

Hipoglikemijski učinak *Betule pendule*, Roth. (Betulaceae) na aktivnost piruvat kinaze u HepG2 stanicama u hiperglikemijskim uvjetima

Čunović, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:960812>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Iva Čunović

**Hipoglikemijski učinak *Betule pendule*, Roth.
(Betulaceae) na aktivnost piruvat kinaze u HepG2
stanicama u hiperglikemijskim uvjetima**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Klinička biokemija s hematologijom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom prof.dr.sc. Roberte Petlevski.

Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Roberti Petlevski, na brojnim stručnim savjetima i potpori tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na iskazanoj podršci i razumijevanju tijekom cijelog školovanja.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Šećerna bolest.....	2
1.1.1. Tip 1 šećerne bolesti.....	2
1.1.2. Tip 2 šećerne bolesti.....	3
1.2. Komplikacije šećerne bolesti.....	4
1.3. Funkcionalna sposobnost jetre	5
1.3.1. Metabolizam ugljikohidrata u jetri	6
1.3.2. Glikoliza	8
1.3.3. Piruvat kinaza	14
1.4. Promjene razine glukoze u krvi nakon obroka	17
1.4.1. Razina glukoze u krvi u stanju sitosti.....	18
1.4.2. Razina glukoze u krvi u stanju gladovanja.....	19
1.4.3. Razina glukoze u krvi u stanju produženog gladovanja.....	21
1.5. <i>Betula pendula</i> , Roth. (Betulaceae).....	23
2. OBRAZLOŽENJE TEME	25
3. MATERIJALI I METODE	26
3.1. Kultura stanica HepG2	26
3.1.1. Priprema kulture HepG2.....	27
3.2. Vijabilnost HepG2 stanica.....	28
3.3. Tretiranje stanica glukozom i Betulom pendulom	30
3.4. Liziranje HepG2 stanica i alikvotiranje uzorka za analizu.....	32
3.5. Određivanje aktivnosti piruvat kinaze (PK) u lizatu HepG2 stanica.....	33
4. REZULTATI I RASPRAVA	34
4.1. Rezultati.....	34
4.2. Rasprava	40
5. ZAKLJUČAK	43
6. LITERATURA.....	44
7. SAŽETAK.....	47
7.SUMMARY	48
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	49

1. UVOD

Šećerna bolest (lat. *diabetes mellitus*) je kronični metabolički poremećaj karakteriziran hiperglikemijom u kojem dolazi do promjena u metabolizmu ugljikohidrata, proteina i masti koje su povezane sa apsolutnim ili relativnim nedostatkom sekrecije i/ili aktivnosti inzulina. Kronična hiperglikemija je povezana sa dugotrajnim oštećenjima, disfunkcijom i otkazivanjem raznih organa, naročito očiju, bubrega, živaca, srca i krvnih žila.

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) je procijenjeno da je 2004. godine 3,4 milijuna ljudi umrlo od posljedica hiperglikemije i da će se taj broj udvostručiti do 2030. g.

Noviji podaci IDF-a (engl. *International Diabetes Federation*) govore kako je već 2013. godine 387 milijuna ljudi diljem svijeta bolovalo od šećerne bolesti i čak 46% oboljelih nije imalo postavljenu dijagnozu i odgovarajuću terapiju. Predviđa se do 2035. godine porast od još 50% (IDF Diabetes Atlas Sixth Edition, International Diabetes Federation, 2013.).

WHO i IDF su 1991. prvi puta obilježile Svjetski dan šećerne bolesti koji se od tada svake godine diljem svijeta obilježava 14. studenog kako bi se upozorilo na pravovremeno otkrivanje šećerne bolesti i svjesnost o njenim posljedicama.

Konvencionalna terapija šećerne bolesti ima mnogo nedostataka kao što su nuspojave i tolerancija. Nasuprot tome, za biljne lijekove se pretpostavlja da imaju sličan učinak, ali ne i negativne posljedice kao konvencionalni lijekovi.

Nažalost, postoji nedovoljno znanstvenih podataka o mogućim dozama i nuspojavama biljnih lijekova zbog čega su oni rizična alternativa modernoj medicini.

1.1. Šećerna bolest

Šećerna bolest obuhvaća heterogenu skupinu kroničnih metaboličkih poremećaja uzrokovanih apsolutnim ili relativnim nedostatkom hormona inzulina (Vučić Lovrenčić i Ročić, 2008).

Zbog višestruke etiološke pozadine, šećerna bolest se može klasificirati na 5 osnovna tipa:

1. Tip 1 šećerne bolesti (autoimuni)
2. Tip 2 šećerne bolesti
3. Gestacijski dijabetes ili trudnička šećerna bolest (pojavljuje se u trudnoći i nestaje nakon porođaja ili može prijeći u šećernu bolest tipa 2)
4. Ostali specifični tipovi šećerne bolesti (uzrokovani genetskim defektima β -stanica, nasljednim poremećajima djelovanja inzulina, bolestima egzokrinog dijela gušterače, posljedice djelovanja kemikalija ili nuspojava lijekova)
5. Poremećena regulacija glukoze (preddijabetes) unutar koje razlikujemo 2 vrste poremećaja:

IGT (engl. impaired glucose tolerance), odnosno, poremećaj tolerancije glukoze.

IFG (engl. impaired fasting glucose) ili poremećaj glukoze natašte.

Rizik nastanka šećerne bolesti tipa 2 veći je 50% u osoba sa poremećenom regulacijom glukoze odnosno poremećenim vrijednostima glikemije, tj. preddijabetesom

1.1.1. Tip 1 šećerne bolesti

Tip 1 šećerne bolesti obično čini 5-10% od ukupno oboljelih od šećerne bolesti. Zbog toga što se najčešće javlja u djetinjstvu naziva se i juvenilni (lat. iuvenilis od iuvenis "mlad").

Bolest se razvija u genetski podložnih osoba (određeni HLA genotipovi, poglavito DR i DQ podtipovi), na poticaj čimbenika okoliša: virusi, nitrozo-spojevi, kemikalije (Vučić Lovrenčić i Ročić, 2008).

Tip 1 karakterizira apsolutni manjak inzulina zbog progresivnog, autoimunog razaranja β -stanica Langerhansovih otočića gušterače. Zbog toga je poznat i kao "inzulin ovisan dijabetes".

Jednom započeto autoimuno razaranje β -stanica traje godinama i popraćeno je pojavom specifičnih autoantitijela koja se mogu pojaviti i puno prije pojave jasnih simptoma bolesti: protutijela na stanice otočića (ICA, engl. Islet-cell antibodies), inzulinska protutijela (IAA, engl. autoantibodies to insuline), protutijela na glutamat-dekarboksilazu (GADA, engl. glutamic acid decarboxylase autoantibodies).

To je autoautoimunosni tip 1 šećerne bolesti, a osobe u kojih se autoantitijela ne mogu dokazati svrstavaju se u idiopatski tip šećerne bolesti (Božićević, 2004).

Dokazivanje autoantitijela ima kliničko značenje u diferencijalnoj dijagnostici latentnog autoimunog dijabetesa odraslih (engl. *latent autoimmune diabetes in adults*, LADA) kao podskupine tipa 1 šećerne bolesti od tip 2 šećerne bolesti (Vučić Lovrenčić i Ročić, 2008).

Apsolutni nedostatak inzulina zahtijeva njegov terapijski unos kako bi se spriječio nastanak ketoacidoze, kome i smrti.

Nastanak šećerne bolesti tipa 1 obično je iznenađan i dramatičan te uključuje simptome kao što su polidipsija, poliurija, povećana glad, gubitak tjelesne mase, smetnje vida i sklonost infekcijama i sporo zacjeljivanje rana.

1.1.2. Tip 2 šećerne bolesti

90% oboljelih od šećerne bolesti pripada ovom tipu. Najčešće se pojavljuje u odrasloj dobi zbog čega je poznat kao "adultni dijabetes", ali i kao "inzulin neovisni dijabetes" jer je, barem u početku, koncentracija inzulina u krvi unutar referentnog intervala.

Zbog blagih simptoma i sporog razvoja tip 2 ostaje dugo nedijagnosticiran. Često se otkrije slučajno i to već u fazi kada su se javile kronične komplikacije šećerne bolesti. Nastaje kao kombinacija poremećaja osjetljivosti ciljnih tkiva na inzulini što dovodi do hiperinzulinemije te

poremećaja na razini sinteze i sekrecije inzulina. Osim nasljedne komponente, koja je jača nego u tipu 1 šećerne bolesti, za razvoj šećerne bolesti tipa 2 značajnu ulogu imaju (visceralna) pretilost, loše prehrambene navike i nedovoljna tjelesna aktivnost. Šećerna bolest rijetko se pojavljuje sama. U 65% slučajeva pojavljuje se udružena s hipertenzijom, a gotovo 50% bolesnika ima i pridruženi poremećaj lipida (Rang i sur., 2006).

Liječenje se temelji na edukaciji i samokontroli te dijetoterapiji i tjelovježbi čime se poboljšava glikemijska kontrola, lipidni profil i održava ili smanjuje tjelesna masa. Dodatno liječenje uključuje neinzulinske lijekove, tj. oralne hipoglikemike.

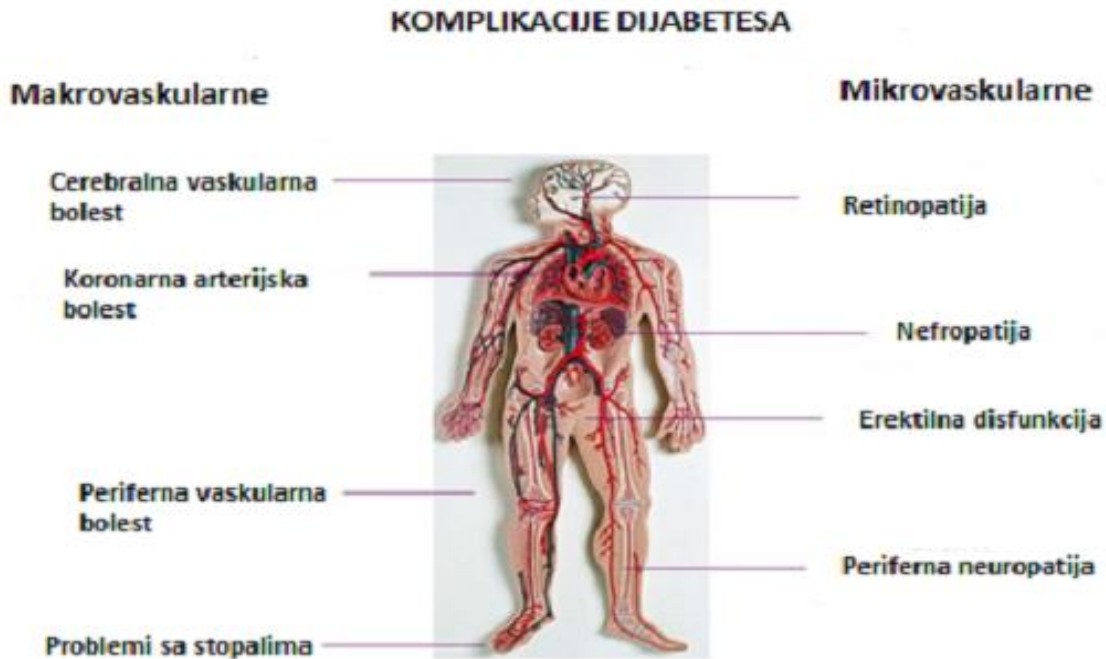
1.2. Komplikacije šećerne bolesti

Komplikacije šećerne bolesti dijelimo na akutne i kronične.

Akutne komplikacije nastaju brzo, dramatičnog su tijeka i zahtijevaju hitnu intervenciju. U njih ubrajamo hipoglikemiju, dijabetičku ketoacidozu, laktatnu acidozu i hiperosmolalnu komu.

Kronične ili kasne komplikacije šećerne bolesti nastaju kao posljedica slabe metaboličke kontrole bolesti, tj. dugotrajne hiperglikemije. Kronična hiperglikemija uzrokuje trajna oštećenja malih i velikih krvnih žila što dovodi do daljnjih komplikacija. Dijelimo ih na mikroangiopatije (retinopatije, nefropatije i neuropatije) i makroangiopatije (moždani udar, ishemijske bolesti srca i periferne vaskularne bolesti) (Štraus i Petlevski, 2009).

U oboljelih od šećerne bolesti, kronične komplikacije mogu izazvati invalidnost i smrt što čini veliki klinički, ekonomski i javnozdravstveni problem.



Slika 1. Prikaz komplikacija šećerne bolesti (<http://diabetessymptomstype2.com/complications-of-diabetes/>)

1.3. Funkcionalna sposobnost jetre

Jetra ima vrlo važnu ulogu u nizu metaboličkih, kako kataboličkih, tako i anaboličkih procesa, pa se stoga naziva "centralnim laboratorijem" organizma. U njoj se odvija veliki dio metabolizma ugljikohidrata, lipida i proteina i drugih dušikovih tvari. U jetri se također obavljaju procesi detoksikacije, konjugacije i esterifikacije (Štraus i Čvorišćec, 2009.)

