) in na tista z nizkim glikemičnim indeksom (počasen porast glukoze v krvi).

V magistrski nalogi smo preiskovali inhibitorne lastnosti na encim alfa-glukozidazo pri 34 naključno izbranih fenolnih spojinah rastlinskega izvora in pri izvlečku skorje bele jelke ali navadne jelke (*Abies alba*). Encim smo izolirali iz posušenega podganjega črevesa. V izolatu smo imeli prisotnih več različnih encimov, med drugim tudi preiskovani α -glukozidazo. Pri preizkušanju inhibitornih lastnosti spojin smo uporabili substrat 4-metilumbeliferil- α -D-glukopiranozid (MUG) in na koncu opravili meritev fluorescence. Encim α -glukozidaza cepi substrat MUG do 4-metilumbeliferona, ki emitira svetlobo pri valovni dolžini 445 nm (440-450 nm). Od 34 preizkušenih spojin je 10 bilo takšnih, ki so kazale inhibitorne lastnosti, zato smo le-te testirali naprej. Inhibicijo pa je izkazoval tudi izvleček iz skorje bele jelke. S pomočjo substrata MUG in merjenjem fluorescence smo izrisali Lieneweaver-Burk-ov diagram. Tako smo lahko izbranim spojinam določili tip inhibicije ter konstanto inhibicije (K_i). Izvlečku skorje bele jelke ter piknogenolu smo določili IC_{50} . S temi parametri smo vse spojine na koncu tudi primerjali med seboj in ocenili katera izmed njih ima najmočnejše inhibitorno delovanje. Za primerjavo smo izbrali že znan inhibitor akarbozo, ki se uporablja v terapiji preprečevanja posledic sladkorne bolezni tipa 2. Izvleček iz skorje bele jelke pa smo dodatno primerjali s podobnim in že uporabljanim izvlečkom piknogenol, ki se pridobiva iz skorje obmorskega bora (*Pinus pinaster*).

ABSTRACT

In the last century we have seen the number of people affected by type 2 diabetes and obesity rise. This increase is due to the modern way of living along with hereditary predispositions. There are many different treatments/medicines in use today for combating these ailments. One such medicine comes from the groups of medicines called alfa glucosidase inhibitors. This enzyme is located in the digestive tract of most mammals, its function being to transform complex carbohydrates into glucose. The glucose is then absorbed and causes a spike in the blood sugar level, which has negative effects on patients with diabetes. Depending on the speed of the spike in the blood sugar level we differentiate between foods that have a high glycemic index (spike in blood sugar level is fast) and those that have a low glycemic index (spike in blood sugar level is slow).

In this thesis we have investigated the inhibitor properties of 34 randomly selected natural compounds and *Abies alba* bark extract against the enzyme α -glucosidase. We isolated the enzyme from dried rat intestine. There were multiple enzymes present in the isolate, one of them being alfa glucosidase. We checked the inhibition with a method where we used 4-methylumbeliferil- α -D-glukopiranoside (MUG) substrate and measured the florescence. We carried out the method by stopping the reaction. Out of the 34 compounds that we tested, 10 were exhibiting inhibitor properties. In addition to these 10, *Abies alba* bark extract was also exhibiting inhibitor properties. We tested these 10 compounds further. Using the MUG substrate and measuring the florescence, we mapped a Lieneveawer-Burk diagram. Doing this allowed us to determine the type of inhibition and the constant of the inhibition (K_i). We determined the IC_{50} value for *Abies alba* bark extract and pycnogenol using the dose-response curve. In the end we compared all the compounds using these parameters and evaluated which one is the strongest inhibitor. For comparing purposes, we selected a known inhibitor called acarbose, which is used in treating and preventing the consequences of type 2 diabetes. We also compared *Abies alba* bark extract with pycnogenol, which is a similar extract that is obtained from the bark of *Pinus pinaster*.

SEZNAM OKRAJŠAV

AbiPEG – izvleček iz skorje (navadne) bele jelke (*Abies alba*), raztopljen v polietilenglikolu z molsko maso 400 g/mol in topilu iz DMSO/voda (1:3)

AbiW vodni izvleček iz skorje (navadne) bele jelke (*Abies alba*)

AK aminokislina

DDT diklorodifeniltrikloroetan

DMSO dimetilsulfoksid

E encim

EDTA etilendiamintetraocetna kislina

EI kompleks encim-inhibitor

ES kompleks encim-substrat

ESI kompleks encim-substrat-inhibitor

GIT gastrointestinalni trakt

HbA_{1c} glikiran hemoglobin

IC₅₀ koncentracija inhibitorja, ki zavre delovanje encima za polovico (50%)

K_{cat} katalitska konstanta

K_i konstanta inhibicije

K_m Michaelis-Mentenova konstanta

K_s konstanta disociacije za kompleks encim-substrat

MUG substrat 4-metilumbeliferil- α -D-glukopiranozid

NDGA nordihidrogvajaretinska kislina

P produkt

PEG polietilenglikol z molsko maso 400 g/mol

PikW vodni izvleček piknogenola

S substrat

UZ ultrazvok

V_{max} maksimalna hitrost encimske reakcije

UVOD

1.1. SLADKORNA BOLEZEN

Svetovna zdravstvena organizacija opredeljuje sladkorno bolezen kot *stanje kronične hiperglikemije*. Po dogovoru to pomeni *koncentracijo glukoze v krvi, ki je na tešče večja od 7,0 mmol/l*. V praksi se za ugotavljanje sladkorne bolezni uporablja test obremenjevanja z glukozo (t.i. *peroralni glukozni tolerančni test - OGTT*), kjer se poleg merjenja koncentracije glukoze na tešče, meri tudi koncentracija dve uri po zaužitju standardizirane količine glukoze; za diagnozo sladkorne bolezni mora biti ta koncentracija višja od 11 mM. Opisana opredelitev sladkorne bolezni je primerna za klinično rabo, ker omogoča sorazmerno enostavno prepoznavanje bolezni. S fiziološkega oziroma patofiziološkega stališča pa je sladkorno bolezen primerneje opredeliti kot *stanje, kjer gre za pomanjkanje učinkov inzulina*.

Gre torej za presnovno motnjo, ali točneje za okvaro mehanizmov, ki skrbijo za vzdrževanje normalne koncentracije glukoze v krvi. Glavne motnje te bolezni so posledica porušenega ravnotežja med učinki inzulina in učinki njegovih antagonistov v prid slednjih. Ker pa ima nastanek sladkorne bolezni različne vzroke so tudi različni poteki, in omenjena neuravnoteženost se lahko kaže na različne načine. Zaplete sladkorne bolezni, ki ogrožajo bolnika, delimo na akutne in kronične; temeljni vzrok za njihov nastanek je sicer enak (pomanjkanje učinkov inzulina), patofiziologija potekov enih in drugih pa se bistveno razlikuje.

Vzroki za nastanek sladkorne bolezni so - po patofiziološki opredelitvi te bolezni - vsi tisti dejavniki, ki pripeljejo do pomanjkanja učinkov inzulina. Vzroki za tako pomanjkanje so lahko različni in jih najdemo na tako rekoč vseh ravneh organizacije delovanja inzulina, od vzdraženja celic β v Langerhansovih otočkih trebušne slinavke, do procesov, ki jih sproži inzulin v tarčnih celicah. V praksi sladkorno bolezen najpogosteje srečamo v dveh oblikah: prvo, ki je značilna za otroke, označujejo kot **sladkorno bolezen tipa I**, drugo, ki je najpogostejša in je značilna za starejše ljudi, pa označujejo kot **sladkorno bolezen tipa II**.

1.1.1. SLADKORNA BOLEZEN TIPA 2

Drugo ime za sladkorno bolezen tipa II je od insulina neodvisna sladkorna bolezen. Velik del bolnikov z sladkorno boleznijo tipa II se sicer tudi zdravi z insulinom, zato

"neodvisnost" v tem primeru pomeni, da je pri tej obliki sladkorne bolezni pomen inzulinskega zdravljenja predvsem upočasnjevanje kroničnih zapletov in ne - kot pri tipu I - preprečevanje ketoacidoze in s tem zanesljive smrti. Sladkorna bolezen tipa II je približno tridesetkrat bolj pogosta od tipa I in tudi sicer sodi med razmeroma pogoste bolezni; v Sloveniji je več kot 50.000 registriranih bolnikov s to boleznijo. Bolezen se ponavadi odkrije v srednjih letih, bolniki pa so največkrat debeli. Dedni faktor je močnejši kot pri tipu I, tako da je verjetnost sopojavljanja pri krvnih sorodnikih v prvem kolenu med 20 in 40%, verjetnost sopojavljanja pri enojajčnih dvojčkih pa je okrog 90%. Naštete ugotovitve že same kažejo na to, da je patofiziologija nastanka sladkorne bolezni tipa II drugačna kot pri nastanku tipa I te bolezni. Znaki in simptomi se pojavljajo postopoma; za razliko od bolezni tipa I, ki jo običajno ugotovijo ob prvem akutnem zapletu, postavijo diagnozo za tip II najpogosteje na rutinskih pregledih, potem ko pri sicer asimptomatičnem bolniku odkrijejo zvišano koncentracijo glukoze v krvi. Danes velja prepričanje, da je sladkorna bolezen tipa II heterogena skupina bolezni, ki bo z novimi spoznanji o mehanizmi nastanka doživljala nove razdelitve in preimenovanja. Rezultati številnih raziskav so pokazali, da gre lahko pri razvoju te bolezni tako za neodzivnost tarčnih celic za insulin kot tudi za motnjo v njegovem izločanju, da pa je lahko pomembnost enega ali drugega dejavnika od bolnika do bolnika različna in da lahko motnja na eni ravni povzroči okvaro na drugi (1). Prevalenca, oziroma pojavnost sladkorne bolezni tipa 2 po svetu, se bo po pričakovanjih do leta 2030 povečala na 4,4% (2). Zato bo zdravljenje in preprečevanje tudi v prihodnje imelo velik pomen. Cilj zdravljenja je preprečevanje posledic sladkorne bolezni tipa 2 in preprečevanje progresije že nastalih posledic bolezni.

1.1.2. ZAVIRALCI ALFA-GLUKOZIDAZE

Najbolj pogosta kombinacija ukrepov pri preprečevanju posledic sladkorne bolezni tipa 2, sta sprememba življenjskega sloga in terapija z metforminom. V zadnjih letih pa je porast v predpisovanju zdravil drugega in tretjega izbora. Sem spadajo sulfonilsečnine, inzulin, tiazolindioni in inhibitorji α -glukozidaze (3). Inhibitorji α -glukozidaze so pogosteje izbrana skupina zdravil takrat, kadar imajo pacienti težave z post-prandialno hiperglikemijo in povišano telesno težo. Najbolj raziskan in široko uporabljan je inhibitor akarboza. V študijah na bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2 se je pokazal kot zelo učinkovit. Dve uri po aplikaciji akarboze se serumska koncentracija glukoze signifikantno zniža, prav tako se zniža delež glikiranega hemoglobina (HbA1c). Učinek akarboze nastopi hitro(4). Zaviralci

α -glukozidaze so skupina zdravil, ki preprečijo nastop post-prandialne hiperglikemije. Z drugimi besedami preprečijo, da bi koncentracija glukoze v krvi po obroku strmo narastla. Nadzor nad post-prandialno hiperglikemijo je zelo pomemben, saj povišana koncentracija glukoze v serumu prispeva k višji koncentraciji HbA1c (4). Dokazana pa je tudi povezava med post-prandialno hiperglikemijo in večjim tveganjem za pojavnost kardiovaskularnih zapletov (5).

1.2. O ENCIMU ALFA-GLUKOZIDAZA

Encim α -glukozidaza spada med hidrolaze in je encim, ki v svojem aktivnem mestu vsebuje kalcij (6). Je homodimerni glikoprotein, ki hidrolizira terminalno vezane nereducirajoče 1,4-glukozne enote. Je encim, ki sestavljene ogljikove hidrate cepi na molekule glukoze (7). Inhibicija α -glukozidaze je poglobitnega pomena za uravnavanje serumske koncentracije glukoze. Zato je inhibicija tega encima pomembna pri nadzoru absorpcije glukoze in pojavu post-prandialne hiperglikemije (8).

