

Tea Kljakić

**Ispitivanje inhibicije α -glukozidaze ekstraktima
komine masline**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Biokemija prehrane Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za kemiju prehrane pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2014-09-9143.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Dubravki Vitali Čepo i asistentici Kristini Radić te svim djelatnicama Zavoda za kemiju prehrane Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta na pomoći pri izradi ovog rada.

Sadržaj

1.	UVOD	1
1.1	Maslina i maslinovo ulje	1
1.2	Polifenoli masline.....	2
1.3	Komina masline.....	4
1.4	Dijabetes.....	5
1.5	Antidijabetici	6
1.5.1	Inhibitori α -glukozidaze	7
1.6	Enzimski kinetika	9
1.7	Inhibicija enzimske aktivnosti.....	11
2.	OBRAZLOŽENJE TEME.....	14
3.	MATERIJALI I METODE.....	15
3.1	MATERIJALI	15
3.1.1	Ispitivani materijal.....	15
3.1.2	Kemikalije	17
3.1.3	Instrumenti i oprema.....	18
3.2	METODE	19
3.2.1	Spektrofotometrijsko ispitivanje inhibicije α -glukozidaze.....	19
4.	REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1	Jačina inhibicije α -glukozidaze	26
4.2	Tip inhibicije α -glukozidaze.....	31
5.	ZAKLJUČCI	38
6.	LITERATURA.....	39
7.	SAŽETAK.....	45

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

1. UVOD

1.1 *Maslina i maslinovo ulje*

Maslina (*Olea europea* L., Oleaceae) je jedno od najstarijih kultiviranih stabala u svijetu. Koristi se za proizvodnju stolnih maslina i maslinovog ulja. Plod masline se sastoji od kožice, pulpe i sjemenke. Kemijski sastav ploda masline ovisi o sorti i uvjetima uzgoja.

Prerada ploda masline u maslinovo ulje temelji se na ekstrakcijskom procesu, u današnje vrijeme najčešće trofaznim ili dvofaznim centrifugiranjem. Trofaznim centrifugiranjem se uz maslinovo ulje posebno odvajaju i relativno suha komina masline te biljna voda, dok dvofaznim centrifugiranjem komina i voda izlaze zajedno dajući jedan nusprodukt (Alburquerque i sur., 2004).

Maslinovo ulje sastoji se većinom od triglicerida (98-99%). Najzastupljenija masna kiselina je mononezasićena oleinska kiselina (55-83%). U ulju su prisutni i fitosteroli, skvalen, tokoferoli, fenolne komponente, derivati terpenskih kiselina i drugi sastojci (Ramirez-Tortosa i sur., 2006). Sadržaj polifenola u maslinovom ulju može varirati ovisno o agronomskim čimbenicima, ekstrakcijskom procesu, skladištenju i procesu pakiranja (Tuck i Hayball, 2002). Fenolne komponente se nalaze u ulju u obliku fenolnih kiselina i alkohola, derivata oleuropeina, lignana i flavonoida. One kao antioksidansi doprinose stabilnosti ulja te utječu na organoleptička svojstva, uključujući gorak okus i boju (Bulotta i sur., 2014).

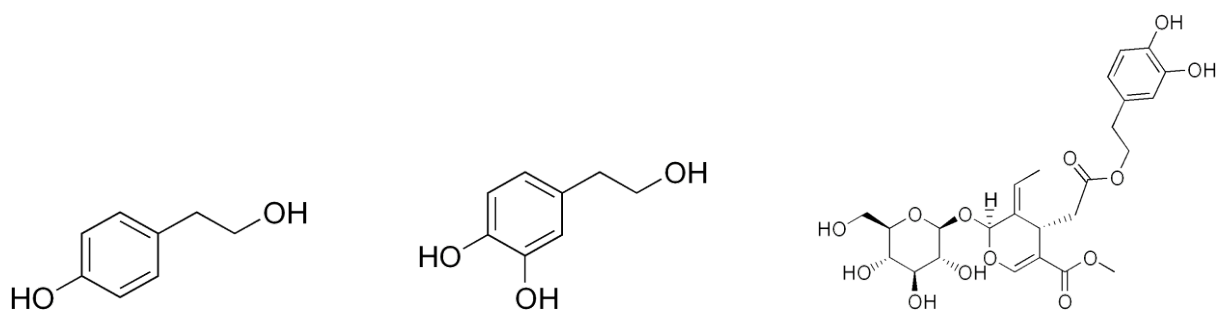
Kao tradicionalni lijekovi maslinovo ulje i listovi koriste se za tretiranje različitih stanja uključujući dermatitis, zacijeljivanje rana i tretman opekline, želučanu i intestinalnu bol, razne infekcije, reumatsku bol, hipertenziju, kao diuretik i druga (Barbaro i sur., 2014).

Povećani interes za mediteransku prehranu rezultat je mnogobrojnih studija o njezinim korisnim učincima za ljudsko zdravlje. Sastav masnih kiselina, vitamina i polifenola u maslinovom ulju, najvažnijoj komponenti takve prehrane, smatra se ključnim za njezine povoljne učinke.

1.2 Polifenoli masline

Polifenoli su organski spojevi koji sadrže najmanje jedan aromatični prsten s jednom ili više hidroksilnih grupa. Polifenoli iz hrane i bilja su dokazano snažni antioksidansi koji smanjuju razinu reaktivnih kisikovih spojeva pri tome čuvajući biomolekule od oksidativnog stresa. Oksidativni stres dovodi do povećanog rizika kroničnih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti i rak. Antioksidansi kao polifenoli tako mogu prevenirati oštećenja i smanjiti štetne učinke slobodnih radikala te posljedično reducirati rizik kroničnih bolesti. U istraživanjima polifenoli su pokazali i protuupalna, antiaterogena, antialergijska, antitrombotska te antikarcinogena svojstva (Bravo, 1998).

Mnogi korisni učinci maslina i maslinovog ulja na ljudsko zdravlje pripisuju se učinku polifenola, prvenstveno fenolnih alkohola kao što su hidroksitirosol i tirosol te sekoiridoida oleuropeina (strukture su prikazane na Slici 1). Oleuropein je glavna fenolna komponenta u lišću masline te u plodovima. Tijekom sazrijevanja ploda oleuropein se hidrolizira, producirajući različite produkte uključujući hidroksitirosol (Haris Omar, 2010).



Slika 1. Kemijske strukture tirosola, hidroksitirosola i oleuropeina
(preuzeto sa: <https://www.sigmaaldrich.com>)

Polifenoli masline su kao izolirane komponente i sastojci ekstrakata u istraživanjima pokazali između ostalog antioksidativni (Benavente-Garcia, 2000), antihipertenzivni (Susalit i sur., 2011), hipoglikemijski (Kontogianni i sur., 2013), hipokolesterolemijski (Jemai i sur., 2009) te protuupalni učinak (Khalatbary, 2012).

Jemai i sur. (2009) su ustanovili sniženje razine glukoze u krvi kod štakora s dijabetesom nakon primjene ekstrakata oleuropeina i hidroksitirosola te istovremeno sniženje kolesterola i poboljšanje antioksidativnog statusa. Ti rezultati sugeriraju da je antidijabetički učinak oleuropeina i hidroksitirosola usko povezan s njihovom sposobnošću smanjenja oksidativnog stresa uključenog u patologiju dijabetesa i njegovih komplikacija, što su potvrdile i druge studije (Al-Azzawie i Alhamdani, 2006, Poudyal i sur., 2010).

Suplementacija polifenolima lista masline tijekom 12 tjedana poboljšala je inzulinsku osjetljivost i pankreatični sekretorni kapacitet β stanica kod pretilih muškaraca s rizikom razvoja metaboličkog sindroma (De Bock i sur., 2013).

U PREDIMED studiji mediteranska prehrana bogata maslinovim uljem pokazala je redukciju od 40% u riziku od dijabetesa tipa 2 kod pacijenata s visokim kardiovaskularnim rizikom u usporedbi s kontrolnom grupom (Salas-Salvado i sur., 2014).

1.3 Komina masline

Komina masline je glavni nusprodukt proizvodnje maslinovog ulja. Sastoji se od vode, kožice ploda, pulpe i dijelova koštice, a zadržava i malu količinu ulja. Glavni kemijski sastojci su vlakna i šećeri, većinom polisaharidi, proteini, masne kiseline, polialkoholi, pigmenti i polifenoli. Kemijski sastav može varirati ovisno o agronomskim i tehnološkim uvjetima prerade (Brunetti i sur., 2005).

Iako se smatra otpadom, vrijedan je izvor bioaktivnih komponenti, od kojih su najvažniji polifenoli kao snažni antioksidansi, koje mogu imati korisne učinke za ljudsko zdravlje, primjenu u industriji hrane ili kozmetičkoj industriji (Nunes i sur.,2016). Polifenolne komponente se oslobađaju tijekom proizvodnje maslinovog ulja distribuirajući se u vodu i ulje u skladu s njihovom strukturom. Minimalna polifenolna frakcija od 2% prolazi u uljnu fazu dok većina polifenola iz ploda masline, prvenstveno hidroksitirozol, ostaju u komini masline (Chanioti i Tzia, 2017). Ulje komine masline, koje se može naknadno ekstrahirati iz komine, bogato je mononezasićenim masnim kiselinama, od čega u najvećoj količini oleinskom kiselinom, što ga uz dodatnu prisutnost vitamina E čini manje podložnim oksidaciji (Uribe i sur., 2013).

Sposobnost dugolančanih masnih alkohola komine masline za inhibiciju otpuštanja proupalnih medijatora dokazana je in vitro (Fernández-Arche i sur., 2009). Studija Hamdena i sur. (2009) je pokazala da su polifenoli komine masline efikasni u inhibiciji hiperglikemije i oksidativnog stresa povezanog s dijabetesom na štakorima s dijabetesom.

1.4 Dijabetes

Dijabetes spada u najbrže rastuće bolesti i jedan je od vodećih uzroka mortaliteta i morbiditeta u svijetu. Kronična je metabolička bolest karakterizirana perzistentnom hiperglikemijom koja je povezana s velikim brojem komplikacija kao što su nefropatija, neuropatija, bolesti srca i krvnih žila.