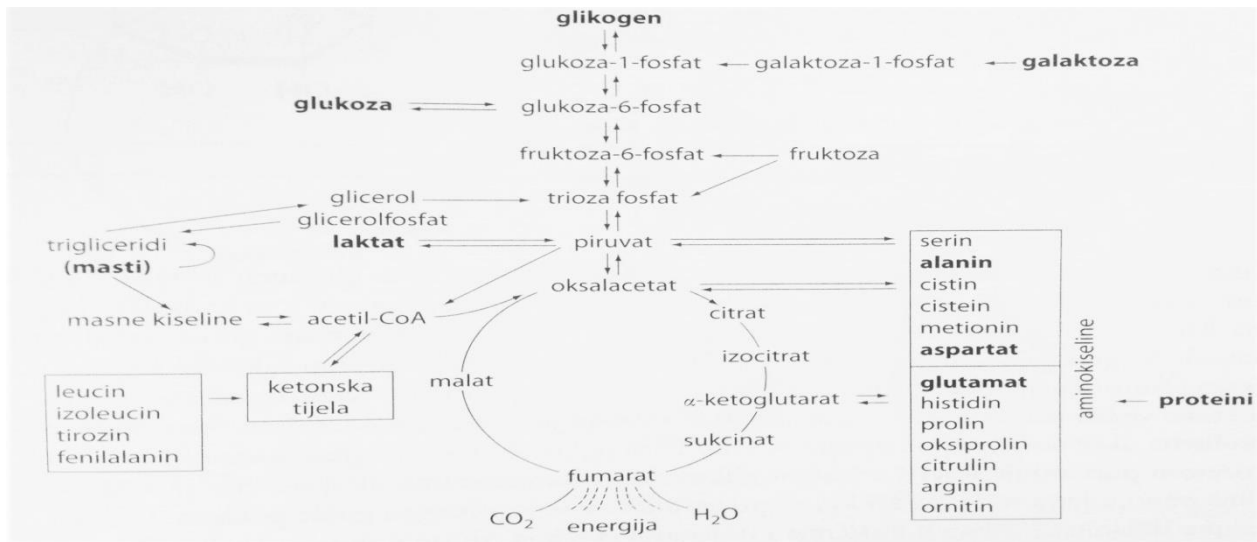
Metabolizam glukoze, oksidacija masnih kiselina i ciklus limunske kiseline u jetrima osiguravaju dovoljne količine glavnog izvora energije, ATP-a. Biosinteza podrazumijeva sintezu proteina, masnih kiselina, triacilglicerola, kolesterola i žučnih kiselina (Pašaćić D., 2008.). Brojni čimbenici mogu dovesti do oštećenja jetre, prije svega egzogeni čimbenici kao što su lijekovi, alkohol, neki sastojci hrane, hepatotropni virus i dr. (Domitrović R., 2011)

1.3.1. Metabolizam ugljikohidrata u jetri

Ugljikohidrati su najzastupljenije biomolekule na Zemlji, a njihova oksidacija je središnji metabolički proces u većini ne-fotosintetskih organizama. Ugljikohidrati su polihidroksi aldehidi ili ketoni, odnosno spojevi čijom hidrolizom nastaju aldehidi ili ketoni. Većinu ugljikohidrata možemo prikazati empirijskom formulom $(CH_2O)_n$.

Tri su osnovne vrste ugljikohidrata: monosaharidi, oligosaharidi i polisaharidi. Monosaharidi sadrže jednu aldehydnu ili ketonsku skupinu. Najzastupljeniji monosaharid je glukoza, nastaje razgradnjom ugljikohidrata iz hrane (škrob), iz staničnih pričuva (glikogen) ili endogenom sintezom (iz proteina ili glicerola). Oligosaharidi su izgrađeni od kratkih lanaca monosaharida koji se međusobno povezuju glikozidnom vezom. Najzastupljeniji oligosaharidi su disaharidi. Polisaharidi su polimeri šećera koji imaju najmanje dvadeset povezanih monosaharidnih jedinica, a neki mogu imati i do tisuću ili više monosaharidnih jedinica. Mogu biti linearni kao npr. celuloza ili razgranati, npr. glikogen. Celuloza i glikogen izgrađeni su od D-glukočnih jedinica, ali povezivanje monosaharidnih jedinica glikozidnim vezama je različito unutar ovih polimera.

Primarna potreba svih stanica u tijelu je pristup neposrednom izvoru energije. Neke stanice kao npr. stanice mozga imaju ograničen kapacitet za glukožu i ATP zbog čega u krvi mora postojati konstantna količina glukoze. Glukoza se unosi u stanice kada je potrebna i unutar stanice započinje serija reakcija kojima nastaje energija. Tri glavna reakcijska puta putem kojih nastaje energija iz ugljikohidrata su glikoliza, ciklus limunske kiseline i oksidacijska fosforilacija.



Slika 2. Prikaz povezanosti metabolizma ugljikohidrata (glikolize i ciklusa limunske kiseline) sa metabolizmom masti i aminokiselina (Štrausova Medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, Urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2009)

Homeostaza glukoze održava se usklađivanjem procesa razgradnje (glikogenoliza, glikoliza), pohrane (glikogeneza) i de novo sinteze glukoze (glukoneogeneza) pri čemu ključnu ulogu imaju hormoni gušterače inzulin i glukagon. Hormoni se izlučuju ovisno o razini glukoze u krvi, a djeluju putem specifičnih receptora, usmjeravajući metaboličke procese u pravcu anabolizma ili katabolizma. Cilj je postići i održati razinu glukoze na otprilike 5mmol/L koja je optimalna za kontinuiranu opskrbu stanica središnjeg živčanog sustava (Vučić Lovrenčić, Ročić, 2008).

U jetri se glukoza metabolizira u više smjerova; metabolizmom do CO_2 i H_2O može dati energiju ili se može pohraniti u obliku glikogena. Također, može poslužiti za sintezu neesencijalnih aminokiselina ili prijeći u masti, a u određenim stanjima iz glukoze mogu nastati ketonski spojevi. Organizmi koji ne mogu koristiti glukožu kao hranu sami sintetiziraju glukožu. Fotosintetski organizmi sintetiziraju glukožu reducirajući atmosferski CO_2 u trioze, a nakon toga pretvaraju trioze u glukožu. Nefotosintetski organizmi sintetiziraju glukožu putem glukoneogeneze.

Najveći dio ugljikohidrata nalazi se u jetri kao rezerva u obliku glikogena. Razgradnjom glikogena, odnosno glikogenolizom, oslobađa se glukoza koja zatim odlazi u krv. Adrenalin stimulira glikogenolizu u jetri i mišićima, dok glukagon samo u jetri. Suprotno tome, inzulin inhibira glikogenolizu.

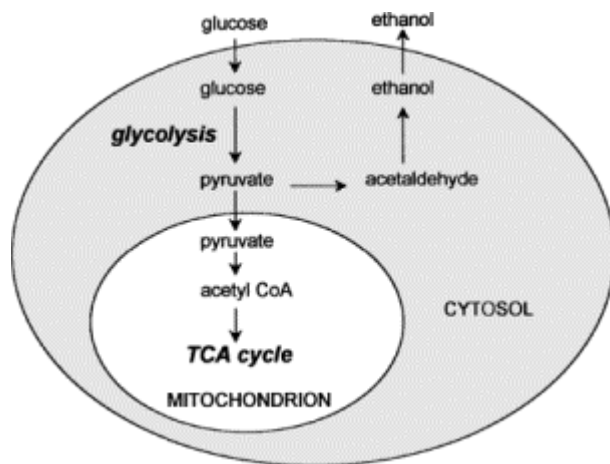
U jetri sinteza i razgradnja glikogena su regulirane kako bi se održavala koncentracija glukoze u krvi odnosno da se zadovolje potrebe svih organa za glukozom. Nasuprot tome, u mišićima sinteza i razgradnja glikogena regulirane su isključivo kako bi mišići imali dovoljno energije za rad (kontrakciju).

Glikogen fosforilaza u jetri je "senzor glukoze" ; hormonski je i alosterički regulirana. Alosteričko mjesto glukoze na glikogen fosforilazi, omogućava glikogen fosforilazi u jetri da djeluje kao senzor glukoze i da prema potrebi mijenja koncentraciju glukoze. Kada je koncentracija glukoze u krvi niska, glukagon kaskadnim mehanizmom aktivira fosforilaza b kinazu koja pretvara fosforilazu b u fosforilazu a, čime se inicira otpuštanje glukoze u krv. Kada se koncentracija glukoze u krvi vrati na normalu, glukoza ulazi u hepatocyte te se veže na (inhibitorno) alosteričko mjesto fosforilaze a. Inzulin djeluje indirektno tako što stimulira PP1 i time usporava razgradnju glikogena.

1.3.2. Glikoliza

Glikoliza je središnji metabolički put glukoze u kojem se glukoza razgrađuje do piruvata, odnosno laktata. Energija koja je pohranjena u molekuli glukoze se tijekom razgradnje glukoze oslobađa u obliku ATP i NADH, a najvećim dijelom ostaje pohranjena u molekuli piruvata. U aerobnim uvjetima na glikolizu se nastavlja ciklus limunske kiseline te proces staničnog disanja i oksidacijske fosforilacije, pri čemu se oslobađa energija i sintetizira ATP. Transaminacijom piruvata, oksaloacetata i α -ketoglutarata povezuje se metabolizam glukoze sa metabolizmom aminokiselina, a preko nastanka piruvata i iz njega nastalog acetyl-CoA sa metabolizmom lipida (Štraus i Petlevski,2009).

Glikolitička razgradnja glukoze je jedini izvor metaboličke energije u nekim tkivima i stanicama sisavaca (eritrocitima, meduli bubrega, mozgu, spermi). Biljke prilagođene za čuvanje škroba (gomolji krumpira), kao i neke vodene biljke, najveću količinu energije dobivaju glikolizom. Mnogi anaerobni mikroorganizmi su u potpunosti ovisni o glikolizi.



Slika 3. Shema stanice i lokacija glikolize

(http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2004_2/Page1.htm)

U reakcijama glikolize razlikujemo tri vrste kemijskih reakcija:

1. Razgradnju ugljikovog skeleta glukoze u piruvat;
2. Fosforilaciju ADP u ATP pomoću spojeva koji imaju visoki potencijal za prijenos fosforilnih skupina, fosforilacije na razini supstrata;
3. Prijenos hidronijevega iona (:H⁻) na NAD⁺ kako bi nastao NADH.

Glikolizu možemo prikazati kroz 10 reakcija:

1. Enzim heksokinaza fosforilira glukozu (prenosi fosfatnu skupinu s ATP-a) u citoplazmi pri čemu nastaje glukoza-6-fosfat.



2. Fosfoglukoizomeraza izomerizira glukozu-6-fosfat u fruktozu-6-fosfat.

Glukoza-6-fosfat(C₆H₁₁O₆P₁) + fosfoglukoizomeraza → Fruktoza-6-fosfat (C₆H₁₁O₆P₁)

3. Enzim fosfofruktokinaza, najvažniji kontrolni element glikolize, koristi još jednu molekulu ATP-a i prenosi fosfatnu skupinu na fruktozu-6-fosfat pri čemu nastaje fruktoza-1,6-bisfosfat.

Fruktoza-6-fosfat (C₆H₁₁O₆P₁) + fosfofruktokinaza + ATP → ADP + Fruktoza-1,6-bisfosfat (C₆H₁₀O₆P₂)

4. Aldolaza cijepa fruktozu-1,6-bisfosfat na 2 šećera koja su međusobno izomeri: dihidroksiaceton fosfat i gliceraldehid fosfat.

Fruktoza-1, 6-bisfosfat (C₆H₁₀O₆P₂) + aldolaza → dihidroksiaceton fosfat (C₃H₅O₃P₁) + gliceraldehid fosfat (C₃H₅O₃P₁)

5. Trioza fosfat izomeraza konvertira molekulu dihidroksiaceton fosfata u gliceraldehid-3-fosfat.

Dihidroksiaceton fosfat (C₃H₅O₃P₁) → Gliceraldehid fosfat (C₃H₅O₃P₁)

Energija se dobiva u reakcijama 6. – 10.

6. Egzergonom reakcijom dehidrogenacije uz NAD⁺, gliceraldehid-3-fosfat fosforilacijom prelazi u 3-fosfoglicerinsku kiselinu pri čemu nastaje jedna molekula ATP-a, odnosno iz 1 molekule glukoze nastaju 2 molekule ATP-a.

Trioza fosfat dehidrogenaza + 2 H⁻ + 2 NAD⁺ → 2 NADH + 2 H⁺

Trioza fosfat dehidrogenaza + 2 P + 2 gliceraldehid fosfat (C₃H₅O₃P₁) → 2 molekule 1,3-bisfosfoglicerat (C₃H₄O₄P₂)

7. Fosfoglicerat-kinaza prenosi fosfat sa 1,3-bisfosfoglicerata na molekulu ADP-a kako bi nastao ATP. To se odvija za svaku molekulu 1,3-bisfosfoglicerata zbog čega nastaju 2 molekule ATP-a.

1,3-bisfosfoglicerat (C₃H₄O₄P₂) + fosfoglicerokinaze + 2 ADP → 3-fosfoglicerat (C₃H₅O₄P₁) + 2 ATP

8. Fosfoglicerat-mutaza katalizira unutarmolekulsku pregradnju; položaj u 3-fosfogliceratu se mijenja dajući 2-fosfoglicerat.