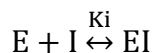
1.3. INHIBICIJA ENCIMOV

Po načinu delovanja inhibitorjev na encime ločimo dve veliki skupini inhibitorjev: ireverzibilne in reverzibilne. **Ireverzibilen inhibitor** se poveže z encimom s kovalentnimi ali zelo močnimi nekovalentnimi vezmi. Pri tem se veže na funkcionalno skupino aminokislina (AK), ki sodeluje pri vezavi substrata ali pri katalitičnem delovanju ter tako permanentno inaktivira encim. **Reverzibilni inhibitorji** se vežejo na encim, a lahko od njega tudi disociirajo. Encim je neaktiven le takrat, ko je reverzibilen inhibitor nanj vezan. Pri reverzibilnih inhibitorjih ločimo več tipov inhibicije

1.3.1. KOMPETITIVNA INHIBICIJA

Kompetitivni inhibitor je običajno zelo podoben substratu in se veže v aktivno mesto encima. Vezavi substrata in inhibitorja v aktivno mesto se medsebojno izključujeta: kadar

je vezan inhibitor, se substrat ne more vezati, in obratno (9). Kinetična shema kompetitivne inhibicije je naslednja:

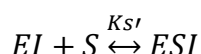
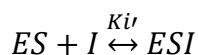
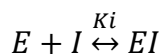


Enačba 1

Pri tem tipu inhibicije inhibitor in substrat tekmujeta za vezavo v aktivno mesto. Opazi se očitno povišanje disociacijske konstante za kompleks ES (K_s), kar je posledica padca afinitete encima do vezave substrata. Maksimalna dosežena hitrost (V_{max}) ostane nespremenjena (10).

1.3.2. NEKOMPETITIVNA INHIBICIJA

Pri reverzibilni **nekompetitivni inhibiciji** se lahko substrat in inhibitor hkrati vežeta na molekulo encima ali pa se inhibitor veže na kompleks encim-substrat. Kinetična shema nekompetitivne inhibicije je naslednja:



Enačba 2

Očitno se morata substrat in inhibitor vezati na dve različni mesti na encimu. Vezava inhibitorja ne vpliva na vezavo substrata, vpliva pa na katalitično delovanje encima. Mehanizem delovanja inhibitorja na encim je pri različnih molekulah inhibitorja različen (11).

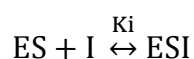
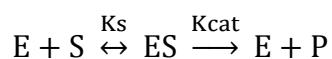
Pri tem tipu inhibicije se V_{max} zniža, K_m pa ostane nespremenjen.

1.3.2.1. Mešan tip nekompetitivne inhibicije

To je poseben tip nekompetitivne inhibicije. Za mešan tip inhibitorja velja, da se V_{max} zniža, medtem ko K_m naraste (12).

1.3.3. AKOMPETITIVNA INHIBICIJA

Akompelitivni inhibitor je podoben nekompetitivnemu, saj prav tako dopuša vezavo substrata v aktivno mesto, vendar se od njega razlikuje, ker se veže le na kompleks encim-substrat (ES). Akompelitivni inhibitor se v tem primeru inhibicije veže na neko drugo mesto na encimu in ne v aktivno mesto. Kinetična shema zglada tako:



Enačba 3

Ker se inhibitor veže le na kompleks ES in ne na prosti encim, bo vplival na encimsko aktivnost le pri visoki koncentraciji substrata, ko bo tudi koncentracija kompleksa ES visoka (13).

Opazimo padec tako K_m kot tudi K_s . Nižja K_s pomeni večjo afiniteto substrata do encima, kar je posledica vezave substrata na encim in padec koncentracije prostega encima (E). K_m bo tako nižja, oziroma bo dosežena pri nižji koncentraciji substrata.

Povzetek vpliva različnega tipa inhibitorja na kinetična parametra K_m in V_{max} , prikazuje preglednica I (14).

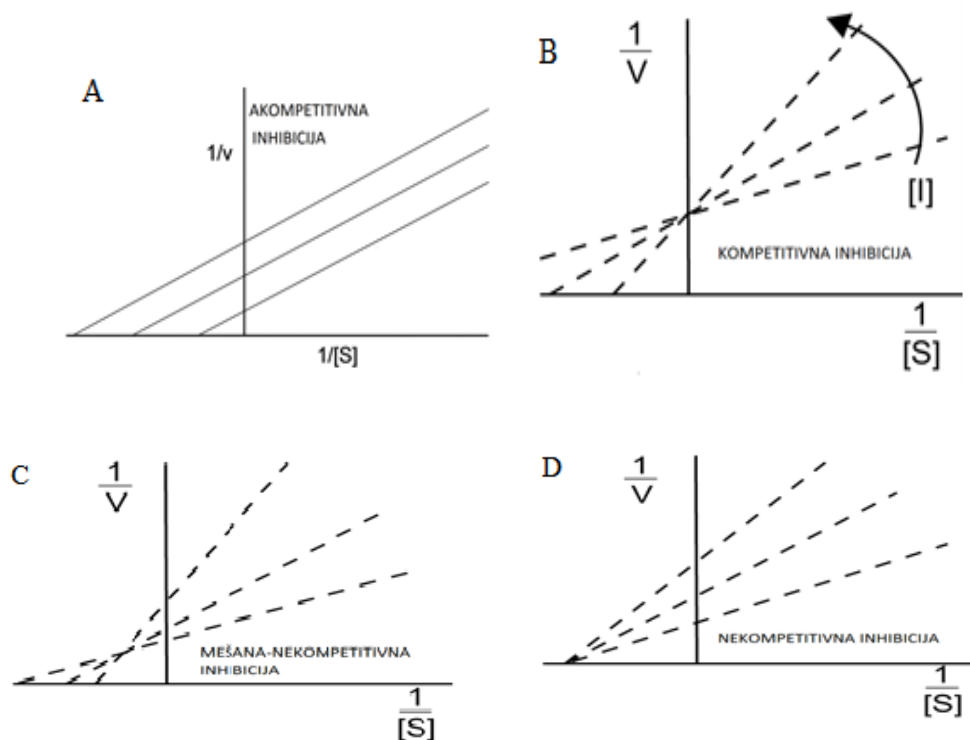
Preglednica I: vpliv posameznega tipa inhibicije na kinetična parametra K_m in V_{max} .

	KOMPETITIVNA INHIBICIJA	AKOMPETITIVNA INHIBICIJA	NEKOMPETITIVNA INHIBICIJA	MEŠANA NEKOMPETITIVNA INHIBICIJA
V_{max}	ni vpliva (-)	pade (↓)	pade (↓)	pade (↓)
K_m	naraste (↑)	pade (↓)	ni vpliva (-)	naraste (↑)

1.3.4. DOLOČEVANJE VRSTE INHIBICIJE

Med tremi vrstami inhibicije lahko razlikujemo, če v laboratoriju naredimo niz ustreznih poskusov. Inhibicijske poskuse pripravimo tako, da uporabimo različne koncentracije substrata (takšne kot smo uporabili pri poskusih za določanje vrednosti K_m in V_{max}), ki jim

dodamo konstantno količino encima in inhibitorja, ter merimo začetno hitrost encimske reakcije. Z analizo dobljenih rezultatov z Lineweaver-Burkovim grafom lahko ugotovimo, ali je inhibitor kompetitiven, nekompetitiven ali akompetitiven. Družine premic, ki jih dobimo pri posamezni vrsti inhibicije, so prikazane na sliki 1. Pri kompetitivni inhibiciji inhibitor ne vpliva na V_{max} , zato se premice sekajo na osi $1/v_0$ (slika 1), Pri nekompetitivni inhibiciji se premice sekajo na osi $1/[S]$ (K_m je nespremenjen pri vseh premicah, slika). Pri akompetitivni inhibiciji je spremenjena tako V_{max} kot K_m , premice pa so vzporedne (slika 1) (13).



Slika 1: graf A: grafični prikaz akompetitivne inhibicije, B: kompetitivne inhibicije, C: nekompetitivne in D: mešane nekompetitivne inhibicije (prirejeno po viru št. 15 in 16).

1.4. FENOLNE SPOJINE IN FLAVONOIDI

Fenoli so skupina rastlinskih sekundarnih metabolitov, za katere je značilna prisotnost fenolne skupine. Naravni fenoli so lahko enostavne molekule, kot so fenolne kisline, ali pa visoko polimerizirane spojine, kot so tanini. Fenoli so eni najbolj zastopanih sekundarnih metabolitov v rastlinskih celicah in so zato močno zastopani mikronutrienti v človekovi prehrani. Odgovorni so za barvo rdečih vin, vplivajo na okus in zaznavo trpkosti v vinu in so zaščitne spojine (17). Ker delujejo kot antioksidanti ali drugače rečeno, lovilci radikalov, jih v zdravilstvu kot tudi v sodobni medicini pogosto srečamo. Flavonoidi so

sestavljani iz treh obročev in se delijo na različne podskupine. Imajo značilno zgradbo, ki v večini primerov vsebuje ketonsko skupino. Za mnoge flavonoide je bilo dokazano antidiabetično delovanje. In sicer preko inhibicije encima alfa-glukozidaze in encima alfa-amilaze (18).

Številni avtorji navajajo, da ima **nordihidrovajaretinska kislina (NDGA)**, ki spada med fenolne spojine, antihyperglikemično delovanje. Preizkus je bil opravljen na miškah in podganah s sladkorno boleznijo tipa 2 (*Luo et al., 1999*). Kljub temu, da mehanizem tega delovanja ni bil določen, je bilo pokazano, da NDGA zniža serumsko koncentracijo glukoze in pri tem ne poviša serumske koncentracije inzulina. Torej padeč koncentracije glukoze ni posledica zvišane koncentracije inzulina. Poleg tega NDGA zniža koncentracijo trigliceridov, prostih maščobnih kislin in glicerola v podganah s sladkorno boleznijo tipa 2 (*Reed et al., 1999*). S pomočjo teh študij in takšnih farmakoloških podatkov si lahko razlagamo etnobotanično rabo rastlinske vrste *L. tridentata* v terapiji sladkorne bolezni (19). Miške, pri katerih je bila izzvana debelost z načinom hranjenja, so dva tedna prejemale **galno kislino** (10mg/kg/dan). Po dveh tednih je bila, med drugimi pozitivnimi učinki, opažena signifikantno nižja koncentracija glukoze v krvi. V maščobnem tkivu se je zmanjšala tudi velikost adipocitov. Galna kislina ugodno vpliva na glukozno toleranco in na metabolizem maščob v debelih miškah, iz česar gre sklepati na njeno antihyperglikemično delovanje (20). **Klorogenska kislina** je spojina, ki jo najdemo v kavi. V *in vitro* študijah inhibira privzem glukoze v črevesju. Zniža posprandialno koncentracijo glukoze, brez da bi istočasno zvišala koncentracijo inzulina. Študija je bila opravljena na miškah, ki so dnevno prejemale klorogensko kislino (120mg/kg) (21). Druga študija, kjer so miškam izzvali nastanek sladkorne bolezni (tipa 1) z aplikacijo aloksana je potrdila, da imata tako ferulna kislina kot resveratrol antidiabetične učinke. Miške so prejemale 10 mg/kg/dan **ferulne kisline** ter 20 mg/kg/dan **resveratrola** (22). Rezultati druge študije so pokazali, da je uživanje ferulne kisline znižalo serumske koncentracije glukoze ter povišalo koncentracijo glikogena in inzulina. Rezultati kažejo na to, da lahko uživanje ferulne kisline zmanjša pojavnost hiperglikemije, ki je posledica visoko-kalorične diete. Mehanizem poteče preko regulacije izločanja inzulina in preko regulacije koncentracije glukoze s pomočjo jetrnih encimov (23). Preiskave so bile opravljene tudi na snoveh **naringin** in **hesperedin**, ki spadata med flavonoide. Rezultati so pokazali, da so imele podgane (katerim so inducirali sladkorno bolezen tipa 2), ki so prejemale naringin ali

hesperidin, nižje koncentracije glukoze v serumu. Možnih načinov delovanja je več, lahko povečata izločanje inzulina preko spodbujanja pankreatičnih β -celic, izboljšata transport glukoze do perifernih tkiv in pospešujeta njen privzem v periferna tkiva ali preko povečane glukoneogeneze v jetrih in mišicah (24). V drugi študiji, kjer so podganam prav tako inducirali sladkorno bolezen tipa 2, so dokazali antidiabetično delovanje **rutina**, **elagne kisline** in **kvercetina** pri peroralni aplikaciji. Aplicirali so dva različna odmerka, 50 mg/kg ter 100 mg/kg, od katerih se je višji odmerek izkazal za bolj učinkovitega. Serumske koncentracije glukoze so bile v skupini, ki je prejela omenjene flavonoide, signifikantno nižja. Najbolj učinkovit je bil rutin. Rutin, elagna kislina in kvercetin pospešijo privzem glukoze v celice ter spodbudijo izločanje inzulina iz β -celic (25).

1.4.1. IZVLEČEK LUBJA BELE JELKE IN PIKNOGENOL

Izvleček iz lubja kočevske bele jelke (*Abies Alba*) vsebuje fenolne kisline, flavonoide in lignane. Ima zelo dobre antioksidativne lastnosti. Z *in vitro* testom na mononukleranih perifernih človeških rdečih krvničkah je bilo pokazano, da v primerjavi s piknogenolom celo boljše (26). **Piknogenol** je ime za ekstrakt, ki se pridobiva iz rastlinske vrste obmorski bor (*Pinus pinaster*). Je eden izmed najbolj raziskanih prehranskih dopolnil. Bogat je s fenolnimi spojinami. Vsebuje fenolne kisline in flavonoide. Piknogenol zaradi svojih antioksidativnih lastnosti inhibira encima acetilholinesterazo in butilholinesterazo (27). Piknogenol je bil prav tako preizkušen klinično in v laboratoriju, ki potrjujejo njegove protivnetne učinke. Izkazalo se je, da ima ugoden vpliv na vnetne procese pri artritisu kot tudi pri sladkorni bolezni, pri tem pa ne povzroča želodčnih razjed, povišanega krvnega tlaka ali retinopatije (28).