Uzrok dijabetesa tipa 1 je progresivna autoimuna destrukcija pankreatičnih β stanica koje proizvode inzulin što rezultira potpunom deficijencijom cirkulirajućeg inzulina. 90-95% ukupne dijabetičke populacije ima dijagnozu tipa 2 dijabetesa koji je karakteriziran inzulinskom rezistencijom kod koje inzulin cirkulira u dovoljnoj količini, ali receptori postanu neosjetljivi te inzulin ne može ostvariti svoj učinak, s obzirom da je nužna interakcija inzulina i receptora za ulazak glukoze u stanicu, što naposljetku dovodi do progresivnog defekta u inzulinskoj sekreciji. Njegova incidencija se povećava s različitim genetičkim i drugim povezanim faktorima kao što su dob, pretilost, stres, prehrana, nedostatak tjelovježbe te upala.

Kao prva linija liječenja preporuča se promjena životnog stila, uključujući zdravu i balansiranu prehranu, regularnu fizičku aktivnost i održavanje normalne tjelesne težine te izbjegavanje pušenja, kao prevencija ili odgoda komplikacija dijabetesa (Kaiser i Oetjen, 2014).

Puno pažnje se posvećuje ulozi oksidativnog stresa u patogenezi dijabetesa i njegovih komplikacija, kao posljedici kronične hiperglikemije koja dovodi do povećane mitohondrijske produkcije ROS, posebice superoksida. Aktiviraju se zatim razni signalni putevi koji mogu inhibirati inzulin signalne puteve i biti okidač upalnog procesa (Wright i sur., 2006). Zaustavljanje staničnog stresa u metaboličkim tkivima prevenirajući tako inzulinsku rezistenciju i upalu te protekcija beta stanica su poželjni ciljevi u liječenju ove kronične progresivne bolesti.

1.5 Antidijabetici

Rani oralni antidijabetici razvijeni tijekom 20. st. uključuju sulfonilureje, meglitinide, bigvanide, tiazolidindione i inhibitore α -glukozidaze. Noviji oralni antidijabetici otkriveni tijekom ranih godina 21. st. su GLP-1 analozi, DPP-IV inhibitori, analozi amilina i SGLT-2 inhibitori.

Bigvanidi, među kojima je najvažniji metformin, prvenstveno smanjuju hepatsku produkciju glukoze, ali smanjuju i intestinalnu apsorpciju glukoze i povećavaju periferni ulaz glukoze u stanice. Česte su gastrointestinalne nuspojave. Metformin dokazano smanjuje kardiovaskularne komplikacije i ne uzrokuje hiperinzulinemiju ili hipoglikemiju te se preporučuje kao prvi izbor lijeka kod pacijenata s dijagnozom DM2.

Sekretagozi, sulfonilureje i meglitinidi induciraju sekreciju inzulina iz β stanica gušterače blokiranjem kalijevih kanala čime se povećava influks kalcijevih iona koji stimuliraju sekreciju. Nuspojave koje se javljaju dugotrajnom primjenom sulfonilureja su hiperinzulinemija, hipoglikemija i povećanje tjelesne mase. Nedostatak primjene meglitinida je njihovo kratko djelovanje zbog čega je potrebno višestruko dnevno doziranje.

Tiazolidindioni djeluju kao agonisti PPAR- γ receptora koji ima važnu ulogu u regulaciji metabolizma lipida, proteina i ugljikohidrata te tako povećavaju osjetljivost stanica na inzulin. Nisu učinkoviti u monoterapiji nego se propisuju kao dodatni lijek kod inzulinske rezistencije. Povećanje tjelesne mase i retencija vode su najčešće nuspojave primjene tiazolidindiona, a poznate su i vrlo ozbiljne nuspojave kao zatajenje srca te povećanje kardiovaskularnih komplikacija (Mehanna, 2013).

Uz trenutno dostupne terapijske opcije, raste interes za biljnim lijekovima kao sigurnijim, lako dostupnim i pristupačnim alternativama sintetičkim lijekovima za liječenje dijabetesa. Prva opisana biljka s jasnim antidijabetičkim učinkom bila je *Galega officinalis* L., Fabaceae čiji glavni sastojak galegin, koji je odgovoran za antidijabetičko djelovanje, ima strukturu sličnu metforminu (Bedekar i sur., 2010).

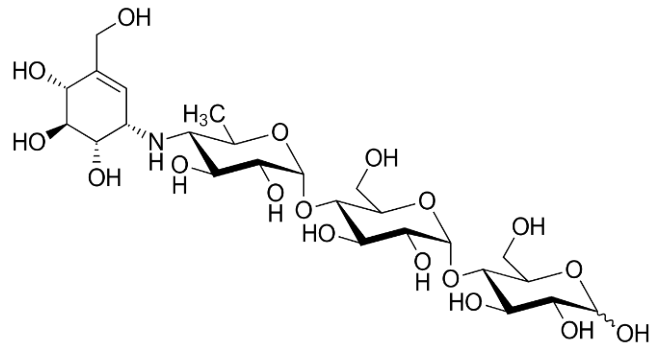
Neke od mnogih biljaka koje su istraživane i koje su pokazale hipoglikemijsko djelovanje su *Trigonella foenum-grecum* (Haber i Keonavong, 2013), *Momordica charantia* (El-Abhar i Schaalán, 2014), *Gymnema sylvestre* (Tiwari i sur.,2014), *Juglans regia* (Asgary i sur.,2008), *Allium sativum* (Ackermann i sur.2001) te *Urtica dioica* (Rahimzadeh i sur.,2014) s raznolikim mehanizmima djelovanja i aktivnim komponentama.

1.5.1 Inhibitori α -glukozidaze

Akarboza, miglitol i voglibos djeluju kao inhibitori enzima α -glukozidaze te je njihov antihiperglikemijski učinak rezultat kompetitivne i reverzibilne inhibicije tih membranski vezanih intestinalnih enzima.

α -glukozidaze hidroliziraju oligosaharide, nastale hidrolizom škroba α -amilazom, oslobađajući α -D-glukoze s nereducirajućih krajeva supstrata na četkastoj membrani tankog crijeva. Kod pacijenata s dijabetesom ova enzimski inhibicija rezultira odgađanjem apsorpcije glukoze i smanjenjem postprandijalne hiperglikemije. Naglo povećanje postprandijalnih koncentracija glukoze ima štetne učinke na endotelnu funkciju i miokardijalni tok krvi, inicira kaskadu proaterogenih i protrombotičkih događaja te aktivira upalu pridonoseći tako razvoju kroničnih komplikacija dijabetesa.

Akarboza se ne apsorbira te djeluje lokalno u crijevu. Njena pseudotetrasaharidna struktura (Slika 2.) omogućuje joj visoki afinitet za aktivne centre α -glukozidaze te stabilnost. Obzirom da akarboza inhibira α -amilazu i α -glukozidazu te sprječava razgradnju kompleksnih ugljikohidrata u glukoze, neprobavljeni ugljikohidrati stižu u kolon gdje ih bakterije razgrađuju stvarajući plinove i kratkolančane masne kiseline te tako uzrokuju GI nuspojave, nadutost i dijareju (Kalra, 2014).



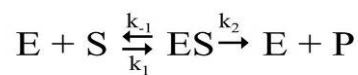
Slika 2. Kemijska struktura akarboze
(preuzeto sa: <https://www.sigmaaldrich.com>)

Liječenje akarbozom povezano je s dodatnim korisnim učincima kao što su poboljšanje lipidnog profila, reduciranje staničnih adhezivnih molekula, reduciranje zadebljanja intime medie i vraćanje normalne tolerancije glukoze (Derosa i Maffioli, 2012).

Mnogo ekstrakata biljaka i spojeva izoliranih iz prirodnih izvora poput polifenola, alkaloida, triterpena, kinina, flavonoida, antocijanina i antrakinona je pokazalo in vitro inhibiciju α -glukozidazne aktivnosti (Yin i sur., 2014). Većina α -glukozidaznih inhibitora identificiranih iz prirodnih produkata su potvrđeni kao nekompetitivni inhibitori (Matsui i sur., 2006).

1.6 Michaelis-Menten kinetika

Enzimi su biološke makromolekule koje djeluju kao katalizatori u biokemijskim reakcijama. Kako bi razumjeli način rada enzima, potrebni su nam kinetički opisi njihove aktivnosti. Michaelis-Menten model enzimske kinetike koji objašnjava kinetička svojstva mnogih enzima temelji se na jednostavnom konceptu nastanka enzim-supstrat kompleksa (ES) reakcijom enzima (E) i supstrata (S) pri čemu je k_1 konstanta brzine nastajanja kompleksa ES. Kompleks ES zatim može ponovno disocirati na enzim i supstrat (konstanta brzine k_{-1}) ili formirati produkt (P) uz oslobađanje enzima (konstanta brzine k_2):



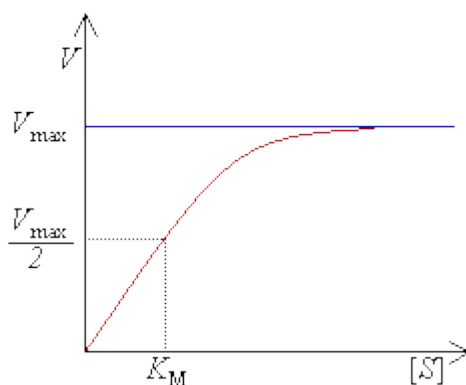
Model vrijedi za jednosupstratnu reakciju te pretpostavlja mjerenje početne brzine enzimske reakcije (v_0) u uvjetima kada je koncentracija produkta zanemarivo mala te je povratna reakcija pretvorbe produkta u ES kompleks zanemariva jer je $k_2 \gg k_{-1}$. U praksi, brzina reakcije mjeri se nakon što se pomiješaju enzim i supstrat te nakon što se uspostavi ustaljeno stanje u kojem su brzine nastajanja i razgradnje kompleksa ES jednake. U uvjetima kada se može zanemariti povratna reakcija, početna brzina nastajanja produkta proporcionalna je koncentraciji ES kompleksa. Do maksimalne brzine reakcije dolazi kada su sve molekule enzima u obliku ES kompleksa.

Michaelis-Menten jednadžba povezuje brzinu reakcije i koncentraciju supstrata pomoću dvaju kinetičkih parametara, V_{max} i K_m , koji se koriste za opisivanje svojstava enzimski kataliziranih reakcija:

$$v = \frac{v_{max} [S]}{[S] + K_m}$$

Michaelisova konstanta (K_m) predstavlja koncentraciju supstrata pri kojoj je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne brzine reakcije te izražava i afinitet enzima prema supstratu. Što enzim jače veže svoj supstrat manja je vrijednost K_m . K_m nekog enzima ovisi o supstratu i uvjetima okoline kao što su pH vrijednost i temperatura. Eksperimentalno se određuje mjerenjem početne brzine reakcije (v_0) pri različitim koncentracijama supstrata.