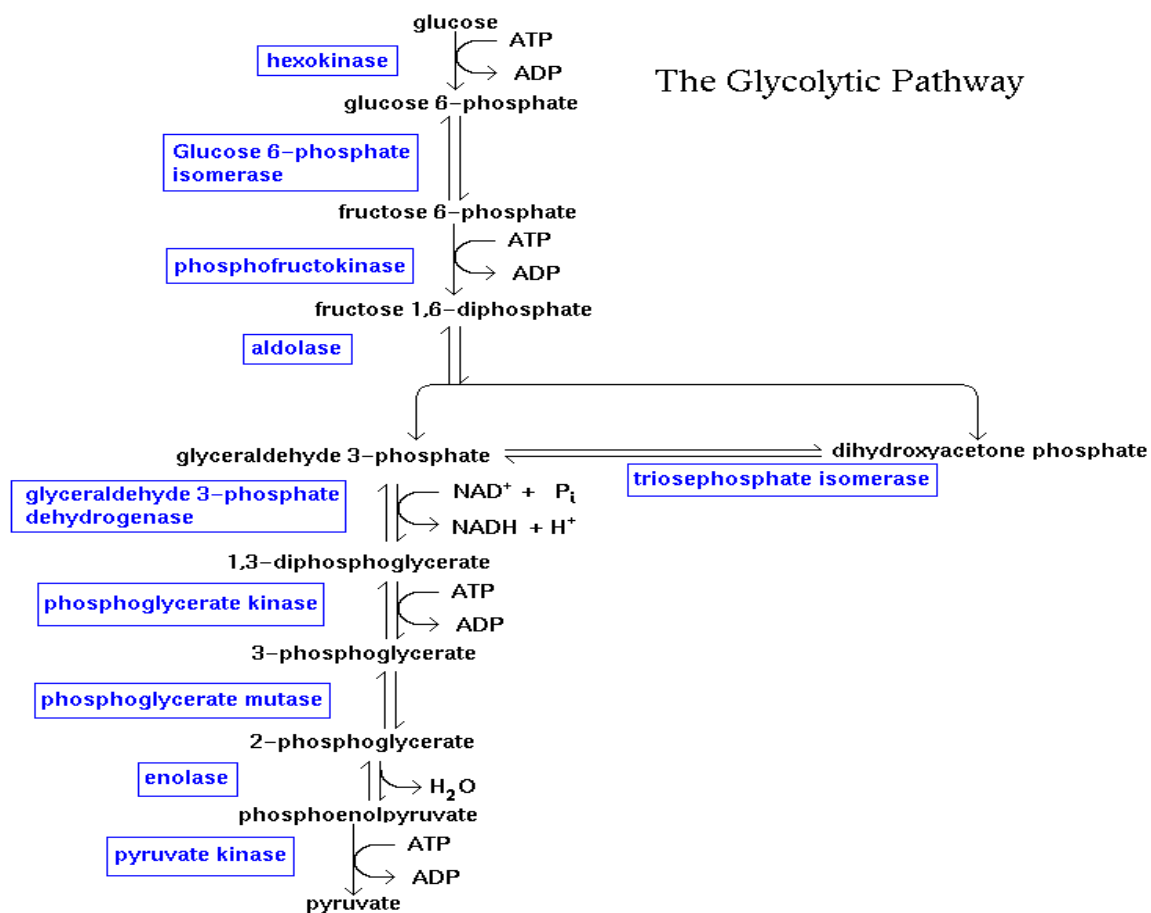
3-fosfoglicerat (C₃H₅O₄P₁) + fosfogliceromutaza → 2-fosfoglicerat (C₃H₅O₄P₁)

9. Dehidracijom 2-fosfoglicerata nastaje enol; nastaje fosfoenolpiruvat čije stvaranje katalizira enolaza.

2-fosfoglicerat (C₃H₅O₄P₁) + enolaza → fosfoenolpiruvat (PEP) (C₃H₃O₃P₁)

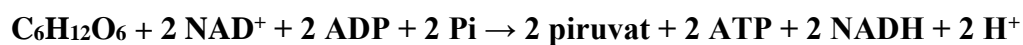
10. Posljednjom reakcijom nastaje piruvat i molekula ATP. Piruvat kinaza katalizira prijenos fosforilne skupine sa fosfoenolpiruvata na ADP. To se događa za svaku molekulu fosfoenolpiruvata, dakle nastaju 2 molekule ATP-a.

PEP (C₃H₃O₃P₁) + piruvat kinaza + 2 ADP → piruvat (C₃H₄O₃) + 2 ATP



Slika 4. Shema glikolize (<https://biochemist01.wordpress.com/tag/metabolic-pathway>)

Reakcija glikolize koja se odvija u citoplazmi može se pojednostavljeno i sažeto prikazati kao:



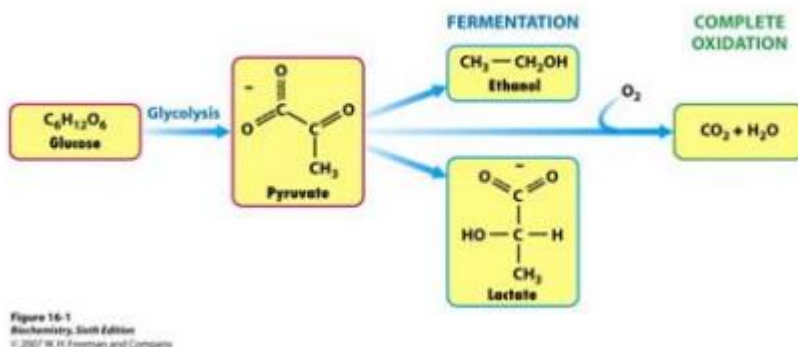
Po molekuli glukoze nastaju dvije molekule ATP-a, dvije molekule piruvata i dvije visokoenergijske molekule NADH.

Glikoliza se može odvijati u prisustvu i odustvu kisika.

Ukoliko je kisik prisutan, glikoliza je prvi korak staničnog disanja. U odsustvu kisika stanice glikolizom, tj. procesom fermentacije mogu proizvesti malu količinu ATP-a.

Anaerobna glikoliza, npr. u mišićnim stanicama kod povećanog rada, završava proizvodnjom laktata. Nastali laktat cirkulacijom dolazi u jetru gdje se konvertira u glukozu. Anaerobna glikoliza odvija se također i u eritrocitima kojima nedostaju enzimi ciklusa limunske kiseline i ostalim stanicama i tkivima uključujući mozak, gastrointestinalni trakt, adipozno tkivo i koža. Za razliku od aerobne kiseline, malo je toga poznato o promjenama anaerobne glikolize u šećernoj bolesti.

Sljedeći korak staničnog disanja, ciklus limunske kiseline koji se nadovezuje na glikolizu, ne odvija se u citoplazmi kao i glikoliza, već u mitohondriju.



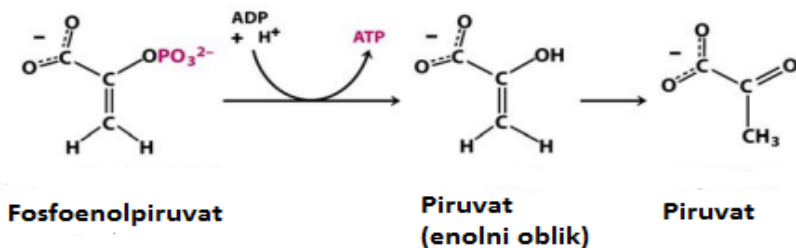
Slika 5. Načini razgradnje glukoze (Biochemistry, 6th edition, Berg, Tymoczko, Stryer)

1.3.3. Piruvat kinaza

Piruvat kinaza (PK, ATP-piruvat-O-fosfotransferaza, EC 2.7.1.40) je tetramerski enzim veličine 57-kDa koji katalizira treću ireverzibilnu, odnosno, posljednju reakciju glikolize.

Piruvat kinaza katalizira prijenos fosfatne skupine sa fosfoenolpiruvata (PEP) na adenzin fosfat (ADP) pri čemu nastaje molekula adenzin fosfata (ATP), odnosno pretvorbu fosfoenolpiruvata u piruvat, centralni metabolički intermedijer koji se može dalje oksidirati ili koristiti kao gradivna jedinica.

Dva su koraka u reakciji koju katalizira piruvat kinaza u glikolizi. U prvoj reakciji dolazi do prijenosa fosfatne skupine sa fosfoenolpiruvata na adenzin difosfat pri čemu nastaju ATP i enolni oblik piruvata. U drugoj reakciji iz enolnog oblika piruvata nastaje funkcionalni keto-oblik koji je stanici potreban.



Slika 6. Reakcija koju katalizira piruvat kinaza (Biochemistry, 6th edition, Berg, Tymoczko, Stryer).

Za aktivnost ovog enzima potrebni su K⁺, te ili Mg²⁺ ili Mn²⁺ ioni. Iako reverzibilna, reakcija favorizira sintezu ATP-a.

Reakcija se tijekom procesa glukoneogeneze zaobilazi putem dva reakcijska koraka; prvu reakciju katalizira piruvat-karboksilaza, a drugu fosfoenolpiruvat-karboksikinaza. Iz piruvata karboksilacijom nastaje oksaloacetat pri čemu se troši molekula ATP-a, a zatim se na

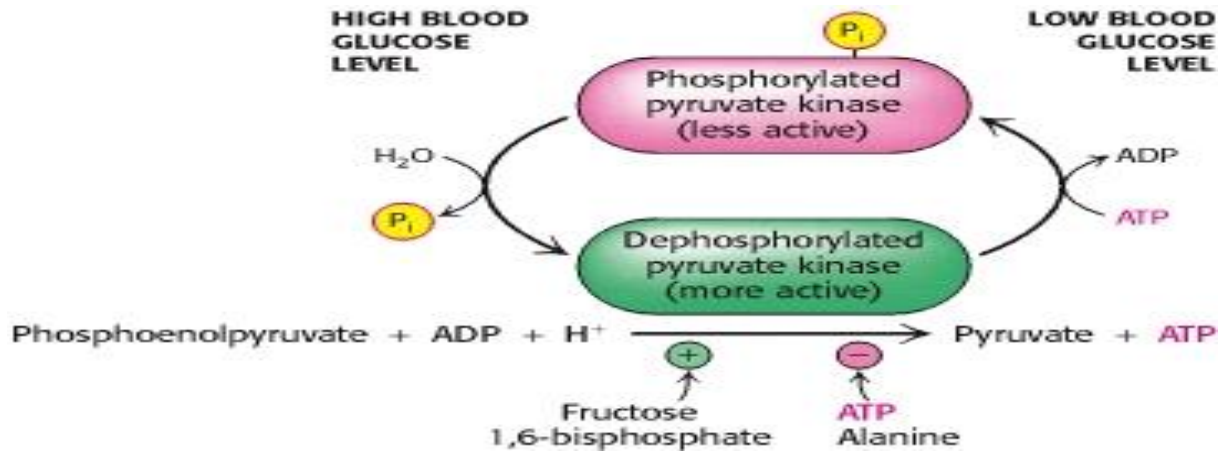
temelju još jedne visokoenergijske fosfatne veze oksaloacetat dekarboksilira i fosforilira dajući fosfoenolpiruvat. Zbroj tih dviju reakcija je:



U tkivu sisavaca je prisutno 4 različitih tkivno specifičnih tipova piruvat kinaze: M₁ izoenzim koji je pronađen u skeletnim mišićima, srcu i mozgu; M₂ izoenzim koji je prisutan u bubrezima, adipoznom tkivu i plućima; R izoenzim koji postoji u eritrocitima i L izoenzim pronađen u jetri. Svaki izoenzim podliježe drugačijoj regulaciji genske ekspresije i posjeduje određena kinetička svojstva koja omogućuju prilagodbu različitim metaboličkim potrebama tkiva.

R i L izoenzimi se razlikuju od M₁ i M₂ u tome što su oba isključivo alosterički i reverzibilno regulirani. Sa kinetičkog stajališta, R i L izoenzimi piruvat kinaze imaju dva glavna konformacijska stanja; jedno konformacijsko stanje ima visoki afinitet za supstrat, a drugo niski afinitet. R-stanje koje je karakterizirano visokim afinitetom za supstrat služi kao aktivirani oblik piruvat kinaze i stabilizirano je fosfoenolpiruvatom i fruktozom-1,6-bisfosfat čime se aktivira glikolitički put. T stanje, koje je karakterizirano niskim afinitetom za supstrat, služi kao inaktivirani oblik piruvat kinaze, veže ATP i stabilizirano je ATP-om i alaninom što uzrokuje fosforilaciju piruvat kinaze i aktivira glukoneogenezu.

Izoenzimske forme L ("Liver") i M ("Muscle") tip se razlikuju u različitim promjenama nastalim kovalentnim modifikacijama. Katalitička svojstva L-oblika, ali ne i M-oblika su kontrolirana i reverzibilnom fosforilacijom što dovodi do razlike u metabolizmu različitih organa; kada je razina glukoze u krvi niska, glukagonom pokrenuta cAMP kaskada dovodi do fosforilacije piruvat kinaze, odnosno njene inaktivacije. Hormonska pokrenuta fosforilacija prevenira da jetra ne troši glukozu ukoliko je potrebija mozgu ili mišićima.