Seznam vseh preizkušenih naravnih spojin ter njihovih kemijskih struktur in IUPAC imen je naveden v prilogi 1.

2. NAMEN MAGISTRSKEGA DELA

Namen raziskovalnega magistrskega dela je bil preizkusiti izbrane (večinoma fenolne) spojine, ki so prisotne v naravi in pa izvleček lubja navadne bele jelke na morebitne inhibitorne lastnosti proti encimu α -glukozidaza. Predvidevamo, da nekatere naravne spojine kot tudi izvleček iz skorje navadne bele jelke inhibira encim α -glukozidazo. Encim α -glukozidaza se nahaja v črevesju sesalcev in sodeluje pri presnovi kompleksnih ogljikovih hidratov v enostavne sladkorje. Bolj natančno rečeno je to encim, ki sodeluje pri zadnjem koraku presnove sladkorjev in tako cepi sestavljene sladkorje do molekul glukoze, ki se nato absorbirajo skozi sluznico črevesja v krvni obtok. S substratom MUG smo tako preizkusili 34 spojin prisotnih v hrani in naravi. Preizkusili smo tudi izvleček lubja (navadne) bele jelke (*Abies alba*), ki je v nekaterih predhodnih raziskavah pokazal ugodne antioksidativne lastnosti. Tako smo se mi odločili, da preizkusimo tudi njegove morebitne inhibitorne lastnosti, in sicer na encim α -glukozidazi.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. Biološki material

Ekstrakt podganjega črevesa-material Rat intestinal acetone powder (I1630 Sigma)

3.1.2. Kemikalije

Substrat 4-metilumbeliferil- α -D-glukopiranozid (M9766 Sigma), kat. št. 17833-43-1.
Koncentracije 80 mM. Redčili smo ga z dimetilsulfoksidom (DMSO).

Prečiščena voda.

0,05 M fosfatni pufer s pH 6,8

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

0,1 M fosfatni pufer s pH 7,0

PEG 400; kat.št. 25322-68-3 – polietilenglikol z molsko maso 400 g/mol.

Etilendiamintetraocetna kislina (EDTA); kat.št. 60-00-4

Dimetilsulfoksid (DMSO); kat.št. 67-68-5

Diklorodifenil trikloroetan (DDT); kat.št. 50-29-3

TRITON X 100; kat.št. 9002-93-1

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – amonijev sulfat

0,2 M Na_2CO_3 – natrijev karbonat

Raztopine spojin naravnega izvora (inhibitorjev) – vsaka snov posebej je bila raztopljena v topilu sestavljenem iz 25% DMSO ter 75% prečiščene vode.

Raztopine piknogenola in izvlečka skorje bele jelke – raztopili smo vodni ekstrakt piknogenol (pikW) in ekstrakt skorje navadne jelke (abiW) v DMSO:voda (1:3)
Koncentracije so podane v m/v%.

Izvleček skorje navadne jelke pripravljen v PEG 400 (abiPEG) – Izvleček v polietilenglikolu 400 (80%), etilacetatu (1%) in 0,05 M fosfatnem pufru s pH 6,8 (19%) smo redčili s topilom DMSO:voda (1:3). Koncentracija je podana v v/v%.

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

Encim α -glukozidaza izoliran iz ekstrakta podganjega črevesa SIGMA I1630. Izoliran po osnovnem protokolu (E1).

Encim α -glukozidaza izoliran iz ekstrakta podganjega črevesa SIGMA I1630. Izoliran s pomočjo gelske filtracije (E2).

3.1.3. Laboratorijska oprema

Multikanalna pipeta BioHit 8 x 10 uL

Pipete BioHit; več vrst

Epruveta za ultrafiltracijo (Amicon 3000 MWCO)

Čaše več vrst ter druga steklovina

Magnetno mešalo (Tehtnica)

Kadička za multikanalno pipeto

Vibromix 104 EV

Centrifuga z manjšo zmogljivostjo: Eppendorf Centrifuge 5804 R

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

Ročna centrifugirka IKA mini G

Računalniški program za merjenje absorbance ali fluorescence Megallan

UZ kadička Iskra pio d.o.o. Sonis 3

Hladilnik Gorenje (4°C - 8°C)

Hladilnik Alpfrigo (5°C)

Zmrzovalnik 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)

Kromatogram za izvajanje gelske filtracije – AKTA Explorer P-900, UV-900, pH/C-900, Box-900

Mikrotitrne ploščice 96 TPP prozorne

Mikrotitrne ploščice 96 Nunclon™ Delta Surface črne

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija encima α -glukozidaze iz ekstrakta podganjega črevesa

3.2.1.1. Izolacija encima α -glukozidaze (protokol, oznaka E1)

Natehtali smo 0,2 g ekstrakta podganjega črevesa in to količino suhe snovi homogenizirali v 4 mL 0,1 M fosfatnega pufru z 5 mM EDTA in 1mM DDT s pH 7,0. Nato smo to zmes dali v ultrazvočno (UZ) kadičko, ki je bila v hladni sobi (4°C). Obdelava zmesi v UZ kadički je potekala 15 minut. Zmes smo nato mešali 20 minut z vorteksom pri maksimalni hitrosti. Sledilo je 30 minut dolgo centrifugiranje na 10.000 obr./min ter pri temperaturi 4°C. Po koncu centrifugiranja smo oborino zavrgli in uporabili supernatant. Supernatant smo nato še enkrat centrifugirali 5 minut ter morebitno usedlino ponovno zavrgli. Dobljen supernatant je vseboval encim, pridobljen po osnovnem protokolu. Aktivnost izoliranega encima smo preverili z dodatkom 8 mM substrata MUG ter merjenjem intenzivnosti fluorescence.

3.2.1.2. Izolacija encima α -glukozidaze (Nadgrajen protokol, oznaka E2)

Natehtali smo 0,5 g ekstrakta podganjega črevesa in to količino suhe snovi homogenizirali v 50 mL 0,1M fosfatnega pufru z 5 mM EDTA in 1 mM DDT s pH 7,0. Nato smo to zmes dali v ultrazvočno (UZ) kadičko, ki je bila v hladni sobi (4°C). Obdelava zmesi v UZ kadički je potekala 30 minut. Potem smo zmesi dodali 2% Triton X 100 (kar je v našem primeru ustrezalo 400 uL) in vse skupaj postavili na vorteks (maksimalna hitrost) za naslednjih 20 minut. Sledilo je centrifugiranje zmesi pri 20.000 obratih na minuto (obr./min) in temperaturi 4°C. Zmes smo tako centrifugirali 30 minut. Po koncu centrifugiranja smo oborino zavrgli. Supernatantu pa smo dodali 30% nasičene raztopine amonijevega sulfata (NH₄)₂SO₄, kar je v našem primeru znašalo 4,05 g. Koncentracija nasičene raztopine amonijevega sulfata (NH₄)₂SO₄ je bila 675 g/L. Dobljeno zmes smo nato postavili v ledeno kopel oziroma smo jo odstavili na led za toliko časa, dokler se ves amonijev sulfat ni raztopil. Ko se je ves amonijev sulfat raztopil, smo zmes ponovno centrifugirali. Tokrat na 50.000 obr./min, pri temperaturi 4°C, 30 minut. Oborino smo nato ponovno zavrgli, saj je vsebovala oborjene proteine, ki predstavljajo nečistote. Supernatantu smo dodali amonijev sulfat do 70% nasičene raztopine. Po drugem dodatku amonijevega sulfata supernatantu smo zmes ponovno postavili na led, tako dolgo, dokler se ves amonijev sulfat ponovno ni raztopil. Sledilo je centrifugiranje zmesi na 50.000 obr./min ter temperaturi 4°C. Centrifugiranje je potekalo 30 minut. Po koncu centrifugiranja smo preverili morebitno encimsko aktivnost supernatanta. Ugotovili smo, da je nima, zato smo ga zavrgli in obdržali oborino. Oborino smo raztopili v 1 mL 0,1 M fosfatnega pufru z 2 mM EDTA ter s pH 7,0. Tako pripravljen vzorec smo nato prečistili z gelsko filtracijo. Vzorčke smo pri poteku gelske filtracije zbirali v označene mikrocentrifugirke, ki smo jim po koncu postopka izmerili encimsko aktivnost. Encimsko aktivnost smo preverili z dodatkom 10 mM substrata p-NPG ter merjenjem absorbance pri 405 nm, 37°C, 30 meritvenimi cikli ter 10s stresanjem med meritvenimi cikli. Absorbance smo izmerili s pomočjo čitalca mikrotitrskih ploščic Tecan Safire. Na podlagi dobljenih rezultatov smo se glede na intenziteto absorbanc oziroma intenziteto aktivnosti posameznih frakcij izoliranega encima, odločili katere frakcije bomo združili in bodo tako predstavljale glavno frakcijo oziroma izoliran encim (E2). Ko smo ustrezne frakcije združili je sledila ultrafiltracija. V posamezno epruveto, namenjeno za ultrafiltracijo, smo pipetirali 3,5 mL vzorca. Sledilo je 3 minutno centrifugiranje na 10.000 obr./min. Po treh

minutah centrifugiranja smo v epruvetke do-pipetirali toliko vzorca, kolikor se ga je v tem času uspelo ultrafiltrirati. S pomočjo ultrafiltracije smo tako glavno frakcijo izoliranega encima uspeli skoncentrirati na volumen 2 mL.

S pomočjo metode po Bradfordu smo izoliranemu encimu določili še koncentracijo. Delali smo po naslednjem protokolu: 10 uL vzorca (oziroma standarda) + 300 uL Coomassie Reagent Plus. Sledilo je 30 sekundno mešanje. Nato smo vzorce in standarde 10 minut inkubirali na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vzorcem in standardom izmerili absorbanco. Absorbanco smo merili pri valovni dolžini 595 nm. Raztopine encima in standardnih raztopin smo redčili 0, 5 in 10 krat. Tako smo izoliranemu encimu (E2) določili končno koncentracijo 12,9 mg/mL. Masa encima (proteinov) s katero smo delali je bila 6,25 ug, kar pomeni, da smo morali za pripravo delovne raztopine odpipetirati 0,5 uL osnovne raztopine.

3.2.2. Merjenje aktivnosti encima v prisotnosti substrata 4-metilumbeliferil- α -D-glukopiranozid (MUG)

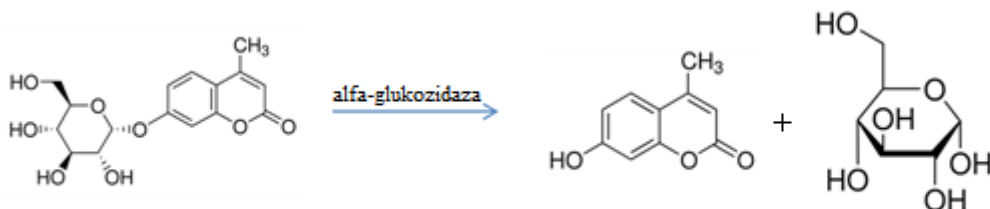
Merili smo porast fluorescence, v črnih mikrotitrskih ploščicah. Zmes smo imeli ves čas zaščiteno pred svetlobo, saj je substrat MUG fotosenzitiven. Encim α -glukozidaza hidrolizira substrat MUG in pri tem nastane 4-metilumbeliferon, ki ima absorpcijski/emisijski maksimum pri vrednostih 360/449 nm (slika 2). V vsako vdolbinico posebej smo napipetirali 110 uL encima, razredčenega s fosfatnim pufrom s pH 6,8. Sledil je dodatek 10 uL inhibitorja izbrane naravne spojine, abiPEG, abiW, pikW in akarbozo). Raztopine inhibitorjev smo pripravili v DMSO:voda (1:3). Za primerjavo inhibitornega delovanja smo uporabili 50 mM akarbozo. V kontrolo brez inhibitorja smo dodali fosfatni pufer s pH 6,8. Da bi preverili vpliv topila na delovanje encima smo za kontrolo dodali 10 uL topila DMSO/voda (1:3) ter 10 uL raztopine PEG/DMSO in voda z delovno koncentracijo 1,25 v/v%. Sledil je dodatek 5uL substrata MUG, ki smo ga dodali v vse vdolbinice. Poleg posamičnih treh testnih ponovitev smo naredili še tri ponovitve za ozadje, kjer smo namesto encima dodali pufer. S tem smo določili morebiten pojavu fluorescence preskušanih spojin.