Michaelis-Menten krivulja prikazuje ovisnost brzine enzimske reakcije o koncentraciji supstrata (Slika 3.). Pri niskim koncentracijama supstrata brzina enzimske reakcije raste proporcionalno s povećanjem koncentracije supstrata i reakcija prati kinetiku prvog reda dok kod visokih koncentracija supstrata brzina dostiže maksimalnu vrijednost (V_{\max}) i pri tim je uvjetima konstantna i neovisna o koncentraciji supstrata te reakcija prati kinetiku nultog reda.



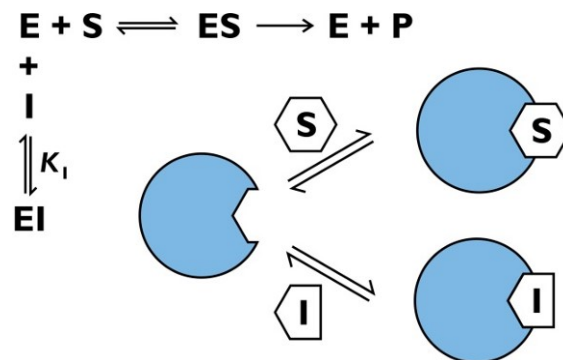
Slika 3. Michaelis-Menten krivulja
(preuzeto sa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Za preciznije određivanje kinetičkih parametara osmišljeni su linearni prikazi (Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Hanes-Wolf i Eisenthal-Cornish-Bowden) dobiveni transformacijama Michaelis-Menten jednadžbe (Seibert i Tracy, 2014).

1.7 Inhibicija enzimske aktivnosti

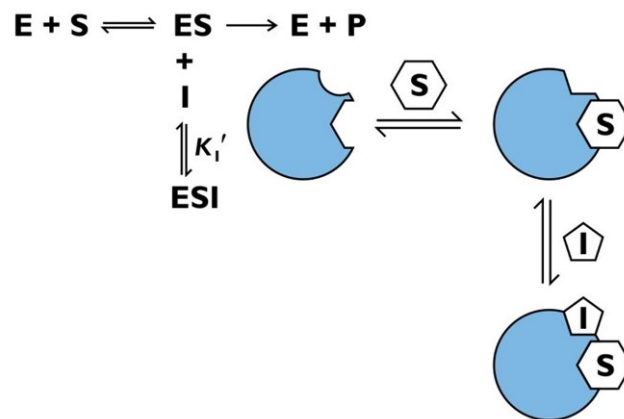
Inhibicija enzimske aktivnosti događa se vezanjem inhibitora na enzim pri čemu se usporavaju i/ili zaustavljaju enzimske reakcije. Inhibicija može biti reverzibilna i ireverzibilna. Za reverzibilne inhibitore karakteristična je brza disocijacija enzim-inhibitor kompleksa, dok je kod ireverzibilnih inhibitora ta disocijacija vrlo spora. U prisustvu inhibitora kinetički parametri koji se eksperimentalno određuju su prividni K_m i V_{max} (K_m^{app} i V_{max}^{app}). Razlikujemo kompetitivnu, akompetitivnu, nekompetitivnu i miješanu reverzibilnu inhibiciju.

Kompetitivni inhibitori natječu se sa supstratom za aktivno mjesto enzima i tipično su po svojoj strukturi slični supstratu. Enzim može vezati supstrat i inhibitor, ali ne oboje istovremeno. Kompetitivni inhibitor zbog toga povećava K_m , a ne utječe na V_{max} . Pri višim koncentracijama supstrata, više supstrata se može vezati na enzim te nadjačati inhibitor i nadvladati inhibiciju enzima.



Slika 4. Shematski prikaz kompetitivne inhibicije
(preuzeto sa: <https://www.pmf.unizg.hr>)

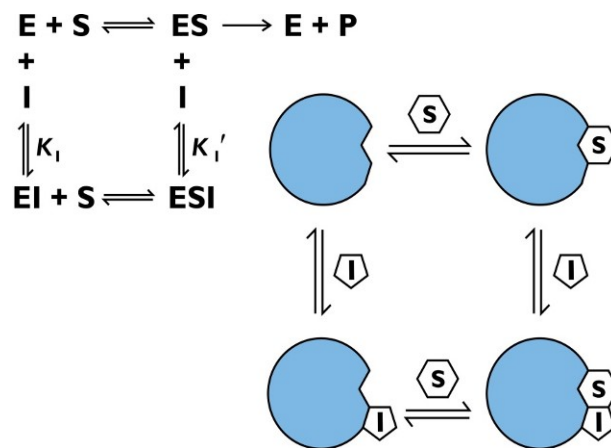
Akompetitivni inhibitor veže se na kompleks enzim-supstrat, a ne na slobodni enzim. Tek nakon reakcije sa supstratom dolazi do konformacijske promjene enzima pri čemu nastaje vezno mjesto za inhibitor. Akompetitivni inhibitor smanjuje i V_{max} i K_m . Ova se inhibicija ne može nadvladati povećanjem koncentracije supstrata.



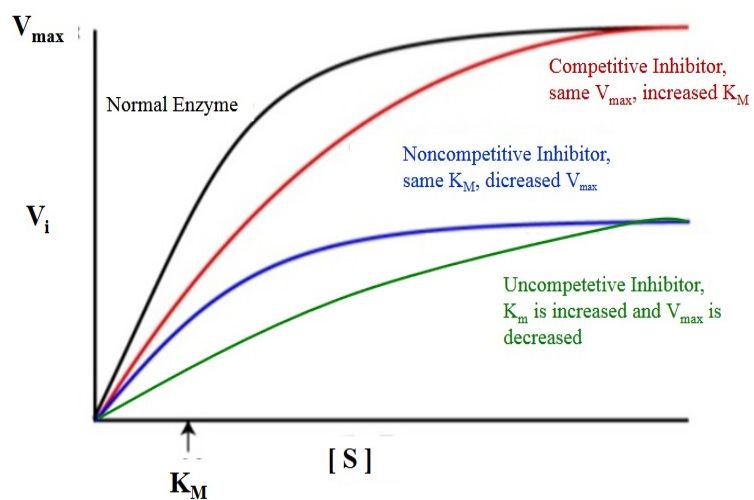
Slika 5. Shematski prikaz akompetitivne inhibicije
(preuzeto sa: <https://www.pmf.unizg.hr>)

Nekompetitivni inhibitor se veže na enzim na mjestu različitom od aktivnog mjesta i pritom ne sprječava vezanje supstrata na enzim. Iako ne smanjuje broj molekula enzima koje mogu vezati supstrat, prilikom vezanja na enzim inhibitor uzrokuje promjenu njegove konformacije te naposljetku reducira njegovu kalitičku aktivnost. Nekompetitivni inhibitor ne utječe na K_m , ali smanjuje V_{max} . Ova se vrsta inhibicije ne može nadvladati povećanjem koncentracije supstrata.

Kod miješane inhibicije inhibitor se može vezati na enzim i na kompleks enzim-supstrat u takozvano drugo aktivno mjesto. Inhibitor otežava vezanje supstrata pa se povećava K_m , a V_{max} se smanjuje (Bhagavan i Ha, 2011).



Slika 6. Shematski prikaz nekompetitivne (miješane) inhibicije
(preuzeto sa: <https://www.pmf.unizg.hr>)



Slika 7. Michaelis-Menten prikaz kompetitivne, nekompetitivne i
akompetitivne inhibicije (preuzeto sa: <https://commons.wikimedia.org>)

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Obzirom na povećanje konzumacije maslinovog ulja, povećava se proizvodnja, ali i količina otpada koji nastaje u tom procesu prerade. Otpad čine biljna voda i komina masline. Mala količina otpada rabi se kao hrana za životinje, biomasa i gnojivo, dok većina otpada ostaje neiskorištena što predstavlja veliki ekonomski teret za industriju maslinovog ulja te ima štetan utjecaj na okoliš. Komina masline bogata je bioaktivnim tvarima, posebice polifenolima kojima su dokazani brojni povoljni učinci na ljudsko zdravlje povezani s njihovom snažnom antioksidativnom aktivnošću. Jednostavnom i održivom tehnologijom ekstrakcije fenola dobili bismo produkt koji bi se mogao kasnije iskoristiti te bi tako pridali novu vrijednost otpadu uz ekonomske i ekološke koristi.

Dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da polifenoli masline i maslinovog ulja posjeduju sposobnost inhibicije α -glukozidaze što ih u kombinaciji s njihovim antioksidativnim učincima čini poželjnima u prevenciji komplikacija dijabetesa. Obzirom na sličnost polifenolnog sastava, bilo je logično pretpostaviti da bi i ekstrakt komine masline mogao posjedovati slična svojstva.