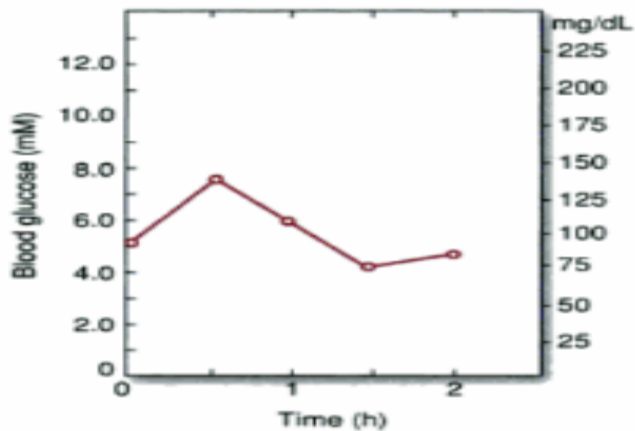
Slika 7. Regulacija katalitičke aktivnosti piruvat kinaze (Biochemistry, 5th edition, Berg, Tymoczko, Stryer)

Kinetičke studije govore da postoji i A-tip izoenzima piruvat kinaze kod sisavaca koji je prisutan u adipoznom tkivu, bubrezima i također u jetri (Carbonell 1973). A-tip izoenzima je aktiviran fruktozom-1,6-bisfosfat i inhibiran alaninom, no ne i ATP-om.

Piruvat kinaza iz viših biljaka ima veliki potencijal za regulaciju. Enzim je inhibiran ATP-om i relativno niskim koncentracijama citrata, komponente ciklusa limunske kiseline. Promjene u koncentraciji metalnih iona igraju također ulogu u regulaciji piruvat kinaze: aktiviraju je kalijeve i magnezijevi ioni, a inhibiraju kalcijevi (Ann.Rev.Biochem,1968).

1.4. Promjene razine glukoze u krvi nakon obroka

Nakon obroka bogatog ugljikohidratima, razina glukoze u krvi poraste sa ~5 mM, karakteristične vrijednosti za period gladovanja ("fasting"), na razinu od otprilike 8 mM u roku od 30-60 minuta. Nakon toga se počinje smanjivati i otprilike 2 sata nakon obroka se vrati na početnu razinu.



Slika 8. Graf promjene koncentracije glukoze u krvi nakon obroka u ovisnosti o vremenu (Marks Basic Medical Biochemistry, 2nd Edition)

Razina glukoze u krvi se poveća nakon obroka, a vrijednosti nakon apsorpcije glukoze ne prelaze preko ~7.7 mmol/L u normalnim zdravim tkivima jer tkiva uzimaju glukozu iz krvi, pohranjuju je ili postupno oksidiraju za energiju. Nakon obroka i absorpcije, koncentracija glukoze u krvi i dalje pada jer stanice metaboliziraju glukozu. Ukoliko bi nakon obroka došlo do kontinuiranog porasta koncentracije glukoze u krvi, visoke koncentracije glukoze izazvale bi otpuštanje vode iz tkiva zbog osmotskog efekta glukoze. Tkiva bi u tom slučaju postala dehidrirana što bi utjecalo na njihovu funkciju. U slučaju teške hiperglikemije moguća je pojava hiperosmolarne kome kao posljedica dehidracije mozga.

Nasuprot tome, kod kontinuiranog pada razine glukoze u krvi nakon obroka, tkiva ovisna o glukozu bi patila od manjka energije. Kod naglog pada razine glukoze u krvi, mozak ne bi bio sposoban proizvesti dovoljnu količinu ATP-a što bi za posljedicu imalo pojavu ošamućenosti i vrtoglavice, zatim malaksalosti i na kraju kome. Eritrociti ne bi bili sposobni proizvesti dovoljno ATP-a za održavanje integriteta njihove membrane, a posljedična hemoliza bi smanjila transport

kisika ostalim tkivima u tijelu. Na kraju, kod svih tkiva koja koriste kisik za proizvodnju energije bi došlo do prekida njihove normalne funkcije i smrt bi se mogla javiti kao posljedica.

Razarajući učinci previsoke ili preniske koncentracije glukoze se izbjegavaju zbog sposobnosti tijela da samo regulira razinu glukoze u krvi. Kada se koncentracija glukoze približava normalnim vrijednostima između obroka koje iznose ~5 mmol/L 2 sata nakon obroka, proces glikogenolize se aktivira u jetri. Jetreni glikogen je primarni izvor glukoze tijekom prvih nekoliko sati postprandijalno. Postupno, glukoneogeneza postaje dodatan izvor glukoze u krvi. Aktivni mišići i crvene krvne stanice osiguravaju laktat glikolizom; mišići također osiguravaju aminokiseline degradacijom proteina, a glicerol se oslobađa iz adipoznog tkiva. Čak i tijekom prolongiranog gladovanja razina glukoze u krvi se ne smanjuje dramatično. Nakon 5-6 tjedana gladovanja razina glukoze u krvi se smanjuje na otprilike 3.6 mmol/L.

1.4.1. Razina glukoze u krvi u stanju sitosti

Glavni faktori koji reguliraju razinu glukoze u krvi su sama koncentracija glukoze i hormoni, naročito inzulin i glukagon.

Povećana koncentracija glukoze u krvi nakon obroka potiče β -stanice gušterače na lučenje inzulina. Određene aminokiseline, naročito arginin i leucin, također stimuliraju otpuštanje inzulina. Razine glukagona u krvi, kojeg izlučuju α -stanice gušterače, mogu se povećavati ili smanjivati ovisno o sastavu obroka. Razine glukagona se smanjuju nakon obroka bogatog ugljikohidratima, a povećavaju nakon obroka bogatog proteinima. Nakon tipičnog obroka koji se sastoji od ugljikohidrata, masti i proteina, razine glukagona ostaju relativno konstantne, dok se razine inzulina povišuju.

Sudbina glukoze u jetri

Nakon obroka, jetra oksidira glukozu kako bi zadovoljila trenutne potrebe za energijom. Svaki višak glukoze se skladišti kao gorivo. Glikogen se sintetizira i pohranjuje u jetri, a glukoza se konvertira u masne kiseline i glicerol koji reagiraju dajući triacilglicerole. Nastali triacilgliceroli su pakirani u lipoproteine vrlo niske gustoće (VLDL) i transportirani u adipozno tkivo gdje se

masne kiseline pohranjuju. Regulatorni mehanizam kontrolira konverziju glukoze u pohranjena goriva. Povećanjem koncentracije glukoze u portalnoj veni jetre (lat. Venae portae hepatis), koncentracija glukoze u jetri se može povećati od razine gladovanja ~5mM do koncentracije 10-20mM. Posljedično, brzina reakcije glukokinaze se povećava zbog povišenih razina inzulina. Inzulin potiče skladištenje glukoze kao glikogena utječući na glukagon-stimuliranu fosforilaciju. Kao odgovor na inzulin, aktivira se fosfataza koja defosforilira glikogen sintazu (dovodi do aktivacije glikogen sintaze) i glikogen fosfatazu (dovodi do inhibicije enzima). Inzulin također promovira sintezu triacilglicerola koji su otpušteni iz jetre kao VLDL.

Sudbina glukoze u perifernim tkivima

Gotovo svaka stanica u tijelu oksidira glukozu za energiju. Određena tkiva, naročito mozak i ostala živčana tkiva te crvene krvne stanice posebno ovise o glukozu. Mozak zahtijeva prosječno 150g glukoze dnevno, a ostala tkiva otprilike 40 grama dnevno. Nadalje, sva tkiva zahtijevaju glukozu za put pentoze fosfata i mnoga tkiva koriste glukozu za sintezu glikoproteina i ostalih komponenti kojie sadrže ugljikohidrate. Inzulin stimulira transport glukoze u adipozne i mišićne stanice pomoću transportera glukoze. Ostala tkiva, kao što su jetra, mozak i eritrociti imaju drugačiji tip transportera glukoze koji nisu značajno pod utjecajem inzulina.

U mišiću, glikogen se sintetizira nakon jela sličnim mehanizmom kao i u jetri. Postoje metaboličke razlike između tih tkiva, ali inzulin stimulira sintezu glikogena u mišiću koji odmara kao što to radi i u jetri. Glavna razlika između mišića i jetre je što inzulin u većoj mjeri stimulira transport glukoze u stanice mišića, ali neznatno stimulira transport u stanice jetre.

1.4.2. Razina glukoze u krvi u stanju gladovanja

Tijekom gladovanja dolazi do sniženja razine glukoze u krvi, snižava se i razina inzulina, a razina glukagona raste. Navedene hormonalne promjene potiču jetru da razgradi glikogen procesom glikogenolize i proizvede glukozu glukoneogenezom kako bi se održale razine glukoze u krvi.

Nekoliko sati nakon obroka bogatog ugljikohidratima, razine glukagona počinju rasti. Glukagon se veže na površinu staničnih receptora i aktivira adenilat ciklazu što uzrokuje porast cAMP u

jetrenim stanicama. cAMP aktivira protein kinazu A koja fosforilira i inaktivira glikogen sintazu zbog čega se smanjuje sinteza glikogena. U isto vrijeme protein kinaza A stimulira razgradnju glikogena kroz 2 koraka: protein kinaza A fosforilira i aktivira fosforilazu kinaze. Ovaj enzim dalje fosforilira i aktivira glikogen fosforilazu koja katalizira fosforilizu glikogena pri čemu nastaje glukoza-1-fosfat koja se konvertira u glukozu-6-fosfat. Defosforilacijom glukoze-6-fosfat glukozu-6-fosfatazom nastaje slobodna glukoza koja zatim ulazi u krv.

Stimulacija glukoneogeneze

4 sata nakon obroka, jetra glikogenolizom i glukoneogenezom osigurava glukozu u krvi. Hormonske promjene uzrokuju da periferna tkiva oslobode prekursore koji će osigurati ugljik za glukoneogenezu, naročito laktat, aminokiseline i glicerol. Regulatorni mehanizmi osiguravaju pretvorbu glukoneogenih prekursora u glukozu.

Ovi regulatorni mehanizmi inaktiviraju glikolitičke enime piruvat kinazu, fosfofruktokinazu-1 i glukokinazu tijekom gladovanja i potiču pretvorbu ugljika u glukozu putem glukoneogeneze. Ovi mehanizmi se odvijaju u 3 koraka gdje se glikoliza i glukoneogeneza razlikuju:

1. piruvat (nastao iz laktata i alanina) se pretvara glukoneogenim putem u fosfoenol piruvat. PEP se ne pretvara u piruvat jer glukagon stimulirana fosforilacija inaktivira piruvat kinazu. Zbog toga PEP zamjenjuje korake glikolize i iz njega nastaje fruktoza-1,6-bisfosfat

2. Fruktoza-1,6-bisfosfat se pretvara u fruktozu-6-fosfat bisfosfatazom. Zbog glikolitičkih enzima fosfofruktokinaza-1 je pretežito inaktivna kao posljedica niskih razina fruktoze-2,6-bisfosfata, fruktoza-6-fosfat se ne konvertira natrag u fruktozu-1,6-bisfosfat. Niske razine fruktoze 2,6-bisfosfat su zbog fosforilacije fosfofruktokinaze-2 protein kinazom A koja je aktivirana zbog glukagona. Fruktoza-6-fosfat je konvertirana u glukozu-6-fosfat.

3. Glukoza 6-fosfat je defosforilirana glukozu-6-fosfatazom pri čemu nastaje slobodna glukoza. Zbog visoke K_m vrijednosti glukokinaze za glukozu, vrijednosti glukoze su niske u stanicama jetre tijekom gladovanja, glukoza se otpušta u krv.

Enzimi koji sudjeluju u glukoneogenezi, ali ne i glikolizi su aktivni tijekom gladovanja. Piruvat karboksilaza je aktivirana acetyl CoA koji nastaje tijekom oksidacije masnih kiselina.

Fosfoenolpiruvat karboksikinaza, fruktoza 1,6-bisfosfataza i glukoza-6-fosfataza su inducirane pa je količina enzima povećana. Fruktoza-1,6-bisfosfataza je također aktivna jer su razine fruktoze-2,6-bisfosfat, inhibitora enzima, niske.

4. Stimulacija lipolize

Hormonske promjene koje se događaju tijekom gladovanja stimuliraju razgradnju adipoznog tkiva na triacilglicerole. Postupno se masne kiseline i glicerol otpuštaju u krv. Glicerol služi kao izvor ugljika za glukoneogenezu. Masne kiseline postaju glavno gorivo za tijelo i oksidirane su do CO_2 i H_2O raznim tkivima što im omogućava smanjenu potrebu za glukozom. Tijekom produženog gladovanja, acetil CoA se pretvara u ketone koji ulaze u krv i služe kao dodatan izvor goriva za mišiće i mozak.

1.4.3. Razina glukoze u krvi u stanju produženog gladovanja

Tijekom produženog gladovanja dolazi do brojnih promjena u korištenju goriva. Ove promjene uzrokuju da tkiva počinju koristiti manje glukoze nego što ih koriste tijekom kratkoročnog gladovanja i da koriste goriva iz adipoznog tkiva (masne kiseline i derivate, ketone) zbog čega se razine glukoze u krvi ne smanjuju drastično. Najveća promjena koja se događa tijekom gladovanja je dramatičan rast ketonskih tijela nakon 3-5 dana gladovanja. Na tim razinama mozak i ostala živčana tkiva počinju koristiti ketone i posljedično oksidiraju manje glukoze nego što bi ih oksidirali tijekom normalne ishrane.