Reakcijo med encimom in substratom MUG smo ustavljali z dodatkom 0,2 M Na₂CO₃. Vedno smo ga dodali 75 uL. Meritve fluorescence so se izvajale v programu Tecan Safire. Pogoji so bili naslednji: temperatura 37°C, gain vrednost je bila 34, Z-pozicija 11040um, valovna dolžina ekscitacije 356 nm, valovna dolžina emisije 445 nm, ploščica pa se je pred meritvijo stresala 10 sekund.

Delovne koncentracije naravnih spojin, inhibitorjev in substrata ter druge spremenljivke prikazuje preglednica II.

Preglednica II: redčitve, vrsta encima, časovne točke, koncentracije inhibitorjev in substrata ter število ponovitev pri rešetanju.

Inhibitor	Encim	Redčenje encima	Ustavljanje reakcije	Koncentracija inhibitorja	Koncentracija substrata	Število ponovitev
34 naravnih spojin	E1	1000x	po 2 urah	10 mM	8 mM	3
abiPEG, abiW, pikW	E1	1000x	po 15, 30, 60, 90 in 120 min	1,25 m/v% in 0,125 m/v% oz. v/v%	8 mM	1



Slika 2: potek reakcije hidrolize med encimom α .glukozidaza in substratom MUG.

3.2.2.1 Določanje Ki

Določiti smo želeli konstanto inhibicije in tip inhibicije za izbrane spojine, ki so pri rešetanju pokazale največjo aktivnost ter za akarbozo. Najprej smo v vsako vdolbinico pipetirali 5 uL substrata MUG. Delovne koncentracije substrata so tokrat bile naslednje: 1,87 mM; 3,75 mM; 7,5 mM 15,0 mM in 22,5 mM. Sledil je dodatek 10 uL raztopine inhibitorja. Kot inhibitorje smo uporabili spojine oštevilčene s številkami 1 (norhidrogvajaretinska kislina), 5 (galna kislina), 7 (klorogenska kislina), 8 (o-kumarna

kislina), 16 (ferulna kislina); 21 (naringin), 27 (rutin), 31 (sinapinska kislina), 32 (kvercetin) in akarbozo. Delovni koncentraciji raztopin inhibitorjev 1, 5, 7, 8, 9, 16 in 21 sta bili 5 mM in 10 mM. Delovne koncentracije inhibitorjev 27, 31 in 32 pa so bile 0,5 mM in 2 mM. Akarbozo smo dodajali v dveh različnih koncentracijah: 0,1 mM in 0,5 mM. Raztopine inhibitorjev smo redčili z zmesjo DMSO/voda (25%/75%), raztopino akarboze pa s fosfatnim pufrom s pH 6,8. Nato smo z multikanalno pipeto dodali 110 uL encima E2, ki je bil 1000 krat redčen. Odločili smo se za pet časovnih točk in smo tako reakcijo ustavili po 15, 30, 60, 90 in 120 minutah. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 75 uL 0,2 M Na₂CO₃. Ki in Ki' smo izračunali s pomočjo modificirane Michaelis-Mentenove enačbe. Parametra K_m in V_{max} pa s pomočjo Lineweaver-Burkove enačbe. Podatke smo obdelovali v programu Excel.

3.2.2.2. Določanje IC₅₀

Določili smo IC₅₀ za snovi abiPEG, abiW in pikW. Dodali smo 110 uL encima E2. Redčili smo ga 100 krat s fosfatnim pufrom pH vrednosti 6,8. Nato smo v posamezno vdolbinico dodali raztopino inhibitorjev oziroma preiskovanih snovi. Preiskovane snovi so bile zmes izvlečka skorje bele jelke v PEG (abiPEG), vodni ekstrakt skorje bele jelke (abiW) in vodni ekstrakt piknogenola (pikW), ki je služil kot pozitivna kontrola. AbiPEG smo dodali v delovnih koncentracijah: 0,125 v/v%; 0,25 v/v%; 0,625 v/v%; 0,875 v/v%; 1,35 v/v%; 2,5 v/v% in 6,25 v/v%. Abi PEG smo redčili z zmesjo DMSO/voda (25%/75%). AbiW in pikW smo dodali v naslednjih delovnih koncentracijah: 0,125 m/v%; 0,25 m/v%; 0,625 m/v%; 0,875 m/v%; 1,35 m/v%; 2,5 m/v% in 6,25 m/v%. Tudi te raztopine smo redčili z zmesjo DMSO/voda. Po dodatku raztopin testnih snovi je sledil dodatek 5uL substrata MUG. Substrat smo dodali v vse vdolbinice in sicer v koncentraciji 8 mM. Za vsako koncentracijo testne snovi ter ozadja smo naredili tri ponovitve. Odločili smo se za pet časovnih točk in smo tako reakcijo ustavili po 15, 30, 60, 90 in 120 minutah. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 75 uL 0,2 M Na₂CO₃. Z obdelavo podatkov smo narisali graf aktivnosti encima v odvisnosti od koncentracije inhibitorja ter iz njega določili vrednost IC₅₀ za posamezno snov.

3.2.3. Izračun kinetičnih parametrov K_m, V_{max}, K_i in določanje IC₅₀

Pri vseh zgoraj naštetih metodah smo za posamezno preiskovano snov in inhibitor, izračunali kinetična parametra K_m in V_{max}. S pomočjo programa Excel smo iz meritev

intenzitete absorbance ali fluorescence izrisali **Lineweaver-Burkove diagrame**. Enačba premice je imela obliko:

$$y = kx + n \quad \text{oziroma} \quad \frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}$$

Enačba 4

S pomočjo zgornje enačbe smo nato za posamezno koncentracijo snovi ali inhibitorja izračunali K_m in V_{max} .

S pomočjo modificirane **Michaelis-Mentenove enačbe** smo izračunali še konstanto inhibicije (K_i) za posamezno koncentracijo inhibitorja, ki velja pri danih pogojih (29).

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{\alpha K_m + \alpha' [S]} = \frac{\left(\frac{1}{\alpha'}\right) \times V_{max} \times [S]}{\left(\frac{\alpha}{\alpha'}\right) K_m + [S]}$$

$$\alpha = \frac{K_{mi}}{K_m} \times \alpha' \quad \alpha' = \frac{V_{max}}{V_{maxi}} \quad K_i' = \frac{[I]}{(\alpha' - 1)} \quad K_i = \frac{[I]}{(\alpha - 1)}$$

Enačba 5

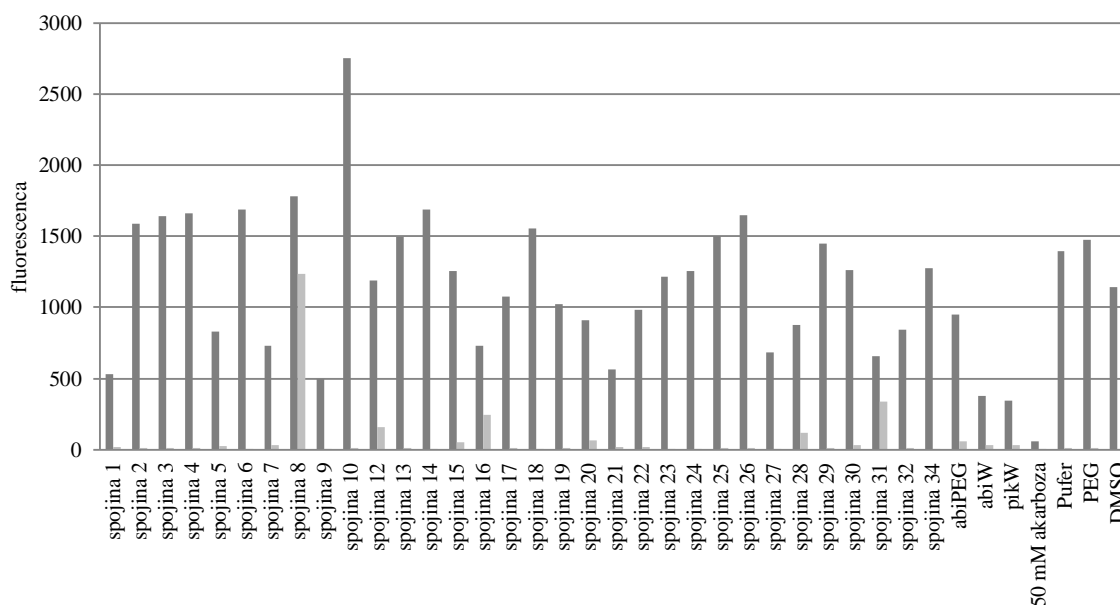
S primerjanjem kinetičnih parametrov med seboj smo tako določili vrsto inhibicije za preiskovane snovi.

Iz vlečku abiW, pikW ter abiPEG smo določili IC_{50} . IC_{50} je polovična maksimalna inhibitorna koncentracija. Torej koncentracija inhibitorja, ki je potrebna da zavre delovanje encima za 50%. Odčitali smo ga iz krivulje kjer smo imeli količino inhibitorja v odvisnosti od aktivnosti α -glukozidaze.

4. REZULTATI

4.1. Rešetanje med naravnimi inhibitorji α -glukozidaze

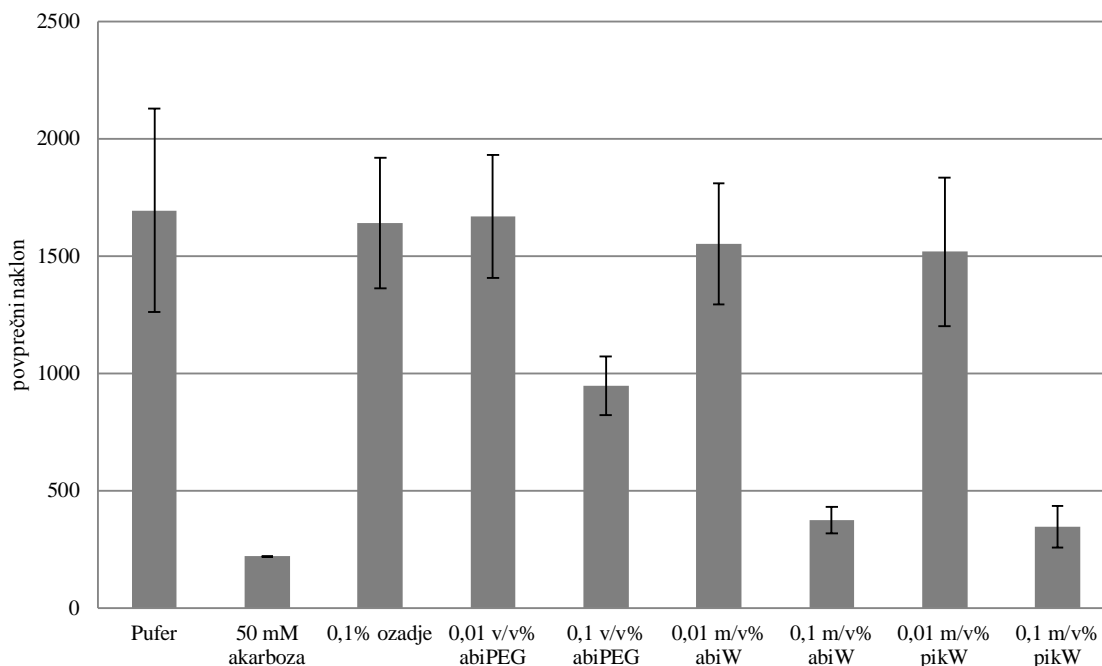
Potencialne inhibitorne lastnosti smo preverili pri vseh 34 naravnih spojinah in pri abiPEG (1,25 v/v%), abiW (1,25 m/v%) ter pikW (1,25 m/v%). Za primerjavo smo uporabili akarbozo, ki je delovanje encima popolnoma zavrla. Rezultate prikazuje slika 2. Vsem spojinam smo poleg inhibitornih lastnosti izmerili tudi samo ozadje. Izkazalo se je, da spojin 11 in 33 zelo močno fluorescirata že sami po sebi, zato so vrednosti fluorescence napisane v opisu pod sliko (slika 3). Inhibicijo encima so pokazale naslednje spojine: 1, 5, 7, 8, 9, 16, 21, 27, 31, 32, abiPEG in abiW.



Slika 3: Inhibitorno delovanje naravnih spojin, izvlečkov abiPEG, abiW in pikW na encim α -glukozidaza. Izvzeti sta spojin 11 in 33. Vrednost fluorescence za spojino 11 je znašala 45232,5 in 46997,5 za ozadje. Vrednost fluorescence pri spojini 33 pa 40978,7 ter ozadje 39732,8. Temno siv stolpec je intenziteta fluorescence ob prisotnosti inhibitorja; svetlo siv stolpec je fluorescence same spojine.

4.2. Inhibitorno delovanje abiPEG, abiW in pikW

Izvlačku skorje bele jelke v PEG 400 (abiPEG) in izvlečku abiW, smo dodatno preverili inhibitorno delovanje. Isto smo storili z izvlečkom pikW. Uporabili smo dve različni koncentraciji abiPEG, abiW in pikW in reakcijo ustavili v več časovnih točkah v treh paralelah. Določili in primerjali smo povprečno hitrost nastajanja produkta v encimski reakciji. Rezultate prikazuje slika 4.