Stoga je cilj ovog rada bio utvrditi pokazuje li ekstrakt komine masline sposobnost inhibicije enzima α -glukozidaze, a ukoliko da, utvrditi mehanizam inhibicije te procijeniti jakost učinka usporedbom s nekim referentnim inhibitorima. Obzirom na sve veći broj oboljelih od dijabetesa i nuspojave sintetičkih antidijabetika, sve više pažnje se pridodaje biljnim lijekovima te polifenoli izolirani iz prirodnih izvora predstavljaju zanimljivu opciju u terapiji ove kronične bolesti.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

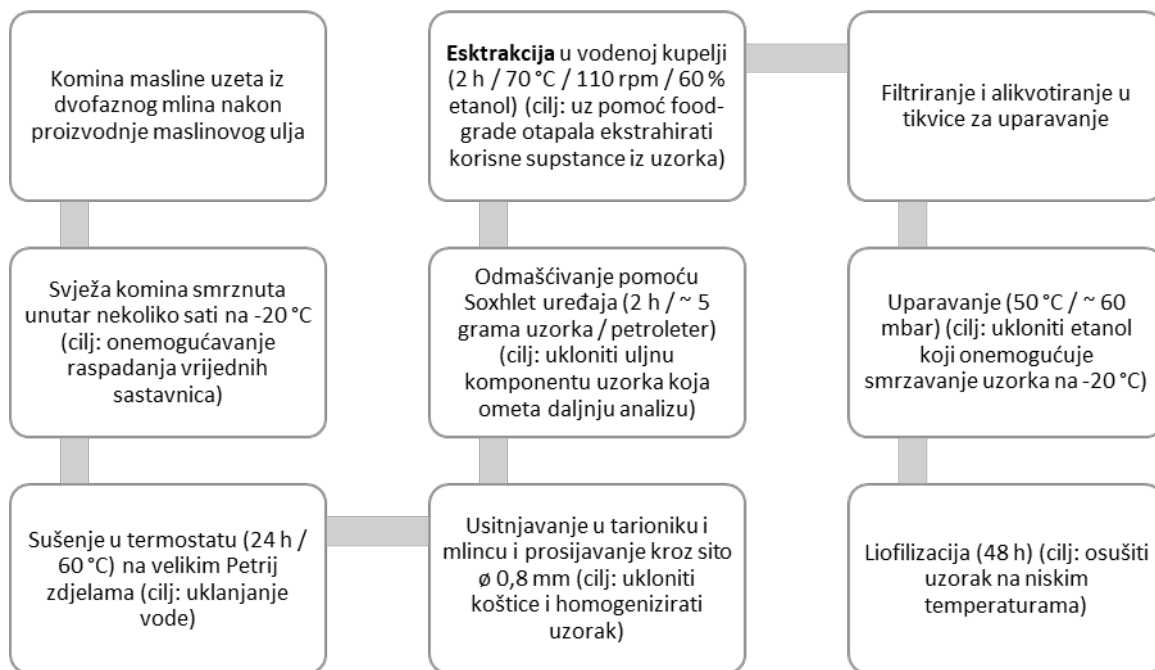
3.1.1 Ispitivani materijal

Ispitivanja su provedena na ekstraktima komine masline (*Olea europea* L. Oleaceae). Uz nativni uzorak (N) izrađeni su i uzorci s dodatkom ciklodekstrina, nasumično metiliranim- β -ciklodekstrinom (randomly methylated β -cyclodextrine – RAMEB) i hidroksipropil- β -ciklodekstrinom (HPB).

Tablica 1. Izrada ekstrakata komine masline korištenjem ciklodekstrina

oznaka uzorka	vrsta ciklodekstrina	masena koncentracija komine / gL^{-1}	masena koncentracija ciklodekstrina / gL^{-1}
N	-	20	0
HPB	hidroksipropil- β	20	16
RAMEB	nasumično metilirani- β	20	16

Komina masline zaostala nakon proizvodnje maslinovog ulja pohranjena je smrzavanjem na -20°C tijekom nekoliko sati kako bi se sačuvale sve važne sastavnice. Nakon odmrzavanja uslijedilo je jednodnevno sušenje na 60°C na velikim Petrijevim zdjelicama kako bi se uklonila voda. Osušena komina je zatim usitnjena u tarioniku i mlincu te prosijana kroz sito poroznosti 0,8 mm. Time su uklonjene koštice i homogeniziran je uzorak. Usitnjena komina potom je odmašćena Soxhlet uređajem uz petroleter s ciljem uklanjanja uljne komponente uzorka. Ekstrakcija je provedena već optimiziranim postupkom klasične ekstrakcije pomoću 60% etanola u vodenoj kupelji tijekom 2 sata na 70°C i 110 rpm-a. Nakon filtriranja kroz gusti papir i alikvotiranja u tikvice ekstrakti su upareni pomoću rotavapora na 50°C i 60 mbar-a te je tako uklonjen etanol zbog kojeg ne bi bilo moguće smrznuti tekući uzorak. Na kraju su liofilizacijom osušeni uzorci na niskim temperaturama kroz 48 sati.

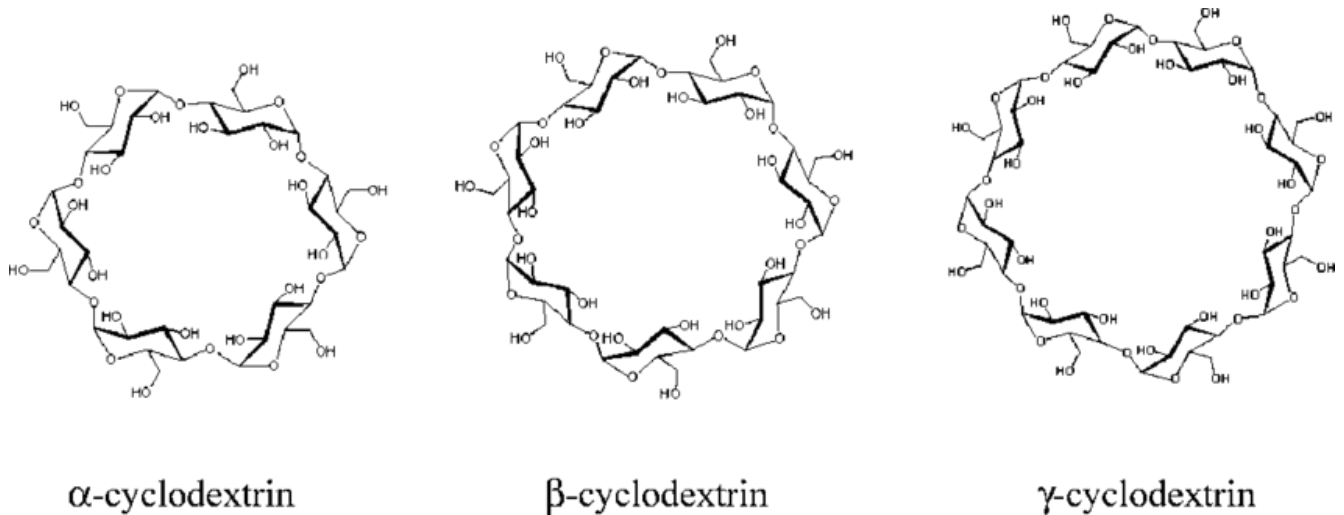


Slika 8. Shematski prikaz pripreme uzoraka

3.1.1.1 Ciklodekstrini

Ciklodekstrini su ciklički oligosaharidi koji sadrže šest (α -ciklodekstrin), sedam (β -ciklodekstrin), osam (γ -ciklodekstrin) ili više glukopiranoznih jedinica povezanih α -(1,4) vezom. U prostoru zauzimaju oblik krnjeg stošca pri čemu su hidroksilne skupine okrenute prema van, a ugljici glukopiranoznih jedinica grade unutrašnjost. Rezultat takve građe je hidrofilna vanjska površina koja osigurava relativno dobru topljivost u vodi i hidrofobna centralna šupljina koja omogućuje ciklodekstrinima formiranje inkluzijskih kompleksa s mnogobrojnim hidrofobnim molekulama. U farmaceutskoj industriji se upravo zbog te sposobnosti koriste kao kompleksirajući agensi za povećanje topljivosti u vodi slabo topljivih lijekova skrivanjem njihovih hidrofobnih funkcionalnih skupina u svojoj unutrašnjosti, a izlaganjem hidrofilnih skupina prema okolini. Kompleksiranjem se također može povećavati bioraspoloživost i stabilnost lijekova, reducirati učinak iritacije na želudac, kožu ili oko,

maskirati loš okus i miris lijeka ili prevenirati nastanak inkompatibilnosti među lijekovima. Danas se najčešće od prirodnih ciklodekstrina upotrebljava β -CD zbog najprikladnije veličine centralne šupljine te jednostavnog načina dobivanja. Sintetizirani su i derivati prirodnih ciklodekstrina koji mogu iskazati veću topljivost u vodi, pružiti veću stabilnost gostujućoj molekuli i bolje kontrolirati njezinu kemijsku aktivnost (Del Valle, 2004).



Slika 9. Strukture α , β i γ ciklodekstrina (preuzeto sa: <https://www.researchgate.net>)

3.1.2 Kemikalije

- α -glukozidaza izolirana iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, G5003-100 U, Sigma Aldrich Chemie GmbH
- di-Natrij hidrogenfosfat bezvodni, Kemika 1409806
- Natrij dihidrogenfosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) Kemika, 1406707

- p-nitrofenil- α -D-glukopiranozid, Acros Organics 337150010
- Akarboza, Sigma Aldrich PHR1253
- ekstrakti komine masline
- destilirana voda

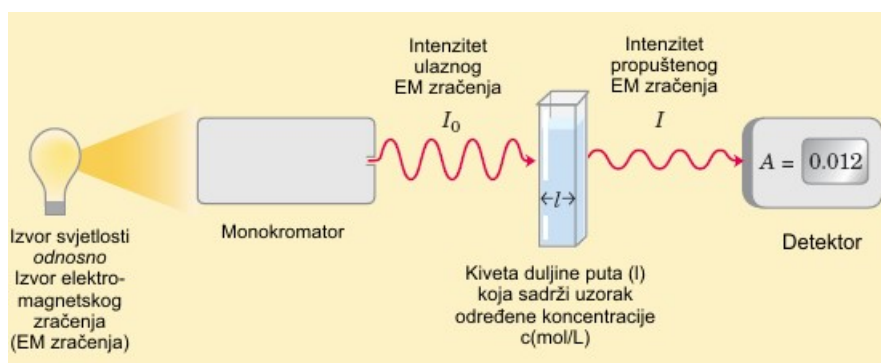
3.1.3 Instrumenti i oprema

- analitička vaga, AB265-S, Mettler Toledo, Indija
- pH-metar s kombiniranom staklenom elektrodom, Metrohm, Herisau, Švicarska
- UV-VIS spektrofotometar VICTOR X3, Perkin Elmer, Massachusetts, SAD
- Vortex mješalica, tip VTX-3000L, Mixer UZUSIO, Tokyo, Japan
- mikrotitarska pločica s 96 jažica
- Eppendorf epruvete
- automatska pipeta (višekanalna i jednokanalna)

3.2 METODE

3.2.1 Spektrofotometrijsko ispitivanje inhibicije α -glukozidaze

UV/Vis spektrofotometrija primarno je kvantitativna analitička tehnika koja se temelji na interakciji ultraljubičastog (180-390 nm) ili vidljivog zračenja (390-780 nm) s kemijskim spojevima u tekućim i plinovitim uzorcima. Analiza spektra elektromagnetskog zračenja provodi se spektrofotometrom koji se sastoji od izvora zračenja, monokromatora i detektora (Slika 10).