Kao posljedica smanjene uporabe glukoze, brzina glukoneogeneze u jetri se smanjuje, a tako i proizvodnja uree jer u ovom stanju gladovanja aminokiseline nastale razgradnjom postojećih proteina su glavni glukoneogeni prekursori. Smanjuje se potreba glukoze u tkivima, smanjuje se brzina degradacije proteina i posljedično brzina stvaranja uree. Proteini mišića i ostalih tkiva su zbog toga pošteđeni jer je manja potreba za aminokiselinama u glukoneogenezi.

Proteini iz tijela, naročito mišićni proteini, nisu primarno skladište kao što su glikogen i triacilgliceroli; proteini imaju mnogo funkcija kao npr. enzimi, strukturni proteini i mišićna kontrakcija. Ako su tkivni proteini degradirani u prevelikoj mjeri, funkcija tijela može biti

ozbiljno ugrožena. Ukoliko se gladovanje nastavi, ostali problemi kao što su infekcije se mogu pojaviti i osoba koje se izgladnjuje obično umire zbog nedostatka proteina koji uzrokuje malfunkciju većine organa. Zbog toga je porast razine ketona rezultat poštete proteina koja omogućuje individualcu preživljavanje dužeg perioda bez hrane.

1.5. *Betula pendula*, Roth. (Betulaceae)



Slika 9 i 10. *Betula pendula*, Roth. (Betulaceae) (https://en.wikipedia.org/wiki/Betula_pendula)

Obična breza, bjelogorično je drvo iz porodice Betulaceae. Drveće i grmlje roda *Betula* (Betulaceae) nastanjuje različite ekosisteme umjerene klime sjeverne hemisfere. Lišće, kora, sok i destilirana ulja se koriste za povećanje diureze i protiv reumatoidne boli i upale. Lišće se također koristi za kožne bolesti, za pospješivanje rasta i protiv ispadanja kose te protiv peruti i pjegica u kozmetičkim proizvodima. Iscjeljujuća svojstva kore roda *Betula* i ekstrakata kore su poznata diljem svijeta zbog čega se koriste se u tradicionalnoj medicini. Najviše se koristi u liječenju bolesti povezanih sa koštanim sustavom, uključujući artritis, reumu i giht, ali i renalnim kroničnim bolestima. Iako u svijetu postoji preko 100 različitih vrsta *Betule*, za samo otprilike 7 različitih vrsti *Betule* je dokumentirano da se tradicionalno koriste.

Fitokemijska istraživanja *Betula* vrsta dovela su do izolacije triterpenoida, diarilheptanoida, fenilbutanoida, lignana, fenola i flavonoida. Ekstrakti, frakcije i fitokemijske komponente izolirane iz vrsta *Betula* pokazali su in vitro i in vivo širok spektar farmakološke aktivnosti: imunomodulacijsko, antiinflamatorno, antimikrobno, antiviralno, antioksidativno, antidijabetsko, dermatološko, gastroprotektivno i hepatoprotektivno djelovanje. Antiartritičko i antikancerogeno djelovanje su dva glavna područja istraživanja koja se provode na ovim vrstama. Betulin i betulinska kiselina su 2 važna triterpenoida prisutna u *Betula* vrstama. Antikarcinogeni učinak betulina i betulinske kiseline se intenzivno proučavaju.

Betula pendula, Roth. i *Betula pubescens*, Roth. su široko rasprostranjene u Europi, ali i sjevernim dijelovima Azije. U *Betuli penduli*, Roth. (Betulaceae) pronađeni su triterpenski alkoholi i malonilni esteri, flavonolni glikozidi kao što su hiperozid i ostali kvercetinški glikozidi te fenolne komponente (kavena i klorogenska kiselina). Lišće *Betule pendule*, Roth. sadrži značajne količine polimernih proantocijanina.

Različiti ekstrakti vrste *Betule pendule*, Roth. (Betulaceae) istraživani su jer spriječavaju aktivnost slobodnih radikala. *Betula pendula*, Roth. je podvrgnuta postupku perkolacije sa 5 otapala različite polarnosti (heksan, kloroform, etil acetat, metanol i voda). Aktivnost spriječavanja slobodnih radikala ispitana je u različitim sustavima koristeći elektron spin rezonancijsku spektroskopiju (ESR). Rezultati su bazirani na stabilnom slobodnom radikalu DPPH, hidroksilnim radikalima dobivenih Fenton reakcijom i superoksidnim radikalima dobivenih X/XO sustavom. Većina polarnih frakcija posjedovala je visoko antioksidativnu aktivnost (Calliste et al.,2001).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Piruvat kinaza je enzim uključen u proces glikolize, ključni proces metabolizma ugljikohidrata u kojem dolazi do pretvorbe glukoze u piruvat uz dobivanje energije.

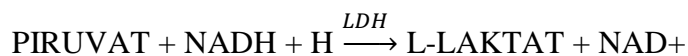
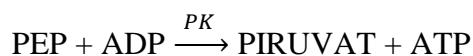
U šećernoj bolesti dolazi do hiperglikemije zbog apsolutnog ili relativnog nedostatka hormona inzulina koji sudjeluje u transportu glukoze u stanicu.

Aktivnost piruvat kinaze u šećernoj bolesti je smanjena jer u stanici jetre nema glukoze.

Cilj ovog istraživanja je ispitati hipoglikemijski učinak ekstrakta vrste *Betule pendule*, Roth. (Betulaceae) u rasponu koncentracija 0.05, 0.1 i 0.5 mg/mL i aktivnost piruvat kinaze (PK) u HepG2 stanicama u hiperglikemijskim uvjetima. Aktivnost enzima (PK) određena je spektrofotometrijski i izražena u internacionalnim jedinicama (U/L).

Hiperglikemijski uvjeti izazvani su tretiranjem stanica sa 20mM glukozom.

Metabolička aktivnost enzima mjerena je u kvarcnim kivetama kao promjena apsorpcije u minuti na 340nm pri 25°C. Do promjene apsorpcije dolazi zbog oksidacije NADH u NAD⁺ i konverzije piruvata u laktat u reakciji koja je katalizirana laktat dehidrogenazom:



Reakcijska otopina sadržavala je 50mM TRIS pufera pH 7.4, 40mM KCl, 5mM MgSO₄, 10umts LDH (1μl/uzorak), 0.2mM NADH, 1mM PEP i 1mM ADP.

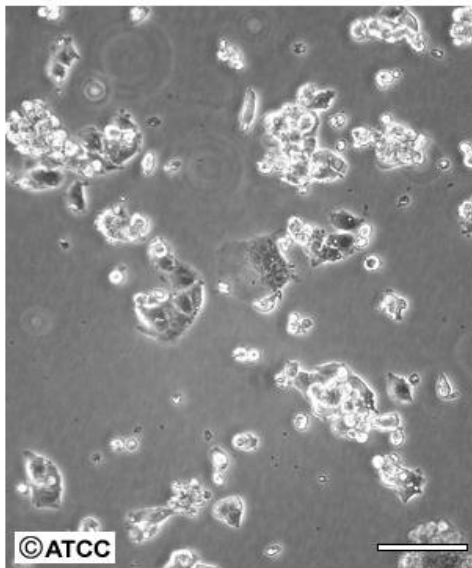
Rezultati sustatistički obrađeni u Microsoft Excel 2007 programu.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kultura stanica HepG2

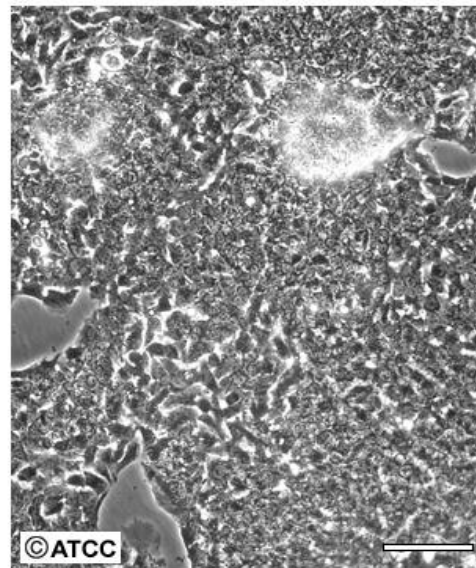
Kultura stanica hepatocita humanog karcinoma jetre HepG2 (engl. *American Type Culture Collection*, ATCC) vrsta je trajne kulture stanica. To su adherentne stanice koje rastu prihvaćene uz podlogu do trenutka postizanja 100%-tne konfluentnosti ili do iscrpljivanja hranjive podloge na kojoj rastu. Ova kultura kultivirana je u potpunom hranjivom MEM mediju (engl. *Minimum Essential Medium*) uz dodatak fetalnog goveđeg seruma (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS) krajnje koncentracije od 10% u inkubatoru na 37 °C u struji zraka s 5%-tnim CO₂ i relativnom vlažnosti od 95%.

ATCC Number: **HB-8065**
Designation: **Hep G2**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

Slika 11. HepG2 stanice (<https://www.lgcstandards-atcc.org>)

3.1.1. Priprema kulture HepG2

Kultura stanica HepG2 koja je korištena u ovom radu pohranjena je u potpunom MEM mediju, bez dodatka antibiotika ili antimikotika uz dodatak krioprezervansa dimetil sulfoksida (DMSO) u tekućem dušiku na -96°C .

Prije pokusa stanice su odmrznute tzv. „brzom metodom odmrzavanja“ u kupelji na 37°C . Ampula sa odmrznutim HepG2 stanicama prenesena je u Laminar flow uređaj za rad u sterilnim uvjetima.

U flask (BD Falcon) od 25 cm^2 stavljeno je 10 mL potpunog MEM medija. Flask je prenesen u inkubator kako bi se zagrijao na 37°C . Nakon što je flask izvađen iz inkubatora, pipetom se prenesu stanice u flask koji se zatim pohrani u inkubator na 37°C u struji zraka sa 5%-tnim CO_2 i relativnom vlažnosti od 95%. Nakon 48h kada se postigne konfluentnost veća od 80%, odsiše se medij sa stanica, ispire sa 5mL fosfatnog pufera (engl. Phosphate buffer saline, PBS), odsiše se PBS, ispire sa 5 mL EDTA-fiziološke otopine (EDTA-F.O.), odsiše EDTA-F.O. i na kraju dodaje 1 mL 0.5%-tnog tripsina kako bi se stanice odvojile od podloge i flask se stavlja u inkubator na 5 minuta. Zatim se u flask dodaje još 5mL potpunog MEM medija kako bi se tripsin razrijedio. Na kraju se resuspendiraju stanice, prenesu u „Falcon“ epruvetu (BD Falcon) od 15 mL i centrifugiraju 10 min na 1200 rpm (Biofuge stratos, Heraeus). Supernatant se dekantira, a talog resuspendira u 3 mL medija i prenese u flask od 75 cm^2 u koji se prethodno stavi 25 mL potpunog MEM medija. Flask se stavi u incubator na 37°C u struji zraka s 5%-tnim CO_2 i relativnom vlažnosti od 95% na 48h.



Slika 12. BD Falcon (<http://www.biosorfa.com/>)

3.2. Vijabilnost HepG2 stanica

Vijabilnost i broj stanica određuju se metodom bojanja stanica bojom tripan plavo (Tripan Blue). Metoda se temelji na tome da Tripan Blue boja ulazi u mrtve stanice dok žive stanice ostaju nebojane jer one aktivno izbacuju boju u okolinu putem membranskih pumpi. Nebojene stanice se zatim broje pod svjetlosnim mikroskopom.