Slika 4: Povprečna hitrost encimske reakcije ob prisotnosti dveh različnih koncentracij abiPEG, abiW in pikW.

4.3. Določanje K_i izbranim spojinam in akarbozi

Spojinam, ki so izkazovale inhibitorno delovanje smo določili vrsto inhibicije. Vrsto inhibicije za posamezno spojino smo določili tako, da smo izračunali K_i in K_i' ter ju primerjali med seboj. Izračunali smo tudi kinetična parametra K_m in V_{max} in glede na njuno spreminjanje v odvisnosti od koncentracije inhibitorja, določili vrsto inhibicije. Tudi vizualno smo ocenili Lineweaver-Burkove grafe, ki smo jih izrisali v programu Excel. S pomočjo tega, kje so se premice posameznega inhibitorja sekale, smo si lahko pomagali pri ocenjevanju vrste inhibicije. Rezultati so zbrani v preglednici III.

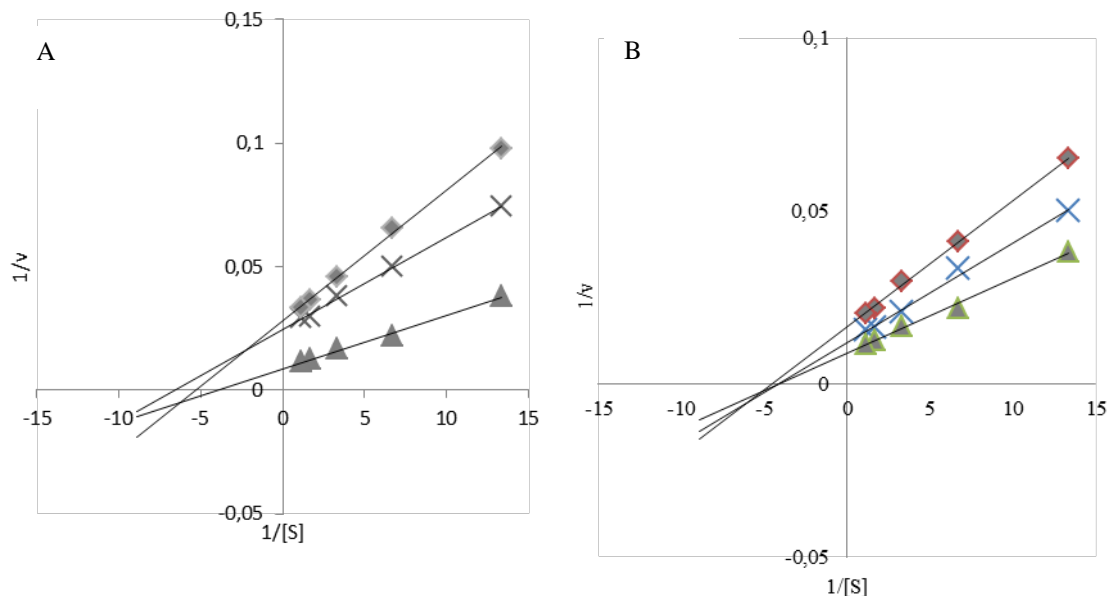
Preglednica III: kinetični parametri V_{max} , K_m , K_i , K_i' in vrsta inhibicije za posamezne naravne snovi in inhibitor akarbozo.

	V_{max} [A/min]	K_m [mM]	K_i [mM]	K_i' [mM]	Vrsta inhibicije
akarboza					
$[I]_1 = 0,008$ mM	40,32	1,49	$5,1 \cdot 10^{-4}$	$4,5 \cdot 10^{-3}$	Akompetitiven tip inhibicije
$[I]_2 = 0,04$ mM	35,46	0,19	0,028	0,018	

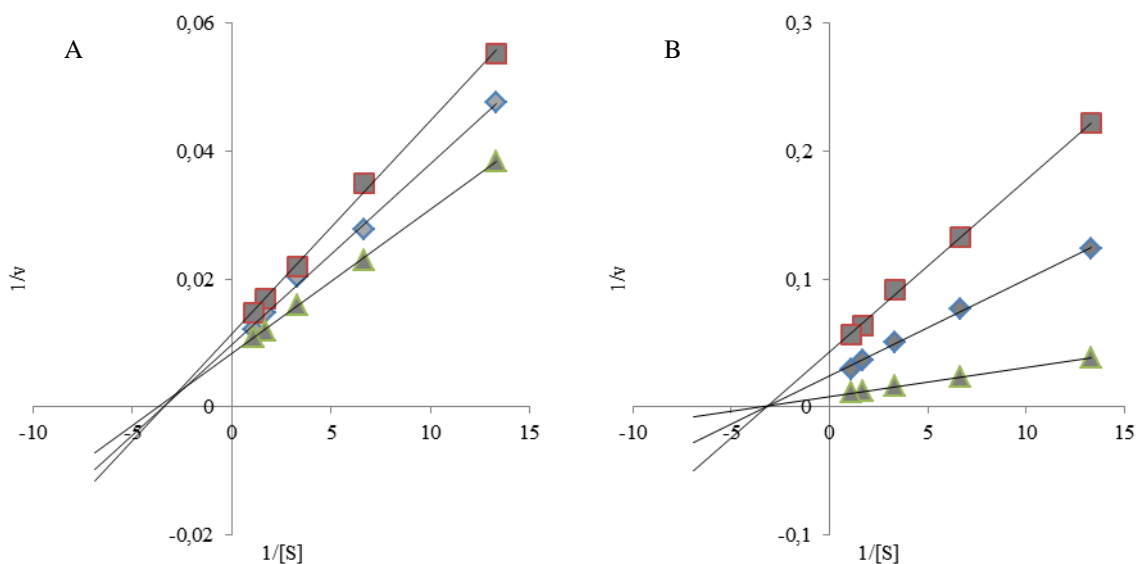
nordihidrogvajaretska kislina	83,33	0,24	1,36	1,15	Nekompetitiven tip inhibicije
[I] ₁ = 0,4 mM	60,24	0,22	1,25	0,92	
[I] ₂ = 0,8 mM					
galna kislina					Mešan (nekompetitiven) tip inhibicije
[I] ₁ = 0,4 mM	88,5	0,29	0,83	1,5	
[I] ₂ = 0,8 mM	103,1	0,29	3,08	8,9	
klorogenska kislina					Nekompetitiven tip inhibicije
[I] ₁ = 0,4 mM	41,67	0,32	0,17	0,24	
[I] ₂ = 0,8 mM	23,40	0,32	0,16	0,21	
o-kumarna kislina					Akompitivnen tip inhibicije
[I] ₁ = 0,4 mM	69,93	0,29	0,58	0,62	
[I] ₂ = 0,8 mM	47,85	0,26	0,64	0,57	
kvercitrin					Nekompetitiven tip inhibicije
[I] ₁ = 0,4 mM	25,91	0,52	0,049	0,123	
[I] ₂ = 0,8 mM	12,89	0,69	0,034	0,106	
ferulna kislina					Nekompetitiven tip inhibicije
[I] ₁ = 0,4 mM	61,73	0,28	0,47	0,47	
[I] ₂ = 0,8 mM	43,67	0,28	0,49	0,49	
naringin					Nekompetitiven tip inhibicije
[I] ₁ = 0,4 mM	64,94	0,37	0,25	0,58	
[I] ₂ = 0,8 mM	44,84	0,35	0,31	0,55	
rutin					Mešan (nekompetitiven) tip inhibicije
[I] ₁ = 0,04 mM	103,1	0,31	0,11	0,61	
[I] ₂ = 0,16 mM	61,73	0,35	0,10	0,21	
sinapinska kislina					Mešan (nekompetitiven) tip inhibicije
[I] ₁ = 0,04 mM	114,9	0,29	0,21	-0,91	
[I] ₂ = 0,16 mM	92,59	0,32	0,29	0,86	
kvercetin					Akompitivnen tip inhibicije
[I] ₁ = 0,04 mM	114,9	0,28	0,40	-0,91	
[I] ₂ = 0,16 mM	90,91	0,26	0,49	0,77	

Akarbozi in o-kumarni kislini smo določili akompitivnen način inhibicije encima. Za to vrsto inhibicije je značilno, da se tako V_{max} kot K_m znižata. Premice Lineweaver-Burkovega grafa pa se sekajo v drugem kvadrantu. Največ spojinam (in sicer nordihidrogvajaretski kislini, klorogenski kislini, kvercitrinu, ferulni kislini in naringinu) smo določili nekompetitiven tip inhibicije. Inhibitor se v tem primeru veže tako na prosti encim (E) kot tudi na kompleks encim-substrat (ES). Veže se z enako afiniteto do obeh. Kinetični parameter V_{max} se zniža, K_m pa ostane nespremenjena. Pri ferulni kislini sta K_i in K_i' enaki, kar je značilno za nekompetitivno vrsto inhibicije in pomeni prav to, da je afiniteta inhibitorja do E enaka kot do kompleksa ES. Spojinam: galna kislina, rutin, sinapinska kislina in kvercetin smo določili mešan (nekompetitiven) tip inhibicije. Gre za

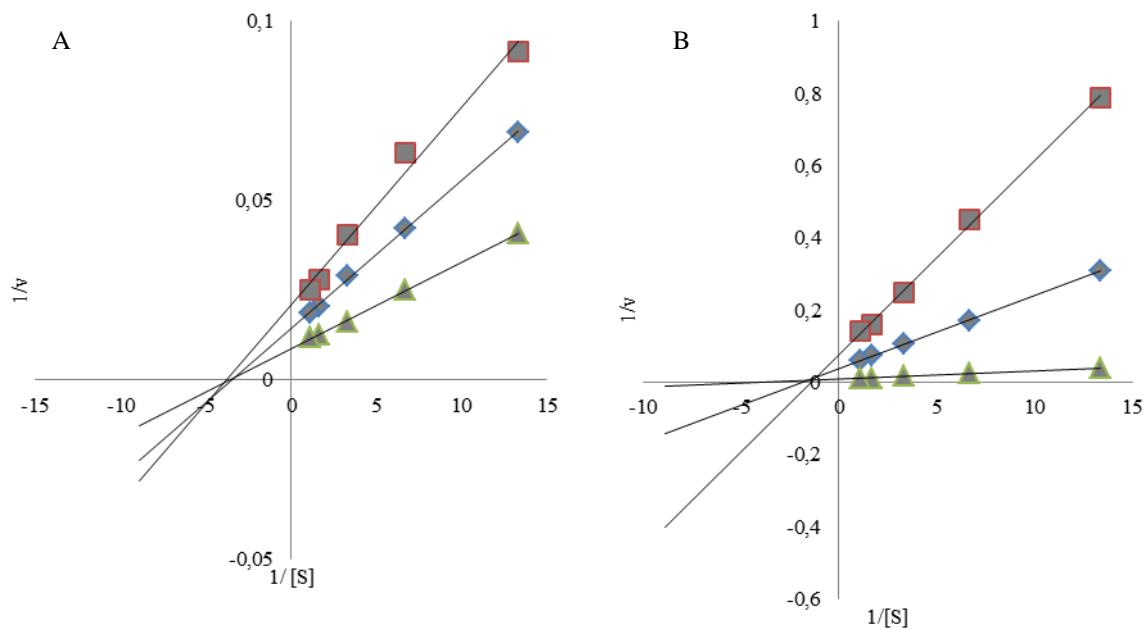
podskupino nekompetitivne inhibicije, kjer pa se inhibitor ne veže z enako afiniteto na E in ES ($K_i \neq K_i'$). V_{max} se zniža, K_m pa poviša. Grafe posameznih spojin prikazuje slike 5-10.