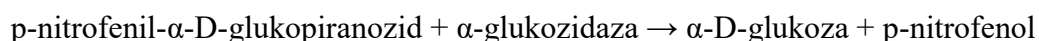
Slika 10. Princip rada spektrofotometra
(preuzeto sa: <https://bib.irb.hr>)

Prolaskom kroz uzorak koji se nalazi u kiveti koja propušta UV/Vis zračenje, dio zračenja se apsorbira te se intenzitet ulaznog elektromagnetskog zračenja I_0 smanjuje. Detektor mjeri intenzitet neapsorbiranog, odnosno propuštenog zračenja. Logaritam odnosa intenziteta upadnog zračenja I_0 i intenziteta propuštenog zračenja I predstavlja apsorbanciju. UV-Vis spektroskopija može se koristiti za mjerenje apsorbancije na pojedinoj valnoj duljini zračenja ili skeniranje cijelog spektra. Iz takvog snimljenog spektra koji pokazuje apsorbanciju u ovisnosti o valnoj duljini može se očitati na kojoj valnoj duljini ispitivana molekula najbolje apsorbira, a osim toga moguće je analitički odrediti koncentraciju ispitivane molekule koja je proporcionalna izmjerenoj apsorbanciji prema Beer-Lambertovom zakonu:

$$A = \log (I_0 / I) = \epsilon cl$$

gdje je A apsorbancija na danoj valnoj duljini svjetlosti, ϵ je molarni apsorpcijski koeficijent ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), l je duljina puta zračenja kroz uzorak (cm), a c je molarna koncentracija tvari u otopini (mol L^{-1}) (Worsfold i Zagatto, 2017).

UV-Vis spektroskopija može se koristiti za određivanje kinetike i brzine kemijske reakcije. Reakcija koja se događa u otopini mora pokazati boju koja se stvara nastankom produkta kako bi se UV-Vis metoda mogla primijeniti. Brzina reakcije se može odrediti mjerenjem UV-Vis spektra u specifičnim vremenskim intervalima. U našem istraživanju kod specificiranih uvjeta ($\text{pH}=7$, $T=37^\circ\text{C}$) enzim α -glukozidaza katalizira konverziju supstrata p-nitrofenil- α -D-glukopiranozid do α -D-glukoze i p-nitrofenola koji pokazuje žutu boju koja se mjeri spektrofotometrijski na 405 nm. 1 U enzima oslobađa 1 μM α -D-glukoze iz p-nitrofenil- α -D-glukopiranozida po minuti.



3.2.1.1 Priprema reagenasa

1. Otopina fosfatnog pufera

Pripremi se 100 mM otopina fosfatnog pufera $\text{pH}=7.0$ otapanjem natrij hidrogen fosfata (Na_2HPO_4) potrebne masene koncentracije 8.2 mg/mL i natrij dihidrogen fosfata (NaH_2PO_4) potrebne masene koncentracije 5.1 mg/mL u destiliranoj vodi. pH otopine podesi se na 7.0 dodatkom 1 M NaOH /1 M HCl .

2. Stock otopina akarboze

Pripremi se otopina masene koncentracije 10 mg/mL otapanjem akarboze u fosfatnom puferu.

3. Otopina enzima

Pripravi se otopina koja sadrži 0.2 U/ml α -glukozidaze u fosfatnom puferu. Masena koncentracija otopine bila je 0.019 mg/ml.

4. Otopina supstrata

Pripravi se 1 mM otopina supstrata p-nitrofenil- α -D-glukopiranozida ($M_r=301.25$ g/mol) otapanjem u fosfatnom puferu.

5. Stock otopine ekstrakata komine masline

Pripravi se otopina nativnog uzorka bez cikodekstrina masene koncentracije 50 mg/mL te otopine uzoraka ekstrakata koji sadrže ciklodekstrine masene koncentracije 90 mg/mL u fosfatnom puferu.

3.2.1.2 Ispitivanje jačine inhibicije α -glukozidaze

Ispitivanje je provedeno prema metodi Tiwari i sur. (2010) uz optimizaciju reakcijskih uvjeta. Istraženi su nativni, HPB i RAMEB ekstrakti komine masline. Uzorci akarboze, dokazani inhibitor α -glukozidaze, korišteni su kao pozitivna kontrola.

Stock otopine ekstrakata komine masline razrijede se $8\times$ fosfatnim puferom te se 40 μ L pipetira u odgovarajuće jažice mikrotitarske pločice. Zatim se iz tih jažica odpipetira 20 μ L u jažice s 20 μ L pufera pa se takvim serijskim razrijeđivanjem dobiju otopine ekstrakata razrijeđene $16\times$, $32\times$ i $64\times$. Iz stock otopine akarboze masene koncentracije 10 mg/ml pripremi se otopina koncentracije 2.5 mg/mL u fosfatnom puferu te se 40 μ L pipetira u odgovarajuće jažice mikrotitarske pločice. Serijskim razrijeđivanjem otopine akarboze u fosfatnom puferu dobiju se otopine razrijeđene $8\times$, $16\times$ i $32\times$. U sve jažice otpipetira se 50 μ L otopine enzima α -glukozidaze (0.2 U/mL) te se sve zajedno inkubira 5 min na 37°C. Nakon inkubacije pipetira se 50 μ L 1 mM otopine supstrata, p-nitrofenil- α -D-glukopiranozida te se sve dodatno inkubira 5 min prije početka mjerenja apsorbancija na 405 nm u spektrofotometru. Izrade se i negativne kontrole u kojima se uzorak kao inhibitor zamijeni s

istim volumenom pufera. Slijepe probe uzoraka sadrže umjesto supstrata isti volumen pufera te se izrade s ciljem uklanjanja utjecaja boje ili замуćenosti uzoraka koje mogu postojati i prije dodatka supstrata. Priprave se i slijepe probe (blank) s puferom i enzimom. Pripreme reakcijskih smjesa prikazane su na Tablici 2 i Tablici 3. Uzorci su analizirani u triplikatu za svaku pojedinu koncentraciju. Slijepe probe uzoraka ispitane su u duplikatu za pojedinu koncentraciju uzoraka. Mjerenja apsorbancije su izvršena 40 puta te je bilo moguće pratiti promjene apsorbancije reakcijske smjese u ovisnosti o vremenu.

Tablica 2. Shema pripreme ispitivanih otopina

	slijepa proba uzorka (SP)	slijepa proba enzima (B)	negativna kontrola (CTR-)	uzorak akarboze (A)	nativni uzorak (N)	HPB uzorak (H)	RAMEB uzorak (R)
pufer(μL)	50	70	20	/	/	/	/
uzorak (μL)	20	/	/	20	20	20	20
supstrat(μL)	/	/	50	50	50	50	50
enzim(μL)	50	50	50	50	50	50	50

HPB - uzorak komine pripremljen dodatkom hidroksipropil-β-CD; RAM - uzorak komine pripremljen dodatkom nasumično metiliranoβ-CD

Tablica 3. Shema pipetiranja u mikrotitarske pločice

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	/	N1	N1	N1	SPN1	SPN1	H1	H1	H1	SPH1	SPH1	B
B	/	N2	N2	N2	SPN2	SPN2	H2	H2	H2	SPH2	SPH2	B
C	/	N3	N3	N3	SPN3	SPN3	H3	H3	H3	SPH3	SPH3	B
D	/	N4	N4	N4	SPN4	SPN4	H4	H4	H4	SPH4	SPH4	B
E	/	R1	R1	R1	SPR1	SPR1	A1	A1	A1	CTR-	CTR-	B
F	/	R2	R2	R2	SPR2	SPR2	A2	A2	A2	CTR-	CTR-	B
G	/	R3	R3	R3	SPR3	SPR3	A3	A3	A3	CTR-	CTR-	B
H	/	R4	R4	R4	SPR4	SPR4	A4	A4	A4	CTR-	CTR-	B

N - nativni uzorak komine pripremljen bez dodatka ciklodekstrina koncentracije 6,25 mg/mL (N1), koncentracije 3,125 mg/mL (N2), koncentracije 1,5625 mg/mL (N3), koncentracije 0,78125 mg/mL (N4); H - uzorak komine pripremljen dodatkom hidroksipropil- β -CD koncentracije 11,25 mg/mL (H1), koncentracije 5,625 mg/mL (H2), koncentracije 2,8125mg/mL (H3), koncentracije 1,40625 mg/mL (H4); R - uzorak komine pripremljen dodatkom nasumično metiliranog β -CD koncentracije 11,25 mg/mL (R1), koncentracije 5,625 mg/mL (R2), koncentracije 2,8125mg/mL (R3), koncentracije 1,40625 mg/mL (R4); A - uzorak akarboze koncentracije 2,5 mg/mL (A1), koncentracije 1,25 mg/mL (A2), koncentracije 0,625 mg/mL (A3), koncentracije 0,3125 mg/mL (A4); SP - slijepa proba uzorka, npr. s dodatkom uzorka N1 (SPN1); CTR- - negativna kontrola; B – slijepa proba enzima

3.2.1.3 Ispitivanje tipa inhibicije α -glukozidaze

Uzorci su otopine ekstrakata komine masline i otopina akarboze. Ispitivanje se provodi pripremom otopina supstrata p-nitrofenil- α -D-glukopiranozida različitih koncentracija (1 mM, 0.8 mM, 0.6 mM, 0.4 mM, 0.2 mM).

Stock otopine ekstrakata razrijede se $10\times$ fosfatnim puferom. 20 μ L tako razrijeđenih ekstrakata otpipetira se zatim u prikladne jažice mikrotitarske pločice. Stock otopina akarboze razrijedi se $10\times$ u fosfatnom puferu te se 20 μ L tako razrijeđene otopine otpipetira u prikladne jažice. Zatim se u sve jažice otpipetira 50 μ L otopine enzima α -glukozidaze (0.2 U/ml) te se sve zajedno inkubira 5 min na 37°C. Nakon inkubacije pipetira se 50 μ L otopine supstrata pojedine koncentracije u prikladne jažice te se sve dodatno inkubira 5 min prije početka mjerenja apsorbancije na 405 nm u spektrofotometru. Slijepe probe uzorka izrađene su u duplikatu pri čemu je supstrat zamijenjen s istim volumenom pufera. Slijepe probe enzima (blank) sadrže enzim i pufer. Pozitivne kontrole sadrže enzim, supstrat i pufer pri čemu se uzorak kao inhibitor zamijeni s istim volumenom pufera, a izrade se kako bi se uklonio bilo kakav utjecaj osim inhibitora na inhibiciju enzima. Priprema reakcijskih smjesa prikazana je na Tablici 4 i Tablici 5. Analize uzoraka su provedene u triplicatu za svaku pojedinu koncentraciju supstrata, a analize pozitivnih kontrola u kvadriplikatu za pojedinu koncentraciju supstrata. Mjerenja apsorbancije su izvršena 40 puta te je bilo moguće pratiti promjene apsorbancije reakcijske smjese u ovisnosti o vremenu.