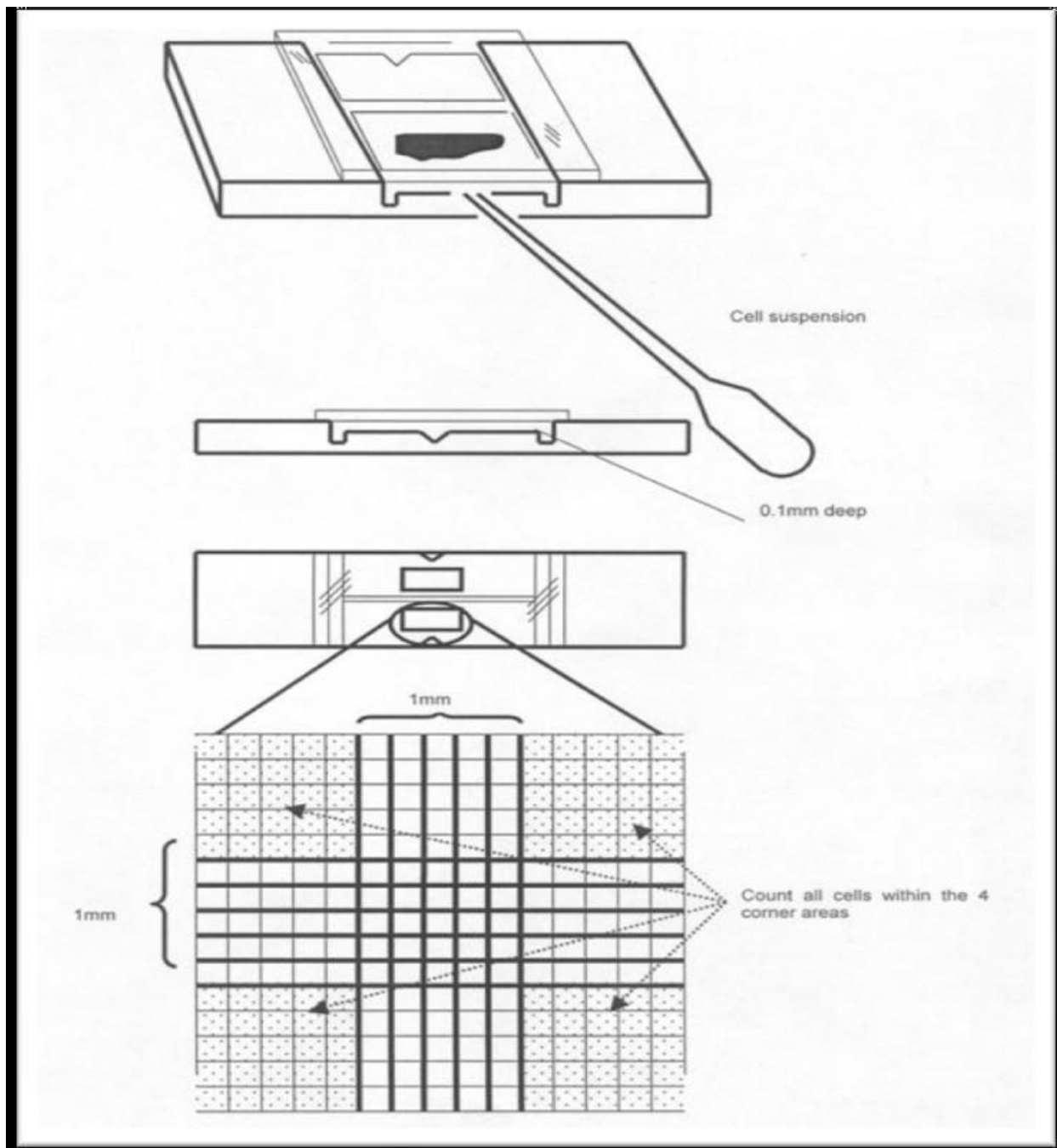
Nakon inkubacije od 48h HepG2 stanice se ponovo presađuju.

Postupak pripreme stanica za bojanje je jednak onome za rasađivanje stanica: ispiranje stanica PBS-om i EDTA-F.O., tripsiniziranje stanica i centrifugiranje, dekantiranje supernatanta, resuspendiranje taloga u 3 mL kompletnog MEM medija.

Za brojanje stanica u „eppendorf“ epruveti se pomiješa 50 μ L suspenzije stanica i 50 μ L 0,04% otopine boje Tripan Blue, te se ostavi na sobnoj temperaturi 10 min. Stanice se broje pomoću Bürker –Turkove komorice pod svjetlosnim mikroskopom.

Točan broj stanica izračuna se po formuli:

(ukupan broj stanica u 4 velika kvadrata/ 4) x 10 000 x 2 = broj stanica / mL



Slika 13. Shematski prikaz Burker-Turkove komorice i princip brojanja stanica (Burker Turk counting chamber, 2010., http://www.who.int/vaccines/en/poliolab/webhelp/Chapter_04/4_2_Cell_culture_proc)

3.3. Tretiranje stanica glukozom i *Betulom pendulom*

HepG2 stanice nasade se na pločice sa 6 bunarića (engl. *six –well plates*, BD Falcon). Za tretiranje se koristi 1 670 000 stanica po bunariću. Potom se stanice inkubiraju 24 sata na 37° C u struji zraka s 5% CO₂ i relativnom vlažnosti od 95%. Prije tretiranja stanica odsiše se medij i ispere s PBS-om nakon čega se odsiše PBS.

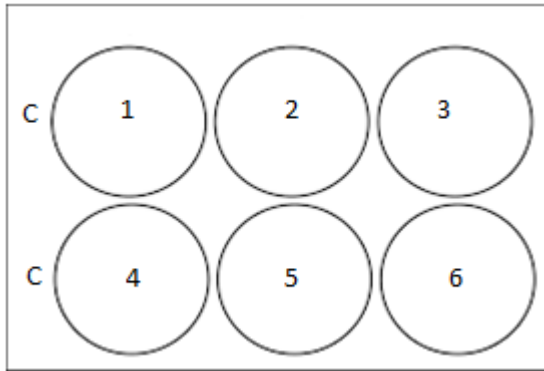


Slika 14 i 15. *six –well plates*, BD Falcon (<https://www.fishersci.com/>)

Stanice se tretiraju prema sljedećoj shemi:

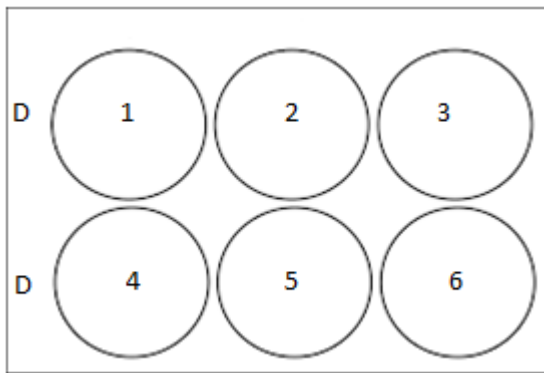
Odvagane su različite mase praha *Betule pendule*, Roth. (Betulaceae) i otopljene. Dobivene su tri različite koncentracije: 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL i 0,5 mg/mL.

Stanice su tretirane 20mM glukozom (D), zatim sa različitim koncentracijama *Betule pendule*, Roth. (Betulaceae) i glukozom (BP 0.05, BP 0.1, BP 0.5).



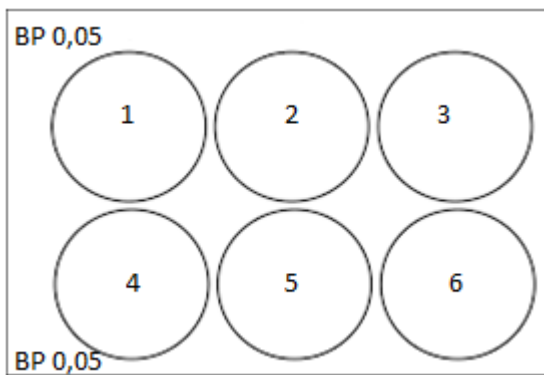
C= kontrola

→ HepG2 stanice tretirane medijem



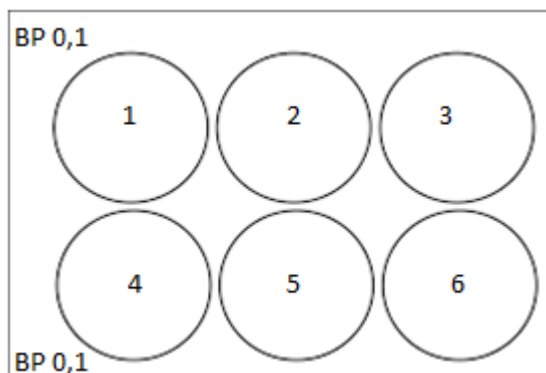
D=dijabetes

→ HepG2 stanice tretirane medijem i
20mM glukozom



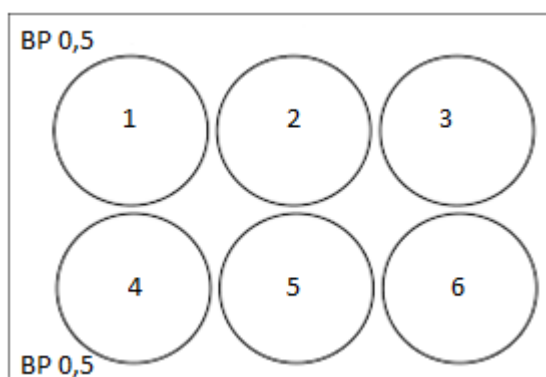
BP 0,05

→ HepG2 stanice tretirane medijem,
20mM glukozom i 0.05 mg/mL
otopinom *Betule pendule*, Roth.
(Betulaceae)



BP 0,1

→ HepG2 stanice tretirane medijem, 20mM glukozom i 0.1 mg/mL otopinom *Betule pendule*, Roth. (Betulaceae)



BP 0,5

→ HepG2 stanice tretirane medijem, 20mM glukozom i 0.5 mg/mL otopinom *Betule pendule*, Roth. (Betulaceae)

Nakon tretiranja stanica sa po 2 mL pripadajućih otopina, inkubiraju se 24 sata na 37°C u struji zraka s 5%-tnim CO₂ i relativnom vlažnosti od 95 %.

3.4. Liziranje HepG2 stanica i alikvotiranje uzorka za analizu

Nakon uklanjanja medija iznad svih stanica, adherirane stanice se ispiru sa po 2 mL PBS-a, zatim se odsiše PBS te se doda na stanice 500 µL pufera za liziranje stanica (PBS + Tween). Stanice se sastrugaju „scraperom“ (engl. *rubber policeman*) te se prenesu u „eppendorf“ epruvetice koje se drže na ledu. Ukupni volumen u svakoj „eppendorf“ epruvetici je 1 mL. Stanice su sonicirane 15 s (na jačini 4) da bi se razorila membrana i centrifugirane 40 min na 14 000 rpm na +4° C. Nakon toga se supernatant alikvotira. Načinjena su 3 alikvota , za svaku koncentraciju Betule. Svi uzorci su pospremljeni na -80° C do određivanja.

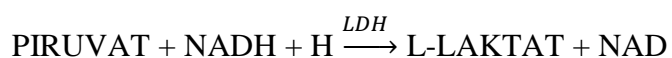
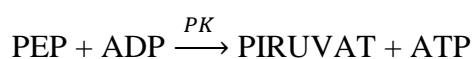
3.5. Određivanje aktivnosti piruvat kinaze (PK) u lizatu HepG2 stanica

Aktivnost piruvat kinaze (PK EC 2.7.1.40) određuje se spektrofotometrijski pri valnoj duljini $\lambda=340\text{nm}$ u kvarcnim kivetama. Jedinica aktivnosti definirana je kao količina enzima koja katalizira stvaranje 1 μmola piruvata po minuti. Mjeri se promjena apsorbancije u ovisnosti o vremenu $\Delta A/\text{min}$. Enzimska reakcija odvija se na 25°C . Reakcija je pokrenuta dodatkom laktat dehidrogenaze.

Za određivanje aktivnosti piruvat kinaze korištena je metoda Blaira i suradnika.

Piruvat kinaza katalizira prijenos fosfatne skupine prijenosa sa fosfoenolpiruvata na adenzin difosfat pri čemu nastaje piruvat koji s NADH i djelovanjem LDH prelazi u laktat (indikatorska reakcija), a ekvivalentna količina NADH se reducira u NAD. Smanjenje apsorbancije odgovara prelasku reduciranog oblika koenzima u oksidirani oblik i mjera je aktivnosti.

Reakcija:



Korišteni reagensi te njihovi volumeni i koncentracije:

Reagensi	mL	Fizikalna konc. mM/3mL
TRIS ph 7.4	1	50mM
KCl	0.1	40mM
MgSO ₄	0.1	5mM
LDH	0.1	10 UMTS
H ₂ O	1.35	
NADH	0.05	0.2mM
PEP	0.2	1mM
ENZIM (UZORAK)	0.1	-
ADP	0.1	1mM

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

U ovom istraživanju korištena je kultura stanica hepatocita humanog karcinoma jetre HepG2 koja je tretirana ekstraktom vrste roda *Betula pendula*, Roth. (Betulaceae) u tri koncentracije 0.05, 0.1 i 0.5 mg/mL. Nakon liziranja je u lizatima stanica određena aktivnosti enzima piruvat kinaze.

Stanice hepatocita koje nisu tretirane su služile kao kontrola (C).

Dobivene vrijednosti aktivnosti enzima ([U/L] i srednje vrijednosti (S.V.) i standardne devijacije (S.D) prikazane su tabelarno.