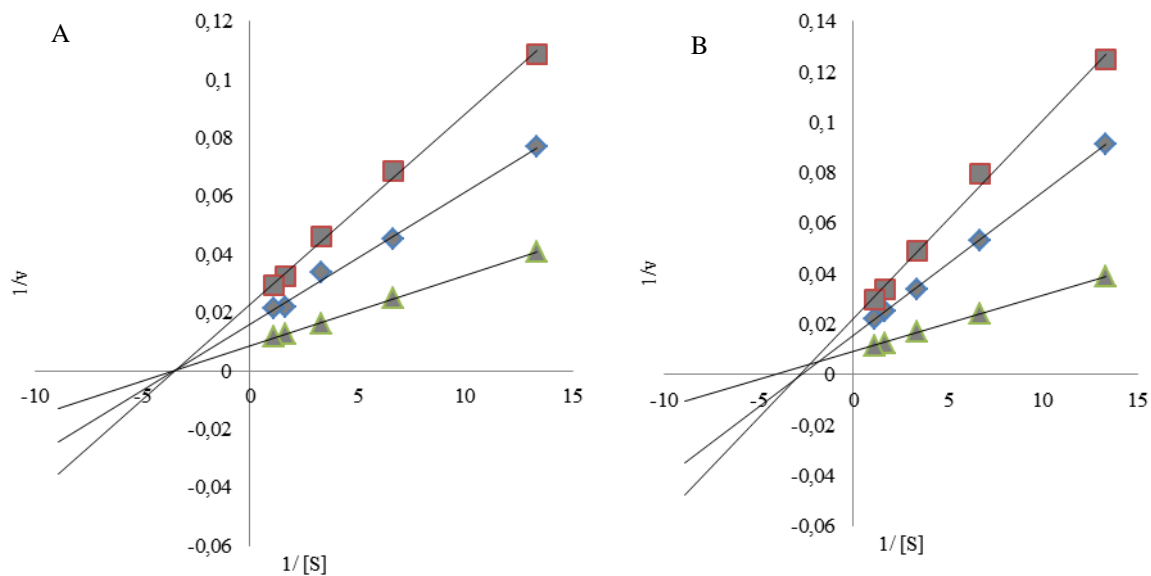
Slika 5; graf A: aktivnost α -glukozidaze ob prisotnosti akarboze, \blacktriangle brez inhibitorja ($y=0,0022x+0,0089$; $R^2=0,9944$); \times 0,1 mM akarboza ($y=0,0037x+0,0248$; $R^2=0,9985$); \blacklozenge 0,5 mM akarboza ($y=0,0053x+0,0282$; $R^2=0,9976$). Graf B: aktivnost α -glukozidaze ob prisotnosti nordihydrogvajaretske kisline, \blacktriangle brez inhibitorja ($y=0,0022x+0,0089$; $R^2=0,9944$); \times 5 mM nordihydrogvajaretska kislina ($y=0,0029x+0,012$; $R^2=0,9938$); \blacklozenge 10 mM nordihydrogvajaretska kislina ($y=0,0037x+0,0166$; $R^2=0,9988$)



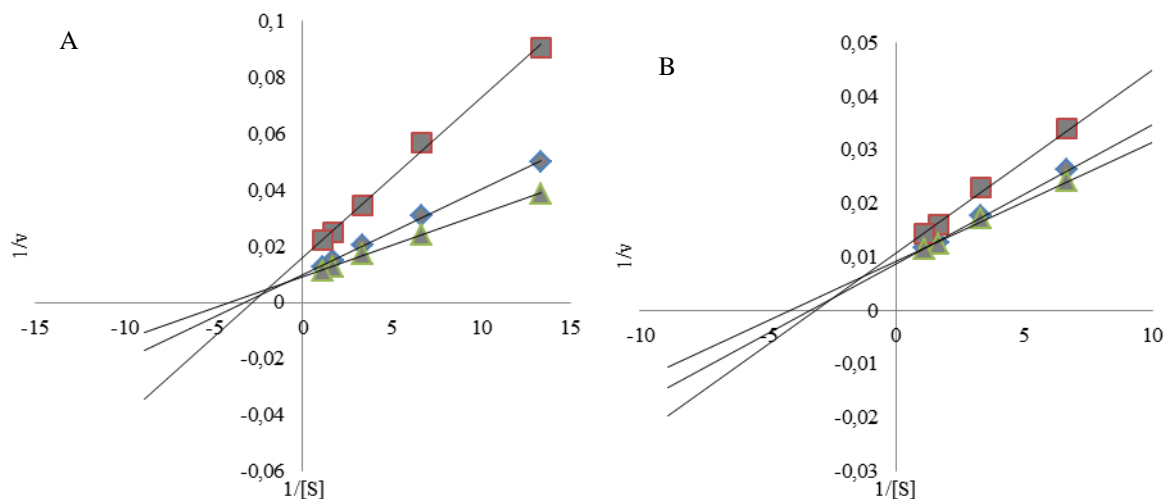
Slika 6; graf A: aktivnost α -glukozidaze ob prisotnosti galne kisline, \blacktriangle brez inhibitorja ($y=0,0023x+0,0083$; $R^2=0,9996$); \blacklozenge 5 mM galna kislina ($y=0,0028x+0,0097$; $R^2=0,9967$); \blacksquare 10 mM galna kislina ($y=0,0033x+0,0113$; $R^2=0,9980$). Graf B: aktivnost α -glukozidaze ob prisotnosti klorogenske kisline, \blacktriangle brez inhibitorja ($y=0,0023x+0,0083$; $R^2=0,9996$); \blacklozenge 5 mM klorogenska kislina ($y=0,0076x+0,024$; $R^2=0,9965$); \blacksquare 10 mM klorogenska kislina ($y=0,0135x+0,0428$; $R^2=0,9986$).



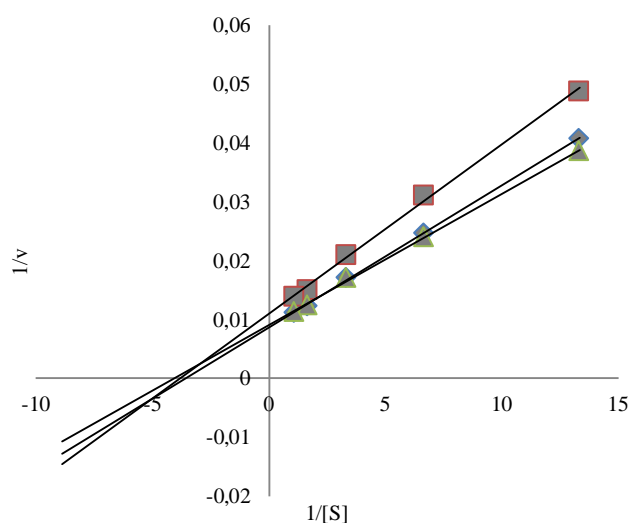
Slika 7; graf A: aktivnost α -glukozidaze ob prisotnosti o-kumarne kisline, \blacktriangle brez inhibitorja ($y=0,0024x+0,0087$; $R^2=0,9991$); \blacklozenge 5 mM o-kumarna kislina ($y=0,0041x+0,0143$; $R^2=0,9991$); \blacksquare 10 mM o-kumarna kislina ($y=0,0055x+0,0209$; $R^2=0,9842$). Graf B: aktivnost α -glukozidaze ob prisotnosti kvercitrina, \blacktriangle brez inhibitorja ($y=0,0022x+0,0091$; $R^2=0,999$); \blacklozenge 5 mM kvercitrin ($y=0,0202x+0,0386$; $R^2=0,9988$); \blacksquare 10 mM kvercitrin ($y=0,0538x+0,0776$; $R^2=0,9987$).



Slika 8: graf A: aktivnost α -glukozidaze ob prisotnosti ferulne kisline, \blacktriangle brez inhibitorja ($y=0,0024x+0,0087$; $R^2=0,9991$); \blacklozenge 5 mM ferulna kislina ($y=0,0045x+0,0162$; $R^2=0,9996$); \blacksquare 10 mM ferulna kislina ($y=0,0065x+0,0229$; $R^2=0,9975$). Graf B: aktivnost α -glukozidaze ob prisotnosti naringina, \blacktriangle brez inhibitorja ($y=0,0022x+0,0091$; $R^2=0,999$); \blacklozenge 5 mM naringin ($y=0,0057x+0,0154$; $R^2=0,9998$); \blacksquare 10 mM naringin ($y=0,0079x+0,0223$; $R^2=0,9945$).



Slika 9: graf A: aktivnost α -glukozidaze ob prisotnosti rutina, \blacktriangle brez inhibitorja ($y=0,0022x+0,0091$; $R^2=0,999$); \blacklozenge 0,5 mM rutin ($y=0,003x+0,0097$; $R^2=0,9987$); \blacksquare 2 mM rutin ($y=0,0057x+0,0162$; $R^2=0,9972$). Graf B: aktivnost α -glukozidaze ob prisotnosti sinapinske kisline, \blacktriangle brez inhibitorja ($y=0,0022x+0,0091$; $R^2=0,999$); \blacklozenge 0,5 mM sinapinska kislina ($y=0,0026x+0,0087$; $R^2=0,9995$); \blacksquare 2 mM sinapinska kislina ($y=0,0034x+0,0108$; $R^2=0,999$).



Slika 10: aktivnost α -glukozidaze ob prisotnosti kvercetina, \blacktriangle brez inhibitorja ($y=0,0022x+0,0091$; $R^2=0,999$); \blacklozenge 0,5 mM kvercetin ($y=0,0024x+0,0087$; $R^2=0,9994$); \blacksquare 2 mM kvercetin ($y=0,0029x+0,011$; $R^2=0,9975$).

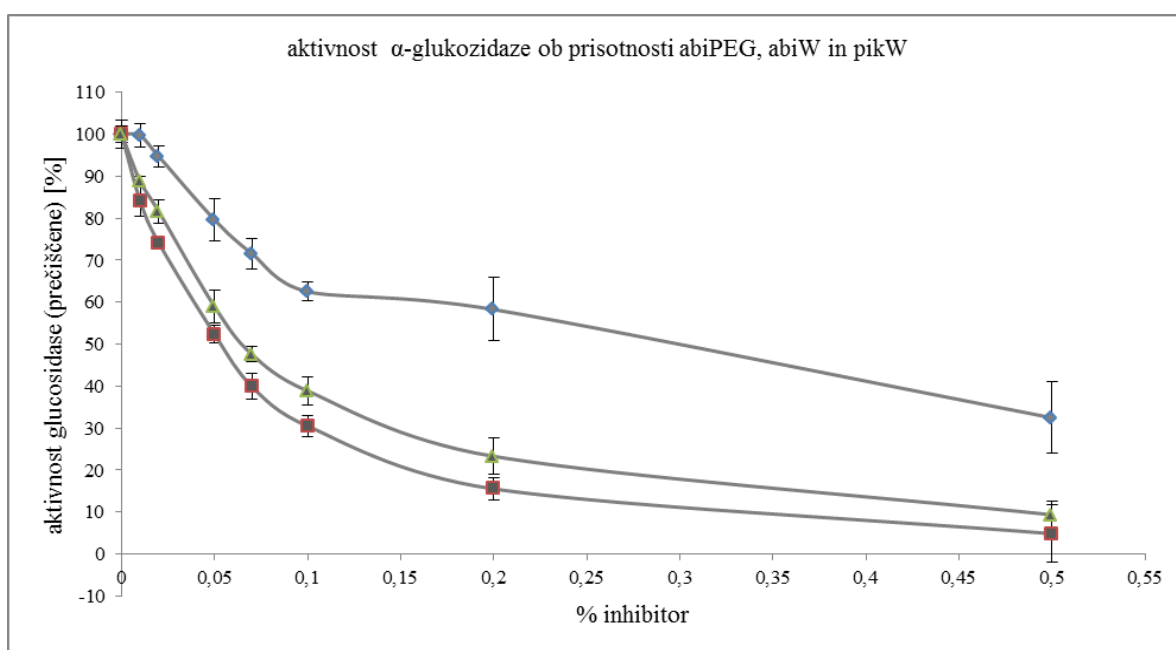
4.4. Določanje IC_{50}

Za izvlečke abiPEG, abiW in pikW smo določili IC_{50} . Encimu smo dodali različne koncentracije posameznega izvlečka in izrisali krivuljo aktivnosti encima α -glukozidaze ob prisotnosti različnih količin izvlečkov abiPEG, abiW in pikW (slika 11). Iz krivulje smo

nato odčitali IC_{50} , oziroma koncentracijo inhibitorja, ki zmanjša aktivnost encima za polovico (za 50%). Rezultati so zbrani v preglednici IV.

Preglednica IV: določene vrednosti IC_{50} za izvleček abiPEG, abiW in pikW.

SNOV	IC_{50} [v/v% ali m/v%]
abiPEG	0,28
abiW	0,05
pikW	0,052



Slika 11: Krivulja prikazuje aktivnost encima α -glukozidaze ob prisotnosti različnih količin ekstraktov abiPEG, abiW in pikW. ■ abiW; ▲ pikW; ◆ abiPEG.

5. RAZPRAVA

Izvleček iz skorje bele jelke, kot je opisan v članku Benkovič *et al.* (*Abies alba*) vsebuje šest fenolnih kislin: galno, homovanilno, vanilno, protokatehujsko, p-hidroksibenzojsko in p-kumarno kislino; tri flavonoide: katehin, epikatehin in katehin tetrametileter; ter štiri lignane: taksiresinol, 7-(2-metil-3,4-dihidroksitetrahidropiran-5-iloksi)-taksiresinol, sekoizolariciresinol in larinresinol. Zaradi visoke vsebnosti fenolnih kislin, lignanov in flavonoidov ima izvleček antioksidativne lastnosti (26). Piknogenol je vodni izvleček, ki se pridobiva iz skorje primorskega bora (*Pinus pinaster*). Kvaliteta izvlečka je opredeljena v USP 28. Pknogenol vsebuje mešanico flavonoidov, predvsem procianidinov (od 65%-75% izvlečka je sestavljenega iz derivatov katehina in epikatehina z različno dolgimi verigami), fenolne kisline, cimetno kislino in njene glikozide ter taksifolin. Je verjetno najbolj raziskan fenolni drevesni izvleček. Poleg omenjenih snovi so s HPLC analizo določili še naslednje fenolne kisline: galno, kavno, kumarno in ferulno kislino (30).