Tablica 4. Shema pripreme ispitivanih otopina

	slijepa proba uzorka (SP)	slijepa proba enzima (blank, B)	pozitivna kontrola (CTR +)	uzorak akarboze (A)	nativni uzorak (N)	HPB uzorak (H)	RAMEB uzorak (R)
pufer(μL)	50	70	20	/	/	/	/
uzorak (μL)	20	/	/	20	20	20	20
supstrat(μL)	/	/	50	50	50	50	50
enzim(μL)	50	50	50	50	50	50	50

HPB - uzorak komine pripremljen dodatkom hidroksipropil-β-CD; RAM - uzorak komine pripremljen dodatkom nasumično metilirano β-CD

Tablica 5. Shema pipetiranja u mikrotitarske pločice

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SPN	N1	H1	N2	H2	N3	H3	N4	H4	N5	H5	B
B	SPN	N1	H1	N2	H2	N3	H3	N4	H4	N5	H5	B
C	SPH	N1	H1	N2	H2	N3	H3	N4	H4	N5	H5	B
D	SPH	R1	A1	R2	A2	R3	A3	R4	A4	R5	A5	B
E	SPR	R1	A1	R2	A2	R3	A3	R4	A4	R5	A5	B
F	SPR	R1	A1	R2	A2	R3	A3	R4	A4	R5	A5	B
G	SPA	CTR+1	CTR+1	CTR+2	CTR+2	CTR+3	CTR+3	CTR+4	CTR+4	CTR+5	CTR+5	B
H	SPA	CTR+1	CTR+1	CTR+2	CTR+2	CTR+3	CTR+3	CTR+4	CTR+4	CTR+5	CTR+5	B

N - nativni uzorak komine pripremljen bez dodatka ciklodekstrina koncentracije 5 mg/mL s dodatkom supstrata koncentracije 1 mM (N1), koncentracije 0,8 mM (N2), koncentracije 0,6 mM (N3), koncentracije 0,4 mM (N4), koncentracije 0,2 mM (N5); H - uzorak komine pripremljen dodatkom hidroksipropil-β-CD koncentracije 9 mg/mL s dodatkom supstrata koncentracije 1 mM (H1), koncentracije 0,8 mM (H2), koncentracije 0,6 mM (H3), koncentracije 0,4 mM (H4), koncentracije 0,2 mM (H5); R - uzorak komine pripremljen dodatkom nasumično metilirano β-CD koncentracije 9 mg/mL s dodatkom supstrata koncentracije 1 mM (R1), koncentracije 0,8 mM (R2), koncentracije 0,6 mM (R3), koncentracije 0,4 mM (R4), koncentracije 0,2 mM (R5); A - uzorak akarboze

koncentracije 1 mg/mL s dodatkom supstrata koncentracije 1 mM (A1), koncentracije 0,8 mM (A2), koncentracije 0,6 mM (A3), koncentracije 0,4 mM (A4), koncentracije 0,2 mM (A5); SP - slijepa proba uzorka s dodatkom nativnog uzorka koncentracije 5 mg/mL (SPN), s dodatkom RAMEB uzorka koncentracije 9 mg/mL (SPR), s dodatkom HPB uzorka koncentracije 9 mg/mL (SPH), s dodatkom uzorka akarboze koncentracije 1 mg/mL (SPA); CTR+ - pozitivna kontrola s dodatkom supstrata koncentracije 1 mM (CTR+1), koncentracije 0,8 mM (CTR+2), koncentracije 0,6 mM (CTR+3), koncentracije 0,4 mM (CTR+4), koncentracije 0,2 mM (CTR+5); B – slijepa proba enzima

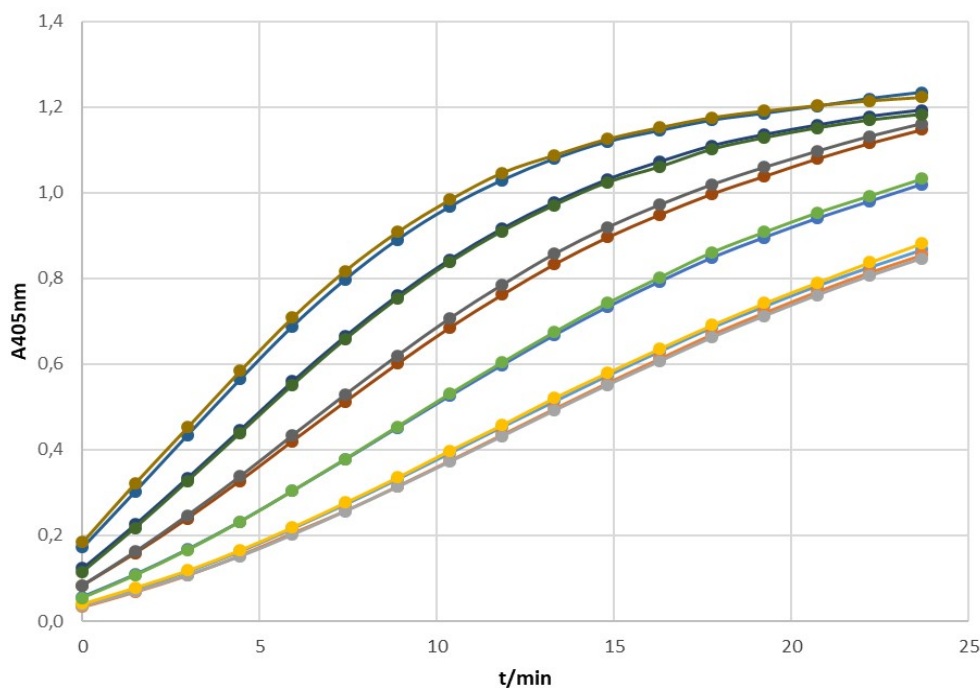
3.2.1.4 Statistička analiza

Za analizu dobivenih podataka i izradu grafičkih prikaza korišten je GraphPad Prism 6 programski paket. U statističkoj obradi podataka korišteni su parametrijski testovi: rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija, a dobiveni rezultati međusobno su uspoređivani korištenjem jednosmjerne analize varijance (one-way ANOVA) s post hoc Tukey testom kojim su rezultati uspoređeni međusobno. Statistički značajnima smatraju se razlike među uzorcima kada je vrijednost $p < 0.05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Jačina inhibicije α -glukozidaze

Izmjerene vrijednosti apsorbancija uzoraka akarboze umanjene su za srednju vrijednost apsorbancija slijepih proba (blank) te je izrađen grafički prikaz ovisnosti apsorbancije (405 nm) o vremenu (Slika 11). Dobivene površine ispod krivulja (AUC) pokazatelj su količine nastalog produkta enzimske reakcije u vremenu i koriste se za izradu kalibracijske krivulje koja prikazuje ovisnost srednjih vrijednosti AUC o masenoj koncentraciji akarboze (mg/mL). Slika 12 pokazuje da pri većim koncentracijama akarboze nastaje manja količina produkta zbog jače inhibicije enzima. Standardna devijacija (SD) i relativna standardna devijacija (RSD) AUC ukazuju na točnost mjerenja (Tablica 6).

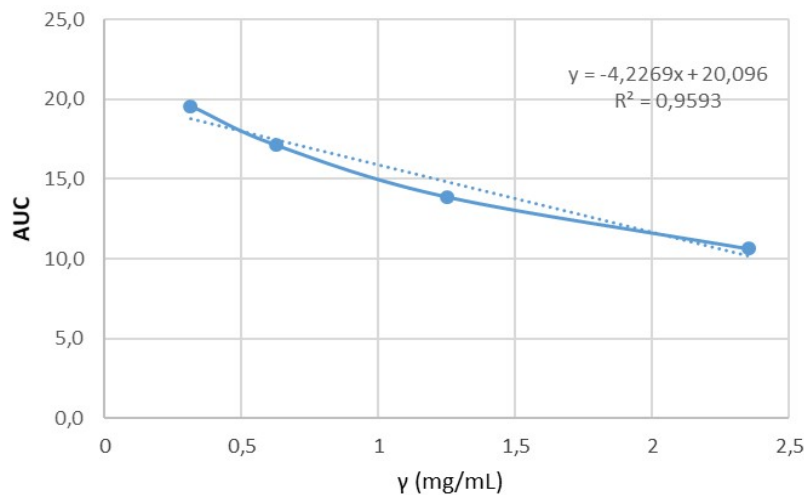


Slika 11. Ovisnost apsorbancija otopina akarboze različitih koncentracija o vremenu

Tablica 6. Podaci za izradu kalibracijske krivulje

γ (akarboza)/ mg/mL	2,35	1,25	0,625	0,3125
AUC	10,6	13,9	17,1	19,6
SD	0,2	0,1	0,3	0,1
RSD	2,1	0,7	1,6	0,7

Legenda: γ – masena koncentracija; AUC – srednje vrijednosti površina ispod krivulja ovisnosti apsorbancija otopina akarboze o vremenu mjerenih na 405 nm; SD – standardna devijacija; RSD – relativna standardna devijacija



Slika 12. Ovisnost srednje vrijednosti površina ispod krivulje o masenoj koncentraciji akarboze

Izmjerene vrijednosti apsorbancija uzoraka ekstrakata umanjene su za srednje vrijednosti apsorbancija pojedinih slijepih proba uzoraka te su izrađeni grafovi apsorbancija na 405 nm u ovisnosti o vremenu. Uzorci koji su razrijeđeni 8x dali su manje AUC vrijednosti u usporedbi s drugim uzorcima, odnosno nastala je manja količina produkta enzimske reakcije što znači da uzorci ekstrakata inhibiraju enzim pri čemu veće koncentracije uzoraka pokazuju jaču inhibiciju. Uvrštavanjem površina ispod krivulja (Tablica 7) u jednadžbu pravca dobivenu linearnom regresijom kalibracijske krivulje, jačine inhibicije enzima pojedinih uzoraka mogu se izraziti kao ekvivalenti akarboze (Tablica 8). Najmanje razrijeđeni uzorci daju najveće vrijednosti ekvivalenata akarboze te se kao najjači inhibitori oni međusobno uspoređuju.