Kratice:

1. C=kontrola= HepG2 stanice u mediju (MEM)
2. D=dijabetes= HepG2 stanice tretirane 20mM glukozom
3. BP 0.05, BP 0.1, BP 0.5= HepG2 stanice tretirane 0.05, 0.1 i 0.5 M ekstraktom *Betule pendule*, Roth. (Betulaceae) i 20 mM glukozom

Formula za izračun:

$$U/L = \alpha A / \text{min} / \epsilon \times \text{kiveta (1 cm)} \times 10^6 \times \text{Vukupni} / \text{Vuzorka}$$

$$\epsilon (\text{NADH}) = 6.22$$

$$U/L = \alpha A / \text{min} \times 30 \times 10^6 / 6.22$$

Npr. Za kontrolni uzorak (C):

$$U/L = 0.134 \times 30 \times 10^6 / 6.22 = 646302.2 \text{ U/L}$$

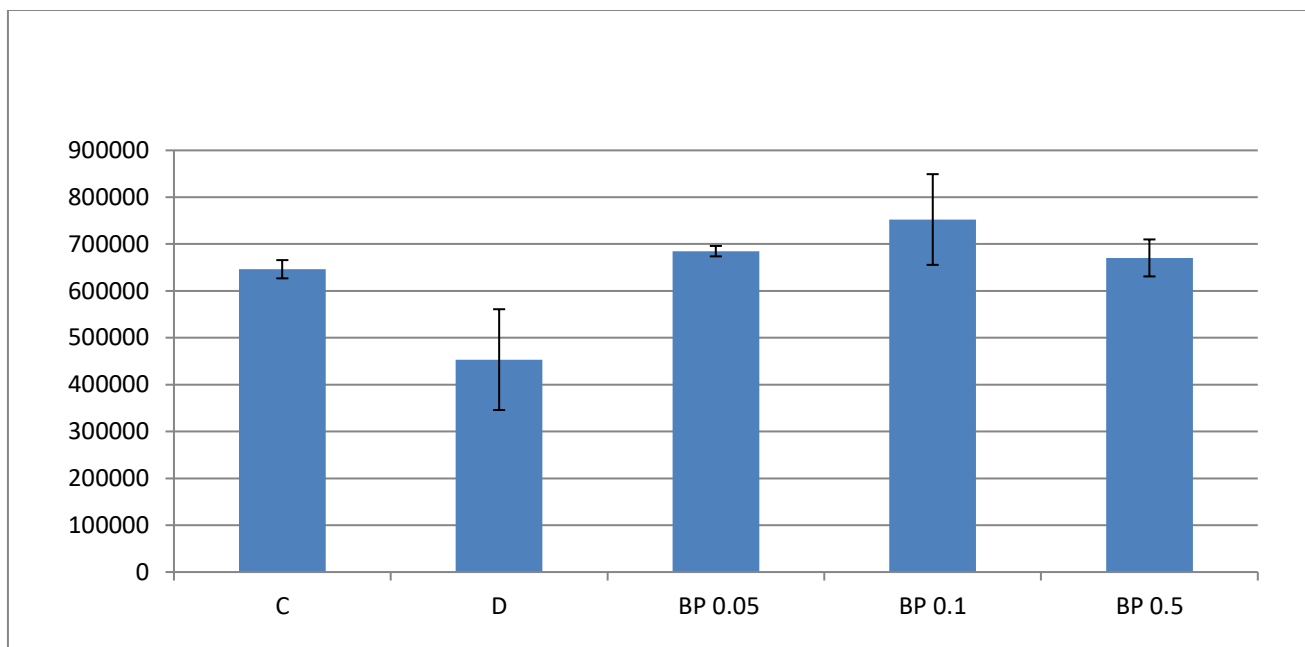
	A/30'	A/60'	A/90'	ΔA/min	U/L
1C	0.810	0.743	0.677	0.133	641479.1
2C	0.791	0.723	0.653	0.138	665594.85
3C	0.799	0.736	0.669	0.130	627009.65
S.V.				0.134	646302.2
S.D.				0.004041	19492.53

	A/30'	A/60'	A/90'	ΔA/min	U/L
1D	0.808	0.766	0.723	0.085	409967.85
2D	0.823	0.786	0.746	0.077	371382.64
3D	0.803	0.744	0.684	0.119	573954.98
S.V.				0.094	453376.2
S.D.				0.022301	107561

	A/30'	A/60'	A/90'	ΔA/min	U/L
1 BP 0.05	0.792	0.719	0.647	0.145	699356.91
2 BP 0.05	0.803	0.734	0.662	0.141	680064.3
3 BP 0.05	0.797	0.727	0.656	0.141	680064.3
S.V.				0.142	684887.459
S.D.				0.002309	11138.59

	A/30'	A/60'	A/90'	ΔA/min	U/L
1 BP 0.1	0.810	0.744	0.673	0.137	660771.73
2 BP 0.1	0.825	0.750	0.671	0.154	742765.27
3 BP 0.1	0.85	0.746	0.673	0.177	853697.75
S.V.				0.156	752411.575
S.D.				0.020075	96824.07

	A/30'	A/60'	A/90'	ΔA/min	U/L
1 BP 0.5	0.820	0.756	0.690	0.130	627009.64
2 BP 0.5	0.811	0.743	0.670	0.141	680064.3
3 BP 0.5	0.803	0.732	0.657	0.146	704180.06
S.V.				0.139	670418.006
S.D.				0.008185	39479.19



Slika 16. Grafički prikaz aktivnosti piruvat kinaze (U/L) u lizatu HepG2 stanica tretiranih 20mM glukozom i ekstraktom vrste *Betule pendule*, Roth. 0.05, 0.1 i 0.5 mg/mL.

Tražila se statistički značajna razlika između skupina. Za statističku obradu podataka odabran je Kruskal-Wallis test. Dobivena je p-vrijednost=0.04972. Za sva ispitivanja vrijednosti $p < 0.05$ smatra se statistički značajnom jer tada sa 95%-tnom sigurnošću možemo utvrditi da je razlika u rezultatima između dvije skupine signifikantna.

```
##
## Kruskal-Wallis rank sum test
##
## data: Aktivnost and Grupa
## Kruskal-Wallis chi-squared = 9.5012, df = 4, p-value = 0.04972
```

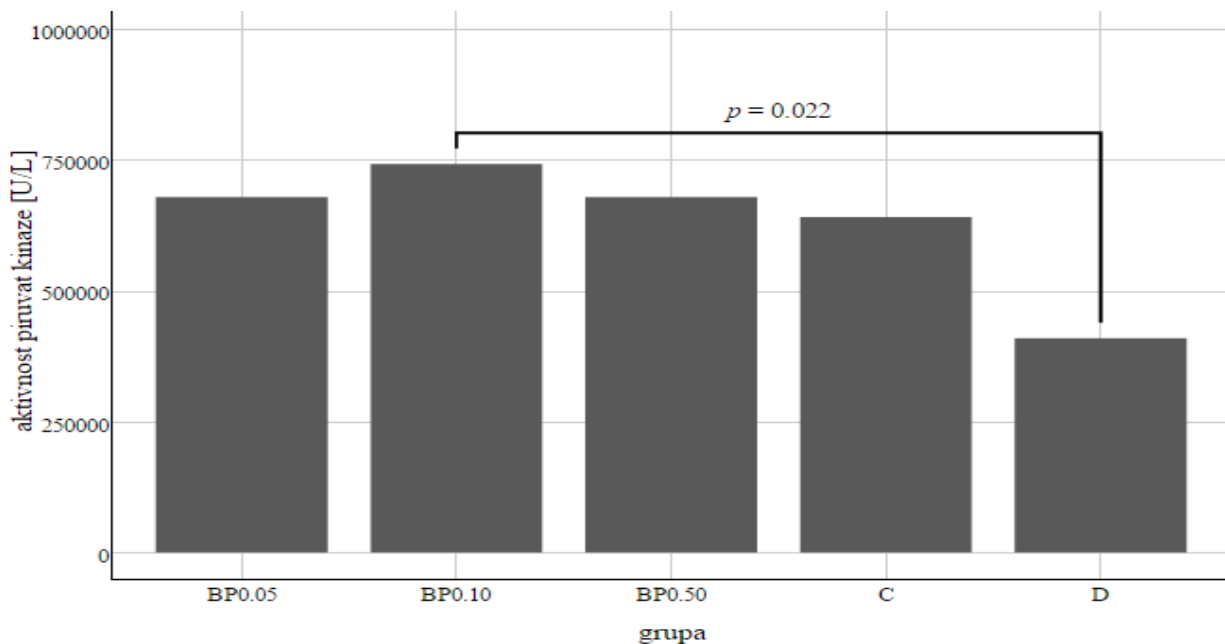
Slika 17. Prikaz statističke obrade podataka Kruskal-Wallis testom

Nakon dokazane statističke značajnosti korišten je Conover-Iman post hoc test za međusobnu usporedbu grupa uz korekciju p-vrijednosti Bonferroni metodom kako bi se utvrdila gdje se nalazi statistički značajna razlika između grupa.

Post hoc testom smo dokazali postojanje statistički značajne razlike između HepG2 stanica tretiranih 20mM glukozom (D) i HepG2 stanica tretiranih 0.1M ekstraktom *Betule pendule*, Roth. (Betulaceae) i 20 mM glukozom (BP 0.01).

```
##
## Pairwise comparisons using Conover's-test for multiple
##           comparisons of independent samples
##
## data: Aktivnost and Grupa
##
##      BP0.05 BP0.10 BP0.50 C
## BP0.10 1.000 - - -
## BP0.50 1.000 1.000 - -
## C      1.000 0.426 1.000 -
## D      0.053 0.022 0.167 1.000
##
## P value adjustment method: bonferroni
```

Slika 18. Prikaz statističke obrade podataka Conover-Iman post hoc testom.



Slika 19. Prikaz medijana aktivnosti piruvat kinaze u HepG2 stanicama tretiranih 20mM glukozom i ekstraktom vrste *Betule pendule*, Roth. 0.05, 0.1 i 0.5 mg/mL.

4.2. Rasprava

Glikoliza, glavni metabolički put glukoze, regulira sekreciju inzulina i metaboličku funkciju raznih stanica. U hepatocitima je glikoliza uključena u kontrolu hepaticke proizvodnje glukoze što u slučaju veće proizvodnje doprinosi hiperglikemiji u šećernoj bolesti.

U ovom istraživanju ispitan je hipoglikemijski učinak obične breze [lat. *Betula pendula*, Roth. (Betulaceae)] u tri koncentracije 0.05, 0.1 i 0.5 mg/mL na HepG2 stanice u hiperglikemijskim uvjetima. Stanice su istovremeno tretirane 20 mM glukozom i ekstraktom vrste *Betule pendule*, Roth. (0.05, 0.1 i 0.5 mg/mL). Aktivnost piruvat kinaze, enzima koji katalizira zadnji korak glikolize, određene su u lizatu HepG2 stanica spektrofotometrijski i izražene su u internacionalnim jedinicama (U/L). Aktivnosti glikolitičkih enzima u šećernoj bolesti pokazuju značajno niže vrijednosti u jetri i skeletnim mišićima.

Na temelju provedenog istraživanja je potvrđena manja aktivnost piruvat kinaze u šećernoj bolesti.

Uočen je pad aktivnosti (U/L=453376.2) piruvat kinaze kod stanica tretiranih samo 20 mM glukozom (D) u odnosu na kontrolnu skupinu (U/L=646302.2).

Uočen je statistički značajan ($p < 0.05$) porast aktivnosti enzima piruvat kinaze kod tretiranja stanica ekstraktom vrste *Betule pendule*, Roth. (0.05, 0.1 i 0.5 mg/mL) i 20 mM glukozom u usporedbi sa stanicama koje su tretirane samo 20 mM glukozom (D).

Najveći porast aktivnosti enzima piruvat kinaze pokazala je kultura stanica hepatocita humanog karcinoma jetre HepG2 stanice tretirana ekstraktom vrste *Betule pendule*, Roth. pri koncentraciji od 0.1 mg/mL i 20 mM glukozom (U/L = 752411.57).

Pretraživanjem znanstvenih baza podataka uočili smo da nema sličnih *in vitro* studija na staničnim modelima.

Obična breza (lat. *Betula pendula*), bjelogorično je drvo iz porodice Betulaceae koje raste u Europi i Aziji. U tradicionalnoj medicini istočne Europe se koristi kao diuretik i u terapiji reumatizma i bolesti zglobova. Unatoč dobro poznatim diuretičkim i antiinflamatornim svojstvima, lišće *Betule pendule* se često koristi i u terapiji šećerne bolesti jer prirodno prisutne

supstance mogu biti korisne kod komplikacija šećerne bolesti. Zbog antioksidativne aktivnosti mogu zaštititi stanice i tkiva koja su najpodložnija komplikacijama šećerne bolesti. Osim toga, prirodno prisutne tvari u *Betuli penduli*, Roth.(Betulaceae) mogu utjecati na enzime koji sudjeluju u metabolizmu ugljikohidrata kao što su inhibitori α -amilaze i α -glukozidaze čime reguliraju postprandijalni porast koncentracije glukoze.

Brojna istraživanja bavila su se proučavanjem fitokemijskih i farmakoloških svojstava roda *Betule*. Rezultati istraživanja ekstrakata *Betule pendule*, Roth. Schilchera i Raua iz 1988. pokazali su diuretičku aktivnost. Tunon i sur. u svojem istraživanju 1995. dokazali su antiinflamatorni učinak na temelju kojeg se *Betula* vrste koriste u liječenju reumatoidnih bolesti. Germano i sur. u svom istraživanju metanolnog ekstrakta lišće *Betule pendule*, Roth. (Betulaceae) proučavali su gastroprotektivni učinak in vivo i učinak na lipidnu peroksidaciju in vitro u štakorima kod kojih su čirevi izazvani 90%-tnim etanolom. Oralna primjena metanolnog ekstrakta lišća *Betule pendule*, Roth.pokazala je smanjenje gastričnih lezija induciranih primjenom etanola kao i inhibiciju lipidne peroksidacije koja doprinosi razvoju kardiovaskularnih komplikacija u šećernoj bolesti. Ghmire i sur. (2012.) proučavali su inhibicijski učinak na α -glukozidazu 80%-tnog metanolnog ekstrakta *Betule alnoides*, Roth.i utvrdili njegov antidijabetički učinak. Ahmad i sur. (2008.) potvrdili su antihiperглиkemijski potencijal ekstrakta *Betule utilis*, Roth. u štakora kod kojih je šećerna bolest izazvana streptozocinom, ali i svojstvo izazivanja respiracijskih alergija.