V našem delu smo oba izvlečka primerjali pri inhibiciji encima α -glukozidaze. O inhibitorni aktivnosti piknogenola je že poročano (31), medtem ko na izvlečku iz skorje bele jelke to še ni bilo izvedeno. V naših rezultatih smo pokazali, da tudi izvleček iz skorje bele jelke inhibira encim α -glukozidazo. Če pogledamo njuno sestavo, vidimo, da oba vsebujeta derivate katehina in epikatehina, kot tudi galno in kumarno kislino. Poleg teh dveh izvlečkov pa smo na inhibicijo preizkusili tudi posamezne naravne spojine, od katerih so najboljše rezultate, torej največjo inhibicijo pokazale spojine nordihidrogvajaretinska kislina, galna kislina, klorogenska kislina, o-kumarna kislina, kvercitrin, ferulna kislina, naringnin, rutin, sinapinska kislina in kvercetin. Iz našega preizkusa lahko sklepamo, da v sami sestavi obeh izvlečkov k inhibitornemu delovanju prispevata tako galna kislina kot tudi o-kumarna kislina; pri piknogenolu pa še ferulna kislina. Tudi katehin in epikatehin smo preizkusili kot posamezni snovi in oba sta izkazovala inhibicijo proti encimu α -glukozidazi. Tudi za klorogensko kislino so že poročali o inhibiciji encima α -glukozidaza (32).

Preizkusili smo 34 naravnih spojin, ki se pojavljajo v naravi in hrani. Nekatere se kot sestavina hrane že tradicionalno uporabljajo pri bolnikih s sladkorno boleznijo. To velja predvsem za hrano bogato s fenolnimi spojinami. Takšni so na primer sadeži borovnice, za katere je bila dokazana inhibicija α -glukozidaze (33). Katehin in epikatehin najdemo v

rdečem vinu, v oreščkih kole, grozdnih peškah, jabolkih in v brusnicah (30). Spadata med flavane. Kvercetin in kvercetin se nahajata v skorji različnih vrst borov. Njuna struktura je podobna strukturi katehina in epikatehina, spadata med flavanone. Kvercetin in kvercetin sta pokazala inhibicijo encima α -glukozidaza. Kvercitrinu smo določili nekompetitiven tip inhibicije, kvercetin pa mešan (nekompetitiven) tip inhibicije.

Rastlinska vrsta *Cornus officinalis* se v kitajski alternativni medicini uporablja že vrsto let. Njeni sadeži (*Corni fructus*) se med drugim uporabljajo v terapiji sladkorne bolezni. Vsebujejo oleanolno kislino, na kateri so bile opravljene raziskave. Pokazano je bilo, da oleanolna kislina pomaga znižati pojavnost post-prandialne hiperglikemije (34). V našem raziskovalnem delu je oleanolna kislina pokazala inhibicijo encima α -glukozidaze. To bi lahko bil vzrok za manjšo pojavnost post-prandialne hiperglikemije pri bolnikih s sladkorno boleznijo.

Za mnoge naravne spojine je bilo že poročano o inhibiciji α -glukozidaze, vendar pa za večino ni bila določena vrsta inhibicije. Mi smo izmed 34 spojin izbrali tiste, ki so encim inhibirale nekoliko bolj. Poleg akarboze smo z enako metodo določili vrsto inhibicije še desetim naravnim spojinam. Akarbozi smo določili akompetitiven tip inhibicije. Akompetitiven tip inhibicije smo določili tudi o-kumarni kislini. Za akompetitven inhibitor je značilno, da se veže le na kompleks encim-substrat (ES) in ne na prost encim (E). V literaturi najdemo podatke, da o-kumarna kislina inhibira encim α -glukozidazo (35). Najdemo jo v grozdju in vinu. V rastlinah se večinoma pojavlja vezana na tanine ali lignine (36).

Nordihidrovajaretinski kislini, klorogenski kislini, kvercitrinu, ferulni kislini in naringinu smo določili nekompetitiven tip inhibicije. Za tak inhibitor je značilno, da se veže z enako afiniteto tako na prost encim (E) kot tudi na kompleks encim-substrat (ES). Naringin je glavni flavanon v grenivki in ji daje značilen grenak okus. Najdemo ga tudi v drugih citrusih. Ima antioksidativne lastnosti (37). Tradicionalno se je pri terapiji sladkorne bolezni uporabljala tudi nordihidrovajaretinska kislina. Že indijanci so jo uporabljali pri lajšanju večih bolezni (sladkorna bolezen, artritis, tuberkuloza, ledvičnih kamnih idr.) (38). Ugoden vpliv v terapiji sladkorne bolezni lahko pojasnimo, saj inhibira encim α -glukozidazo in pripomore k manjši absorpciji glukoze skozi črevo ter manjšemu pojavu post-prandialne hiperglikemije. Za katero pa vemo, da pomembno vpliva na razvoj zapletov in patofiziologijo sladkorne bolezni (tipa 2). Klorogensko kislino najdemo v

jagodah jerebice. V literaturi najdemo podatke, da je v prejšnjih raziskavah pokazala inhibicijo encima α -glukozidaza. Fenolne spojine, ki jih najdemo v jagodah jerebice in črnega ribeza, imajo nizko biološko uporabnost, saj se v manjši meri absorbirajo iz gastrointestinalnega trakta (GIT) in prispejo v centralni krvni obtok. V večji meri ostanejo v tankem črevesju in od tam preidejo v debelo črevo. Zato lahko svoje učinke dosegajo predvsem na tem mestu, torej v GIT (39). Ferulno kislino najdemo v velikem koromaču (*Ferula communis*), v hrani pa se nahaja v jabolkih, kavnih zrnih, artičokah in arašidih (40). Tudi ferulna kislina je v prejšnjih raziskavah že izkazovala inhibicijo encima α -glukozidaze (41).

Spojinam kvercetin, galni kislini in rutin smo določili mešan (nekompetitiven) tip inhibicije. To pomeni, da se spojine vežejo tako na encim, kot tudi na kompleks encima-substrat. Vendar se na te dve strukturi vežejo z različno afiniteto ($K_i \neq K_i'$). Kvercetin je tudi v prejšnjih raziskavah pokazal inhibitorne lastnosti proti encimu α -glukozidaza. Prav tako podatki iz literature potrjujejo, da je njegov način inhibicije omenjenega encima mešan tip inhibicije (42).

Rutin spada med flavonoide. V literaturi najdemo podatke, da izkazuje inhibicijo α -glukozidaze. Povzroči znižanje koncentracije glukoze v krvi. Njegov učinek je pri poskusnih živalih nastopil po pol ure. Poleg inhibicije encima pa rutin zmanjša tudi privzem glukoze v celice (25).

6. SKLEP

V magistrskem delu smo pokazali, da nekatere naravne spojine: nordihidrogvajaretinska kislina, galna kislina, klorogenska kislina, o-kumarna kislina, kvercitrin, ferulna kislina, naringin, rutin, sinapinska kislina in kvercetin, inhibirajo encim α -glukozidazo ter da na tak način lahko znižujejo post-prandialno koncentracijo glukoze. Pokazali smo tudi, da izvleček iz skorje bele jelke v primerjavi z izvlečkom iz skorje obmorskega bora prav tako inhibira omenjen encim in zato tudi izvleček deluje antidiabetično. Oba izvlečka sta izkazovala podobno inhibitorno aktivnost. Te spojine lahko najdemo v naravi in v različnih vrstah hrane, zato je prehrana pri bolnikih s sladkorno boleznijo zelo pomembna in lahko pomembno vpliva na potek zdravljenja oziroma bolezni. O inhibitornih lastnostih naravnih spojin je že zelo veliko poročanega, ker pa ni veliko raziskav o njihovem načinu inhibicije, smo se tudi tega dela lotili mi. Pokazali smo, da imajo nekatere naravne spojine svoj določen tip inhibicije za katerega veljajo specifične lastnosti. Iz omenjenih snovi bi z nadaljnjimi raziskavami morda lahko razvili nova zdravila za zdravljenje sladkorne bolezni. Za zdaj pa je pomembno imeti v mislih, da lahko sladkorni bolniki s prehrano pozitivno vplivajo na potek svoje bolezni. Ne samo z znižanjem vnosa ogljikovih hidratov, temveč tudi z uživanjem hrane, ki je bogata s fenolnimi spojinami.

7. LITERATURA

1. Mara Bresjanac in Marjan Rupnik, Patofiziologija s temelji fiziologije, tretja popravljena in dopolnjena izdaja, Inštitut za patološko fiziologijo, Zaloška 4, 1000 Ljubljana, Ljubljana, 2002: 101-102
2. P. Jaya Preethi, Herbal medicine for diabetes mellitus: A Review, International Journal of Phytopharmacy, 2013: 1
3. S El-Kaissi, S Sherbeeni, Pharmacological Management of Type 2 Diabetes Mellitus: An Update, Current Diabetes Reviews, 2001: 1
4. Sanjay Kalra, R. K. Sahay, Alpha-glucosidase inhibitor, acarbose, improves glycaemic control and reduces body weight in type 2 diabetes: Findings on indian patients from the pooled data analysis, Indian Journal of Endocrinology and Metabolism, 2013: 2-4
5. A. Bellomo Damato, Stefanelli G, Laviola L, Giorgino R, Giorgino F, Nateglinide provides tighter glycaemic control than glyburide in patients with Type 2 diabetes with prevalent postprandial hyperglycaemia, Diabet Med, 2011: 1
6. Azam, S. Sikander, Structure and dynamics of alpha-glucosidase through molecular dynamics simulation studies, Journal of Molecular Liquids, Elsevier, 2012: 58-62
7. Chiba S, Molecular mechanism in alpha-glucosidase and glucoamylase, Biosci. Biotechnol. Biochem, 2007, 61 (8): 1233-9
8. Kenjiro Tadera, Yuji Minami, Kouta Takamatsu, Tomoko Matsuoka, Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids, J Nutr Sci Vitaminol 52, 2006: 149-153
9. Rodney Boyer, Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2002: 141-144
10. A. G. Marangoni, Enzyme kinetics; A Modern Approach, Wiley Interscience, A John Wiley & Sons, inc. publication, ZDA, 2003: 61-62
11. Rodney Boyer, Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2002: 144-145
12. A. G. Marangoni, Enzyme kinetics; A Modern Approach, Wiley Interscience, A John Wiley & Sons, inc. publication, ZDA, 2003: 63-65
13. Rodney Boyer, Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2002: 145
14. A. G. Marangoni, Enzyme kinetics; A Modern Approach, Wiley Interscience, A John Wiley & Sons, inc. publication, ZDA, 2003: 62-63
15. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Inhibition_diagrams.png
16. http://en.wikipedia.org/wiki/Uncompetitive_inhibitor

17. <http://www.kis.si/cl/index.php/sl/eno-laboratorij/zanimivosti-eno/fenolne-spojine>
18. Kenjiro Tadera, Yuji Minami, Kouta Takamatsu, Tomoko Matsuoka, Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids, *J Nutr Sci Vitaminol* 52, 2006: 149-153
19. Joshua D. Lambert, Robert T. Dorr and Barbara N. Timmermann, Nordihydroguaiaretic Acid: A Review of Its Numerous and Varied Biological Activities, *Pharmaceutical Biology, ZDA*, 2004: vol. 42, No. 2, pp. 149–158
20. Bak EJ, Kim J, Jang S, Woo GH, Yoon HG, Yoo YJ, Cha JH, Gallic acid improves glucose tolerance and triglyceride concentration in diet-induced obesity mice, *Scand J Clin Lab Invest, ZDA*, 2013 Dec; 73(8):607-14
21. Jasmine M. Tunnicliffe, Lindsay K. Eller, Raylene A. Reimer, Dustin S. Hittel and Jane Shearer, Chlorogenic acid differentially affects postprandial glucose and glucose-dependent insulinotropic polypeptide response in rats, *Appl Physiol Nutr Metab.* 2011: 650-616
22. Ramar M, Manikandan B, Raman T, Priyadarsini A, Palanisamy S, Velayudam M, Munusamy A, Marimuthu Prabhu N, Vaseeharan B., Protective effect of ferulic acid and resveratrol against alloxan-induced diabetes in mice, *Eur J Pharmacol.* 2012 Sep 5;690 (1-3): 226-35
23. Myoung Jin Son, Catherine W. Rico, Seok Hyun Nam, and Mi Young Kang, Effect of Oryzanol and Ferulic Acid on the Glucose Metabolism of Mice Fed with a High-Fat Diet, *J Food Sci*, 2011 Jan-Feb,76(1): H7-H10
24. Osama M. Ahmed, Ayman M. Mahmoud, Adel Abdel-Moneim¹, Mohamed B. Ashour, Antidiabetic effects of hesperedin and naringin in type 2 diabetic rats, *Original Research Article, Egipt*, 2011: 1-16
25. Jadhav, Ramulu, Puchchakayala, Goverdhan, Hypoglycemic and antidiabetic activity of flavonoids: Boswellic acid, ellagic acid, quercetin, rutin on streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats, *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, Mar2012, Vol. 4 Issue 2, p251
26. Eva Tavčar Benkovič, Tina Grohara, Dušan Žigon, Urban Švajger, Damjan Janež, Samo Kreft, Borut Štrukelj, Chemical composition of the silver fir (*Abies alba*) bark extract Abigenol[®] and its antioxidant activity, *Elsevier, Industrial Crops and Products*, 52, 2014: 23– 28
27. Osman Ustuna, Fatma Sezer Senola, Mine Kurkcuoglu, Ilkay Erdogan Orhana, c, Murat Kartald, Kemal Husnu Can Baserb, Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant activities of extracts and essential oils of Turkish *Pinus*

species and pycnogenol, Elsevier, *Industrial Crops and Products*, Volume 38, July 2012: 115–123