Tablica 7. Površine ispod krivulja različitih koncentracija uzoraka

	AUC								
razrjeđenje	NAT			HPB			RAM		
8	7,371	7,504	8,26	13,94	13,14	13,18	15,21	14,74	15,13
16	11,68	9,977	12,19	19,75	19,09	19,88	20,34	20,2	21,28
32	15,96	16,22	16,61	21,11	21,33	20,97	22,6	20,06	22,33
64	20,4	20,23	20,64	23,35	24	22,72	23,94	24,08	24,1

Legenda: AUC – srednje vrijednosti površina ispod krivulja ovisnosti apsorbancija otopina uzoraka o vremenu mjerenih na 405 nm; NAT - nativni uzorak komine pripremljen bez dodatka ciklodekstrina; HPB - uzorak komine pripremljen dodatkom hidroksipropil- β -CD; RAM - uzorak komine pripremljen dodatkom nasumično metiliranog β -CD

Tablica 8. Inhibitorna aktivnost ekstrakta izražena po mL ekstrakta komine

	razrjeđenje	NAT			HPB			RAM		
AE mg/mL	8	3,0	3,0	2,8	1,5	1,6	1,6	1,2	1,3	1,2
	16	2,0	2,4	1,9	0,1	0,2	0,1	-0,1	0,0	-0,3
	32	1,0	0,9	0,8	-0,2	-0,3	-0,2	-0,6	0,0	-0,5
	64	-0,1	0,0	-0,1	-0,8	-0,9	-0,6	-0,9	-0,9	-0,9

Legenda: AE – ekvivalenti akarboze; NAT - nativni uzorak komine pripremljen bez dodatka ciklodekstrina; HPB - uzorak komine pripremljen dodatkom hidroksipropil- β -CD; RAM - uzorak komine pripremljen dodatkom nasumično metiliranog β -CD

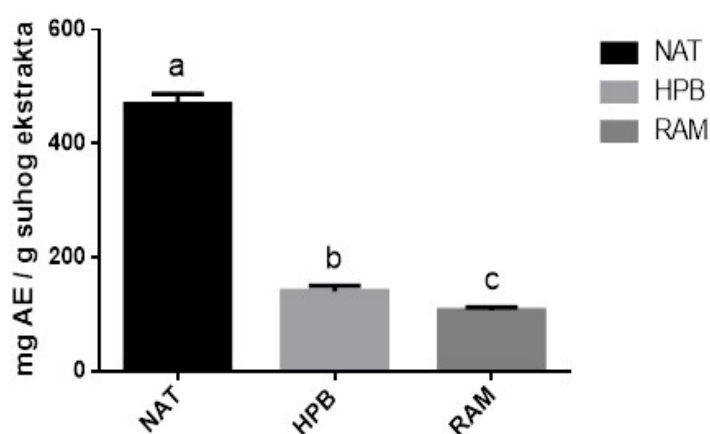
Rezultati su zatim izraženi kao mg ekvivalenata akarboze (AE) po gramu suhog ekstrakta i po gramu suhe komine s obzirom da su uzorci s dodanim ciklodekstrinima sadržavali samo manji dio komine (Tablica 9).

Tablica 9. Inhibitorna aktivnost ekstrakata izražena po jedinici mase ekstrakta/komine u ekstraktu

γ (mg/mL) uzorka	udio komine u uzorku	uzorak	mg AE/g suhog ekstrakta	mg AE/g suhog ekstrakta	mg AE/g suhog ekstrakta	mg AE/g suhe komine	mg AE/g suhe komine	mg AE/g suhe komine
6,25	1	NAT	482	477	448	482	477	448
11,25	0,2607	HPB	129	146	145	497	561	558
11,25	0,2254	RAM	103	113	104	456	500	463

Legenda: AE – ekvivalenti akarboze; NAT - nativni uzorak komine pripremljen bez dodatka ciklodekstrina; HPB - uzorak komine pripremljen dodatkom hidroksipropil- β -CD; RAM - uzorak komine pripremljen dodatkom nasumično metiliranog β -CD

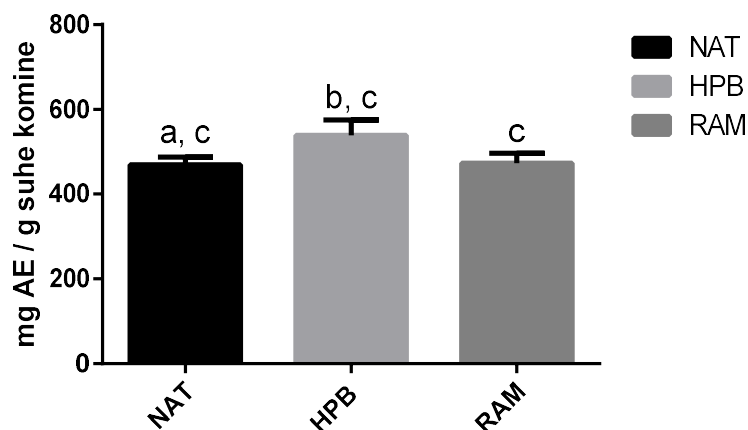
Uspoređene su dobivene vrijednosti AE, odnosno jačine inhibicije enzima ispitivanih uzoraka (Slika 13). Postoji statistički značajna razlika u jačini inhibicije ispitivanih uzoraka po gramu suhog ekstrakta s obzirom na vrijednost $p < 0,0001$.



Slika 13. Usporedba jačina inhibicije ispitivanih uzoraka izražene kao mg ekvivalenata akarboze po g suhog ekstrakta

AE – ekvivalenti akarboze; NAT - nativni uzorak komine pripremljen bez dodatka ciklodekstrina; HPB - uzorak komine pripremljen dodatkom hidroksipropil- β -CD; RAM - uzorak komine pripremljen dodatkom nasumično metiliranog β -CD

Prema ovim rezultatima može se zaključiti kako je među ispitivanim uzorcima očekivano najjači inhibitor α -glukozidaze nativni uzorak bez ciklodekstrina jer sadrži najveći postotak komine masline, odnosno najveći udio polifenola, a predstavlja 469 mg AE po gramu suhog ekstrakta. Inhibitorna aktivnost ekstrakta inkapsuliranog HP β ciklodekstrinom iznosila je 140 mg AE / g suhog ekstrakta, a ekstrakta inkapsuliranog RAME β ciklodekstrinom 106,7 mg AE / g suhog ekstrakta što ga čini najslabijim inhibitorom.



Slika 14. Usporedba jačina inhibicije ispitivanih uzoraka izražene kao mg ekvivalenata akarboze po g suhe komine

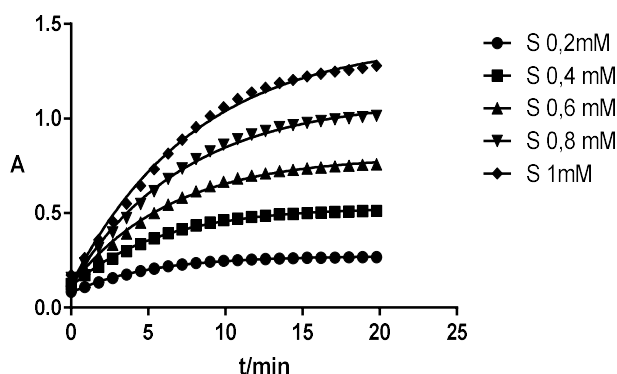
AE – ekvivalenti akarboze; NAT - nativni uzorak komine pripremljen bez dodatka ciklodekstrina; HPB - uzorak komine pripremljen dodatkom hidroksipropil- β -CD; RAM - uzorak komine pripremljen dodatkom nasumično metilirano β -CD

Ukoliko se dobiveni rezultati preračunaju obzirom na udio ciklodekstrina u inkapsuliranim uzorcima vidljivo je da su svi uzorci podjednako dobri inhibitori α -glukozidaze (Slika 14). Uzorak inkapsuliran HP β ciklodekstrinom pokazuje najjači inhibitorni učinak (538,7 mg AE/ g suhe komine u uzorku), dok uzorak inkapsuliran RAME β ciklodekstrinom pokazuje neznatno jaču inhibiciju (473 mg AE / g suhe komine u uzorku) u odnosu na nativni uzorak (469 mg AE / g suhe komine u uzorku).

Brojna su istraživanja potvrdila stvaranje inkluzijskih kompleksa ciklodekstrina s polifenolima. Mourtzinos i sur. (2007) su primjerice pokazali kako oleuropein iz ekstrakta lista masline tvori s β ciklodekstrinom inkluzijske komplekse u omjeru 1:1. Garcia-Padial i sur. (2013) su dokazali da nasumično metilirani β ciklodekstrini i hidroksipropil β ciklodekstrini stvaraju inkluzijske komplekse s tirosolom. Inkluzija polifenolnih spojeva komine s ciklodekstrinima može povećati stabilnost te topljivost, a samim time i koncentraciju polifenola u vodenim medijima što može biti razlog opažene nešto jače inhibicije enzima u ekstraktima komine masline s dodanim ciklodekstrinima u odnosu na nativni uzorak.

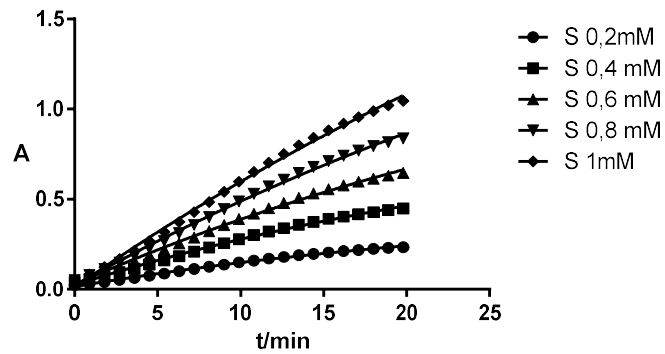
4.2 Tip inhibicije α -glukozidaze

Izmjerene vrijednosti apsorbancija kontrola kojima nisu dodani uzorci, umanjene su za srednju vrijednost apsorbancija slijepih proba kontrole (blank) te se izradi graf apsorbancija na 405 nm u ovisnosti o vremenu za različite koncentracije supstrata (Slika 15). Zaključilo se kako je 20 min dovoljno za reakciju jer poslije dolazi do isparavanja i prevelike standardne devijacije te su zanemareni rezultati nakon 20. minute.