Piruvat kinaza (PK, ATP-piruvat-O-fosfotransferaza, EC 2.7.1.40) je enzim glikolize. Promijenjena aktivnost enzima utječe na metabolizam glukoze i proizvodnju energije. Na Sveučilištu u Iranu provedeno je istraživanje o utjecaju šećerne bolesti na aktivnost piruvat kinaze u štakora kod kojih je šećerna bolest inducirana streptozocinom. Aktivnost piruvat kinaze u kulturi stanica jetre je bila niža u štakora kod kojih je izazvana šećerna bolest. Uočena promjena aktivnosti piruvat kinaze tijekom šećerne bolesti utječe na smanjenje metabolizma glukoze i smanjenje proizvodnje adenzin trifosfata (ATP). U jetri dolazi do smanjenja brzine procesa glikolize i pojačane glukoneogeneze što upućuje na to da su ova dva metabolička puta u šećernoj bolesti poremećena. Također, uočena je i povećana aktivnost piruvat kinaze u inzulin-neovisnim tkivima kao što su bubrezi i leća. U inzulin-neovisnim tkivima unos glukoze je ovisan

o koncentraciji glukoze i nije posredovan inzulinom i transporterima. Zbog toga dolazi do povećanog unosa glukoze i posljedično povećanoj aktivnosti piruvat kinaze.

Provedena su brojna istraživanja na kulturama stanica i u štakora kod kojih je streptozocinom izazvana šećerna bolest kako bi se otkrile mogućnosti prevencije smanjenja aktivnosti piruvat kinaze. Potvrđen je aktivirajući učinak na piruvat kinazu u šećernoj bolesti kod aminogvanidina (Sveučilište u Iranu), inzulina i cinamaldehida (Anand i sur.).

Ovo istraživanje je pokazalo da je jedan od mogućih mehanizama postizanja hipoglikemijskog učinka *Betule pendule*, Roth. (Betulaceae) omogućavanje ulaska glukoze u stanicu jetre zbog porasta aktivnosti piruvat kinaze što omogućuje dovršetak procesa glikolize, odnosno daljni metabolizam ugljikohidrata.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitivan je hipoglikemijski učinak breze (lat. *Betula pendula*, Roth. Betulaceae) na aktivnost enzima piruvat kinaze (PK).

Istraživanje je rađeno na kulturi HepG2 stanica u hiperglikemijskim uvjetima.

U lizatu HepG2 stanica određena je katalitička aktivnost enzima spektrofotometrijski.

Na temelju rezultata dobivenih nakon istraživanja možemo zaključiti:

- 1) Uočen je statistički značajan pad ($p < 0.05$) aktivnosti enzima PK u lizatu HepG2 stanica tretiranih 20 mM glukozom (D) u odnosu na kontrolnu skupinu (C).
- 2) Tretiranje HepG2 stanica različitim koncentracijama *Betule pendule*, Roth. (0.05, 0.1 i 0.5 mg/mL) statistički je značajno povećalo aktivnost enzima PK ($p < 0.05$) u odnosu na skupinu tretiranu samo 20 mM glukozom (D). Statistički najveći porast aktivnosti pokazala je *Betula pendula*, Roth 0.1 mg/mL (BP 0.01).
- 3) Potrebno je provesti daljnja istraživanja na većem broju uzoraka *in vivo* i *in vitro* korištenjem *Betule pendule*, Roth. (Betulaceae) kako bi se potvrdio njezin pozitivan učinak u šećernoj bolesti.

6. LITERATURA

1. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Protein Turnover and amino acid catabolism. Biochemistry 5th ed. New York: WH Freeman Publisher, 2002.
2. Blair JB, Cimbala MA, Foster JL, Morgan RA. Hepatic pyruvate kinase. Regulation by glucagon, cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate and insulin in perfused rat liver. *J.Biol. Chem*, 1976, 251, 3756-3762.
3. Božičević S. Šećerna bolest. Medicinsko-biokemijska dijagnostika u kliničkoj praksi, Medicinska naklada, 2004, str. 123-133.
4. Bradley P. A handbook of scientific information on widely used plant drugs. British herbal compendium vol.2, 2006.
5. Cameron NE, Cotter MA. Rapid reversal by aminoguanidine of the neurovascular effects of diabetes in rats: Modulation by nitric oxide synthase inhibition. *Metabolism*. 1996, 45, 1147-1152.
6. Eigenbrodt E, Reinacher M, Scheefers-Borchel U, Scheefers H, Friis R. Double role for pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 1992, 3, 91-115.
7. Committee on Herbal Medicinal Products. *Betula pendula* Roth; *Betula pubescens* Ehrh. folium. Evaluation of medicines for human use. 2008.
8. Furlow JJ. The genera of Betulaceae in the southeastern United States. *J Arnold Arbor*, 1990, 82, 1-67.
9. Germano, Cacciola, Donato, Dugo, Certo, D'Angelo, Mondello, Rapisarda. *Betula pendula* leaves: Polyphenolic characterization and potential innovative use in skin whitening products.
10. Keinanen M., Julkunen-Tiitto R. High-performance liquid chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves, 1998, 370-377.
11. Kim SH, Hyun SH, Choung SY. Anti-diabetic effect of cinnamon extract on blood glucose in db/db mice, *J. Ethnopharmacol*, 2006, 119-123.
12. Kumar S, Barth A. Phosphoenolpyruvate and Mg²⁺ Binding to Pyruvate Kinase Monitored by Spectroscopy. *Biophysical Journal*, 2010.

13. Li TSC. Chinese and related North American herbs: phytopharmacology and therapeutic values. *CRC Press*, 2002.
14. Mahendran G, Thamotharan G, Sengottuvelu S, Narmatha Bai V. Anti-diabetic activity of *Swertia corymbosa* (Griseb.) Wight ex C.B. Clarke aerial parts extract in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 1175–1183.
15. McManus DP, Smith JD. Intermediary Carbohydrate metabolism in protoscoleces of *Echinococcus granulosus* (horse and sheep strains) and *E. multilocularis*. *Parasitol*, 1982, 351-366.
16. Menon, Sparks, Omoruyi. Hypoglycemic and hypocholesterolemic activities of the aqueous preparation of *Kalanchoe pinnata* leaves in streptozotocin-induced diabetic rats.
17. Muirhead H. Isoenzymes of pyruvate kinase. *Biochemical Society Transactions*, 18, 1990, 193–196.
18. Munoz E, Ponce E. Pyruvate kinase: Current status of regulatory and functional properties. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2003, 135, 197-218.
19. Oršolić N, Sirovina D, Končić MZ, Lacković G, Gregorović G. Effect of Croatian propolis on diabetic nephropathy and liver toxicity in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 2012, 117.
20. Ossipov V, Nurmi K, Loponen J, Haukioja E, Pihlaja K. High-performance liquid chromatographic separation and identification of phenolic compounds from leaves of *Betula pubescens* and *Betula pendula*. *J Chromatogr*, 1996, 721, 59-68.
21. Rastogi, Pandey, Rawat. Medicinal plants of the genus *Betula*-Traditional uses and a phytochemical-pharmacological review
22. Štraus B. Petlevski R. Ugljikohidrati. U: Štrausova Medicinska biokemija. Čvorišće D. Čepelak I. urednici. Zagreb. Medicinska naklada. 2009. str. 99-123.
23. Taylor L. *Kalanchoe pinnata*. *Texas: Tropical plant database*, 2012.
24. Tammeorg J, Kook O, Vilblaste G. The herbs of Soviet Estonia. *Esti NSV ravimtaimed*, 1984.
25. Yamada K, Noguchi T. Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem J*, 1999, 337, 1-11.
26. Tchamgoue AD, Tchokouaha LRY, Tarkang PA, Kuate JR, Agbor GA. *Costus afer* possesses carbohydrate hydrolyzing enzymes inhibitory activity and antioxidant

capacity in vitro. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine vol. 2015, 2015.

27. Vučić Lovrenčić M. Ročić B. Klinička biokemija šećerne bolesti. U: Klinička kemija i molekularna dijagnostika. Sertić J i suradnici. urednici. Zagreb. Medicinska naklada 2008. str. 82-90.

7. SAŽETAK

Šećerna bolest je najčešća metabolička bolest karakterizirana dugoročnom hiperglikemijom, a uzrokovana je nedostatkom, smanjenom sekrecijom i/ili nepravilnom funkcijom inzulina.

U šećernoj bolesti su aktivnosti enzima glikolize, metaboličkog puta razgradnje glukoze, smanjene zbog nedostatka glukoze u stanici.

Cilj ovog rada je bio ispitati hipoglikemijski učinak *Betule pendule*, Roth. (Betulaceae), odnosno, učinak na aktivnost piruvat kinaze (PK), enzima koji katalizira posljednji korak glikolize.

Aktivnost enzima izmjerena je u lizatu stanica. Istraživanje je pokazalo statistički značajno smanjenje aktivnosti enzima piruvat kinaze u lizatu HepG2 stanica tretiranih 20 mM glukozom u odnosu na kontrolnu skupinu. Tretiranje HepG2 stanica *Betulom pendulom*, Roth. (0.05, 0.1 i 0.5 mg/mL) i 20 mM glukozom statistički je značajno povećalo aktivnost enzima u odnosu na skupinu tretiranu samo 20 mM glukozom.

Rezultati ovog rada upućuju na hipoglikemijski učinak *Betule pendule*, Roth. (Betulaceae) (0.05, 0.1 i 0.5 mg/mL) u HepG2 stanicama u hiperglikemijskim uvjetima.

7.SUMMARY

Diabetes mellitus is widely spread epidemic disease characterized by chronic hyperglycemia that results from the absence of insulin, decreased secretion and /or impaired function.

In diabetes mellitus, glycolytic enzymes show decreased activity because no glucose is available in a cell.

The aim of this thesis is to investigate hypoglycemic effect of *Betula pendula*, Roth. (Betulaceae) on the activity of pyruvate kinase, the enzyme that catalyzes the final step of glycolysis.

Enzyme activity was measured in cell lysates. Treatment of cells with 20 mM glucose significantly decreased pyruvate kinase activity compared to the control group. Treatment with 20 mM glucose and *Betula pendula*, Roth. significantly increased pyruvate kinase activity compared to the group treated only with 20 mM glucose.

The results of this study indicate that *Betula pendula*, Roth. (Betulaceae) (0.05, 0.1 and 0.5 mg/mL) have a hypoglycemic effect in HepG2 cells in hyperglycemic conditions.

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Hipoglikemijski učinak *Betule pendule*, Roth. (Betulaceae) na aktivnost piruvat kinaze u HepG2 stanicama u hiperglikemijskim uvjetima

Iva Čunović

SAŽETAK

Šećerna bolest je najčešća metabolička bolest karakterizirana dugoročnom hiperglikemijom, a uzrokovana je nedostatkom, smanjenom sekrecijom i/ili nepravilnom funkcijom inzulina.

U šećernoj bolesti su aktivnosti enzima glikolize, metaboličkog puta razgradnje glukoze, smanjene zbog nedostatka glukoze u stanici.

Cilj ovog rada je bio ispitati hipoglikemijski učinak *Betule pendule*, Roth. (Betulaceae), odnosno, učinak na aktivnost piruvat kinaze (PK), enzima koji katalizira posljednji korak glikolize.

Aktivnost enzima izmjerena je u lizatu stanica. Istraživanje je pokazalo statistički značajno smanjenje aktivnosti enzima piruvat kinaze u lizatu HepG2 stanica tretiranih 20 mM glukozom u odnosu na kontrolnu skupinu. Tretiranje HepG2 stanica *Betulom pendulom*, Roth. (0.05, 0.1 i 0.5 mg/mL) i 20 mM glukozom statistički je značajno povećalo aktivnost enzima u odnosu na skupinu tretiranu samo 20 mM glukozom.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 48 stranica, 19 grafičkih prikaza, 6 tablica i 27 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *Betula pendula*, Roth. (Betulaceae), piruvat kinaza, kultura stanica HepG2, hiperglikemija

Mentor: **Dr. sc. Roberta Petlevski**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Roberta Petlevski**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Marija Grdić Rajković, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Dubravka Vitali-Čepo, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: veljača 2017.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of medicinal biochemistry and hematology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Hypoglycemic effect of *Betula pendula*, Roth. Betulaceae on pyruvate kinase activity in HepG2 cells under hyperglycemic conditions

Iva Čunović

SUMMARY

Diabetes mellitus is widely spread epidemic disease characterized by chronic hyperglycemia that results from the absence of insulin, decreased secretion and /or impaired function. In diabetes mellitus, glycolytic enzymes show decreased activity because no glucose is available in a cell. The aim of this thesis is to investigate hypoglycemic effect of *Betula pendula*, Roth. (Betulaceae) on the activity of pyruvate kinase, the enzyme that catalyzes the final step of glycolysis. Enzyme activity was measured in cell lysates. Treatment of cells with 20 mM glucose significantly decreased pyruvate kinase activity compared to the control group. Treatment with 20 mM glucose and *Betula pendula*, Roth. significantly increased pyruvate kinase activity compared to the group treated only with 20 mM glucose.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 48 pages, 19 figures, 6 tables and 27 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *Betula pendula*, Roth. (Betulaceae), pyruvate kinase, HepG2 cell culture, hyperglycemic conditions

Mentor: **Roberta Petlevski, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Roberta Petlevski, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marija Grdić-Rajković, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Dubravka Vitali-Čepo, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: February 2017.