28. F.M. Cordova, M.B.F. Marks, R.R. Watson, Chapter 39 – Anti-Inflammatory Actions of Pycnogenol: Diabetes and Arthritis, Elsevier, *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes*, 2013: 495–501

29. Leatherbarrow, RJ, Using linear and non-linear regression to fit biochemical data, *Trends in Biochemical Sciences*, 1990, 15 (12): 455–8

30. Gabriele D'Andrea, Pycnogenol: A blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications, Elsevier, *Fitoterapia*, Volume 81, Issue 7, October 2010: 724–736

31. Angelika Schäfer, Högger P., Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol[®]) effectively inhibit α -glucosidase, *Diabetes Res Clin Pract.* 2007 Jul, 77(1): 41-6

32. Suhaila Mohamed, Functional foods against metabolic syndrome (obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia) and cardiovascular disease, *Trends in Food Science & Technology* Volume 35, Issue 2, February 2014: 114–128

33. Ashley S. Boath, Dominic Grussu, Derek Stewart, Gordon J. McDougall, Berry Polyphenols Inhibit Digestive Enzymes: A Source of Potential Health Benefits?, *Food Digestion*, December 2012, Volume 3, Issue 1-3, pp 1-7

34. W.L. Li, H.C Zhengc, J Bukurub, N De Kimpe, Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus, Elsevier, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 92, Issue 1, May 2004: 1–21

35. Chunpeng Wan, Tao Yuana, Amanda L. Cirelloa, Navindra P. Seeram, Antioxidant and α -glucosidase inhibitory phenolics isolated from highbush blueberry flowers, Elsevier, *Food Chemistry*, Volume 135, Issue 3, 1 December 2012: 1929–1937

36. Magdalena Maksymiak, Marek Kowalczyk, Grazyna Adamus, Electrospray tandem mass spectrometry for the structural characterization of p-coumaric acid–oligo(3-hydroxybutyrate) conjugates, Elsevier, *International Journal of Mass Spectrometry*, Volume 359, 1 February 2014: 6–11

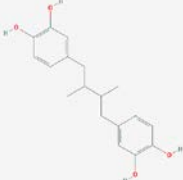
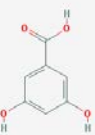
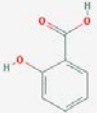
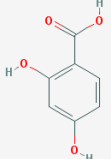
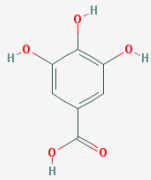
37. Prabu Thangavel, Rangunath Muthu, Manju Vaiyapuri, Antioxidant potential of naringin – a dietary flavonoid – in N-Nitrosodiethylamine induced rat liver carcinogenesis, Elsevier, *Biomedicine & Preventive Nutrition*, Volume 2, Issue 3, July–September 2012: 193–202

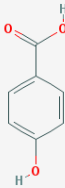
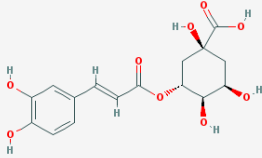
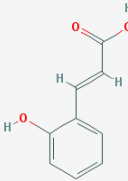
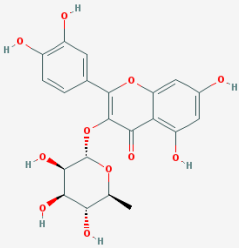
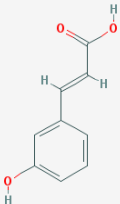
38. Shakilur Rahman, Rizwan Ahmed Ansari, Hasibur Rehman, Suhel Parvez, and Sheikh Raisuddin, Nordihydroguaiaretic Acid from Creosote Bush (*Larrea tridentata*) Mitigates 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate-Induced Inflammatory and Oxidative Stress Responses of Tumor Promotion Cascade in Mouse Skin, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011: 10

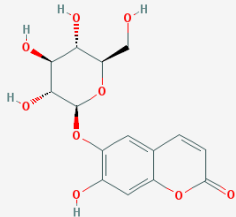
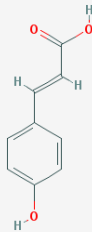
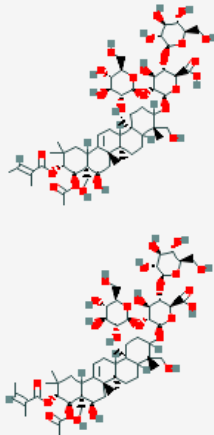
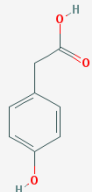
29. Ashley S. Boath, Stewart D, McDougall GJ., Berry components inhibit α -glucosidase in vitro: Synergies between acarbose and polyphenols from black currant and rowanberry, *Food Chem.* 2012: 135 (3)
40. Shahadi Fereidoon, Naczk Marian, Phenolics in food and nutraceuticals, Taylor and Francis or Routledge's, Florida, ZDA, 2004: 4
41. T.K. Girisha, V.M. Pratap, U.J.S. Prasada Rao, Nutrient distribution, phenolic acid composition, antioxidant and alpha-glucosidase inhibitory potentials of black gram (*Vigna mungo* L.) and its milled by-products, Elsevier, *Food Research International*, Volume 46, Issue 1, April 2012: 370–377
42. Minh Anh Thu Phan, Jin Wang, Jingyi Tang, Yan Zhi Lee, Ken Ng, Evaluation of α -glucosidase inhibition potential of some flavonoids from *Epimedium brevicornum*, Elsevier, *LWT - Food Science and Technology*, Volume 53, Issue 2, October 2013: 492–498

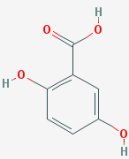
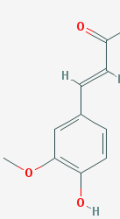
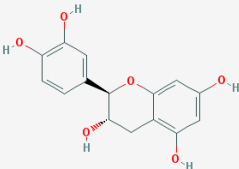
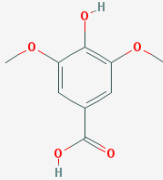
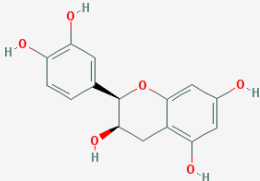
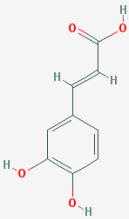
Priloga 1

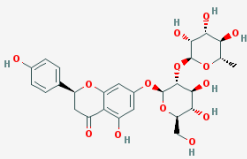
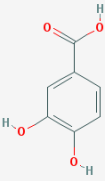
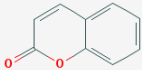
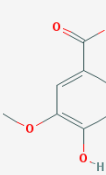
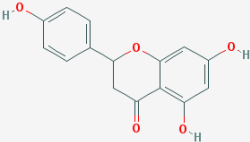
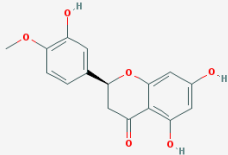
**SEZNAM NARAVNIH SPOJIN, KI SMO JIM PREVERILI INHIBITORNE
LASTNOSTI PROTI ENCIMU α -GLUKOZIDAZI**

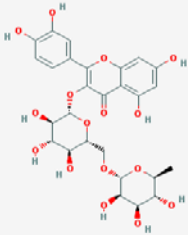
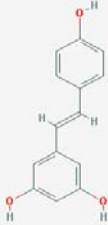
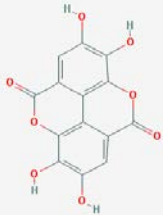
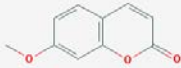
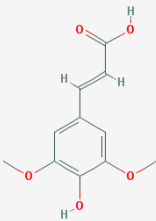
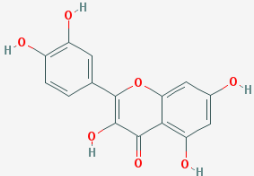
IME SPOJINE	KEMIJSKA FORMULA	IUPAC ime
1. norhidrogvajaretinska kislina		4-[4-(3,4-dihydroxyphenyl)-2,3-dimethylbutyl]benzene-1,2-diol
2. α -resorcilna kislina		3,5-dihydroxybenzoic acid
3. salicilna kislina		2-hydroxybenzoic acid
4. β -resorcilna kislina		2,4-dihydroxybenzoic acid
5. galna kislina		3,4,5-trihydroxybenzoic acid

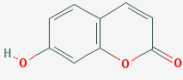
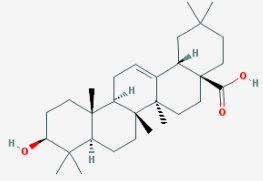
<p>6. p-hidroksibenzojska kislina</p>		<p>4-hydroxybenzoic acid</p>
<p>7. klorogenska kislina</p>		<p>(1S,3R,4R,5R)-3-[(E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxy-1,4,5-trihydroxycyclohexane-1-carboxylic acid</p>
<p>8. o-kumarna kislina</p>		<p>(E)-3-(2-hydroxyphenyl)prop-2-enoic acid</p>
<p>9. kvercitrin</p>		<p>2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxychromen-4-one</p>
<p>10. m-kumarna kislina</p>		<p>(E)-3-(3-hydroxyphenyl)prop-2-enoic acid</p>

<p>11. eskulin</p>		<p>7-hydroxy-6- [(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5- trihydroxy-6- (hydroxymethyl)oxan-2- yl]oxochromen-2-one</p>
<p>12. p-kumarna kislina</p>		<p>(E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop- 2-enoic acid</p>
<p>13. escin</p>		<p>(2S,3S,4S,5R,6R)-6- [[[(4S,6aR,6bS,8R,8aR,9R,10R,14bR)-9- acetyloxy-8-hydroxy-4,8a-bis(hydroxymethyl)- 4,6a,6b,11,11,14b-hexamethyl-10-[(Z)-2- methylbut-2-enoyl]oxy- 1,2,3,4a,5,6,7,8,9,10,12,12a,14,14a- tetradecahydropicen-3-yl]oxy]-4-hydroxy-3,5- bis[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6- (hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy]oxane-2- carboxylic acid;(2S,3S,4S,5R,6R)-6- [[[(4S,6aR,6bS,8R,8aR,9R,10R,14bR)-9- acetyloxy-8-hydroxy-4,8a-bis(hydroxymethyl)- 4,6a,6b,11,11,14b-hexamethyl-10-[(E)-2- methylbut-2-enoyl]oxy- 1,2,3,4a,5,6,7,8,9,10,12,12a,14,14a- tetradecahydropicen-3-yl]oxy]-4-hydroxy-3,5- bis[[[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6- (hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy]oxane-2- carboxylic acid</p>
<p>14. p- hidroksifenilocetna kislina</p>		<p>2-(4-hydroxyphenyl)acetic acid</p>

15. gentizinska kislina		2,5-dihydroxybenzoic acid
16. ferulna kislina		(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid
17. katehin		(2R,3S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol
18. siringinska kislina		4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid
19. epikatehin		(2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol
20. kavna kislina		(E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoic acid

21. naringin		(2S)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxyoxan-2-yl]oxy-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydrochromen-4-one
22. protokatehujska kislina		3,4-dihydroxybenzoic acid
23. kumarin		chromen-2-one
24. vanilna kislina		4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid
25. naringenin		5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydrochromen-4-one
26. hesperetin		(2S)-5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2,3-dihydrochromen-4-one

27. rutin		2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-one
28. resveratol		5-[(E)-2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl]benzene-1,3-diol
29. elagna kislina		2,3,7,8-Tetrahydroxychromeno[5,4,3-cde]chromene-5,10-dione
30. 7-metoksikumarin		7-methoxychromen-2-one
31. sinapinska kislina		(E)-3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)prop-2-enoic acid
32. kvercetin		2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one

33 umbeliferon		7-hydroxychromen-2-one
34. oleanolna kislina		<p>(4aS,6aR,6aS,6bR,8aR,10S,12aR,14bS)-10-hydroxy-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydronicene-4a-carboxylic acid</p>