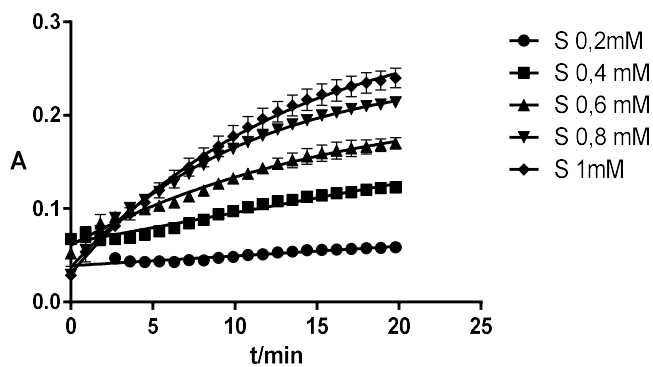


Slika 15. Ovisnost apsorbancija kontrole o vremenu za različite koncentracije supstrata

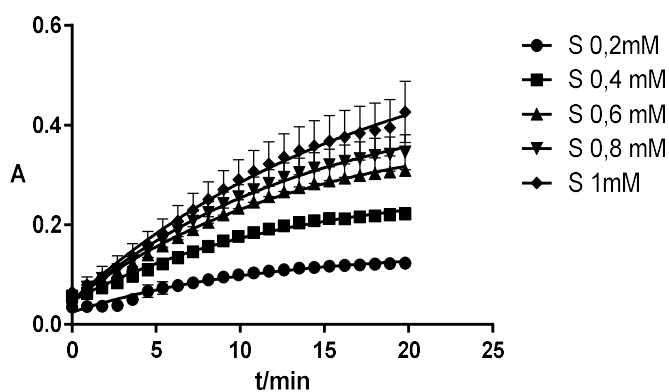
Izmjerene vrijednosti apsorbancija uzoraka, umanjene su za srednje vrijednosti apsorbancija slijepih proba uzoraka te su prikazani grafovi apsorbancija na 405 nm u ovisnosti o vremenu za različite koncentracije supstrata (Slike 16-19). Ponovno je zaključeno kako je 20 min dovoljno za provođenje reakcije jer tijekom duže inkubacije dolazi do isparavanja reakcijske smjese i porasta standardnih devijacija. Stoga su rezultati dobiveni nakon 20. minute zanemareni.



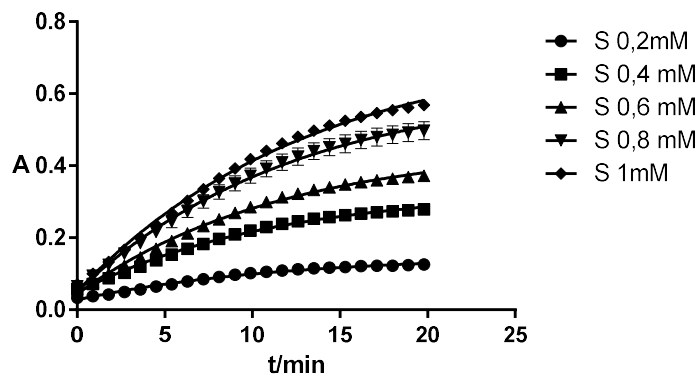
Slika 16. Ovisnost apsorbancija uzorka akarboze o vremenu za različite koncentracije supstrata



Slika 17. Ovisnost apsorbancija nativnog uzorka o vremenu za različite koncentracije supstrata



Slika 18. Ovisnost apsorbancija HPB uzorka o vremenu za različite koncentracije supstrata



Slika 19. Ovisnost apsorbancija RAMEB uzorka o vremenu za različite koncentracije supstrata

Prema Beer-Lambertovom zakonu apsorbancija je proporcionalna koncentraciji produkta čiji nastanak smo pratili spektrofotometrijski. Izmjerene apsorbancije i dobivene površine ispod krivulja očekivano su najveće pri najvećim koncentracijama supstrata kada nastaje najviše produkta. Također, izmjerene apsorbancije i dobivene površine ispod krivulja očekivano su veće kod kontrolnih uzoraka koji nisu sadržavali ekstrakte komine pa je nastalo više produkta u odnosu na uzorke ekstrakata koji inhibiraju enzim i nastaje manje produkta.

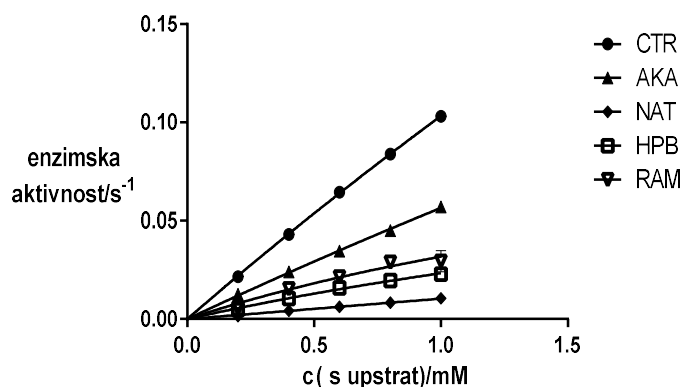
Kako bi se odredila početna brzina reakcija, odnosno enzimska aktivnost promatrano je linearno područje ovisnosti apsorbancije o vremenu. Obzirom da je na početku reakcije koncentracija supstrata znatno veća od koncentracije enzima, a time i ES kompleksa, pretpostavljamo da je koncentracija supstrata približno jednaka početnoj koncentraciji supstrata, a koncentracija produkta zanemarivo mala te iz toga proizlazi da se početna brzina mjeri u području ustaljenog stanja enzimske reakcije kojeg karakterizira nepromjenjivost koncentracije ES kompleksa. U ustaljenom stanju brzina reakcije je konstantna s obzirom da se količina nastalog produkta povećava linearno s vremenom te nastaje jednaka količina produkta u jednakom vremenu. Brzina reakcije može se zato odrediti mjerenjem promjene apsorbancije, odnosno količine nastalog produkta u vremenu kod ustaljenog stanja enzimske reakcije, dakle jednaka je nagibu pravaca (Tablica 10).

Tablica 10. Enzimaska aktivnost kod kontrole i uzoraka pri različitim koncentracijama supstrata

koncentracija supstrata/ mM		0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
enzimska aktivnost/ s ⁻¹	CTR	0,022946	0,045106	0,066756	0,085837	0,104613
	AKA	0,012077	0,023277	0,033704	0,044209	0,056022
	NAT	0,001573	0,004822	0,00678	0,00939	0,01199
	HPB	0,006725	0,012441	0,017559	0,021954	0,025253
	RAM	0,007289	0,016878	0,023613	0,031516	0,035958

Legenda: NAT - nativni uzorak komine pripremljen bez dodatka ciklodekstrina koncentracije 5 mg/mL; HPB - uzorak komine pripremljen dodatkom hidroksipropil- β -CD koncentracije 9 mg/mL; RAM - uzorak komine pripremljen dodatkom nasumično metiliranog β -CD koncentracije 9 mg/mL; AKA - uzorak akarboze koncentracije 1 mg/mL; CTR - pozitivna kontrola

Nelinearnom regresijskom analizom Michaelis-Menten krivulje, koja pokazuje brzine reakcija, odnosno enzimsku aktivnost u ovisnosti o koncentraciji supstrata, možemo odrediti najbolje odgovarajuće vrijednosti kinetičkih parametara V_{max} i K_m (Tablica 11). Promatramo linearno područje ovisnosti enzimске aktivnosti o koncentraciji supstrata. Što je veća koncentracija supstrata, to je veća enzimaska aktivnost. Uz dodatak različitih uzoraka kao inhibitora enzima, enzimaska aktivnost se smanjuje u odnosu na najveću enzimsku aktivnost kod kontrolnih uzoraka kojima nisu dodani inhibitori (Slika 20).



Slika 20. Ovisnost enzimске aktivnosti o koncentraciji supstrata kod različitih uzoraka

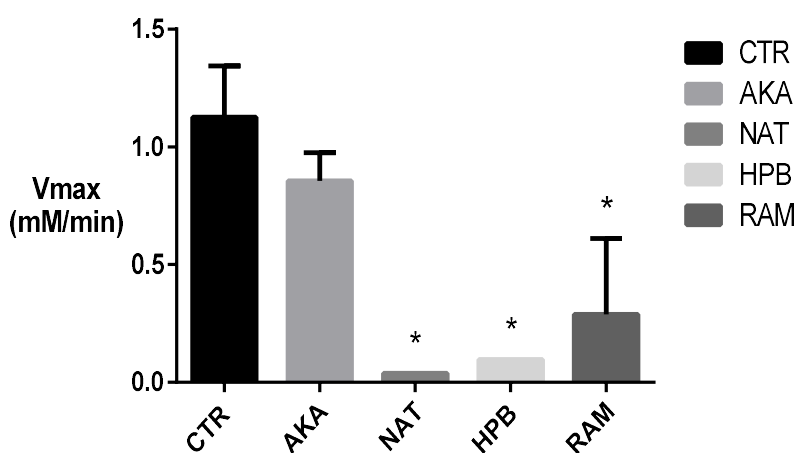
NAT - nativni uzorak komine pripremljen bez dodatka ciklodekstrina koncentracije 5 mg/mL; HPB - uzorak komine pripremljen dodatkom hidroksipropil- β -CD koncentracije 9 mg/mL; RAM - uzorak komine pripremljen dodatkom nasumično metiliranog β -CD koncentracije 9 mg/mL; AKA - uzorak akarboze koncentracije 1 mg/mL; CTR - pozitivna kontrola

Zaključeno je kako se kinetika može opisati Michaelis-Menten funkcijom s obzirom da je korelacijski faktor koji pokazuje koliko dobro nelinearna regresija opisuje zadane podatke $r^2 > 0.99$.

Tablica 11. Maksimalne brzine (V_{max}) i Michaelisove konstante (K_m) uzoraka i kontrole

	CTR	AKA	NAT	HPB	RAM
$V_{max}/$ mM/min	1,12707	0,855233	0,03836	0,09737	0,289635
K_m/mM	8,905	15,25	5,831	2,986	1,209

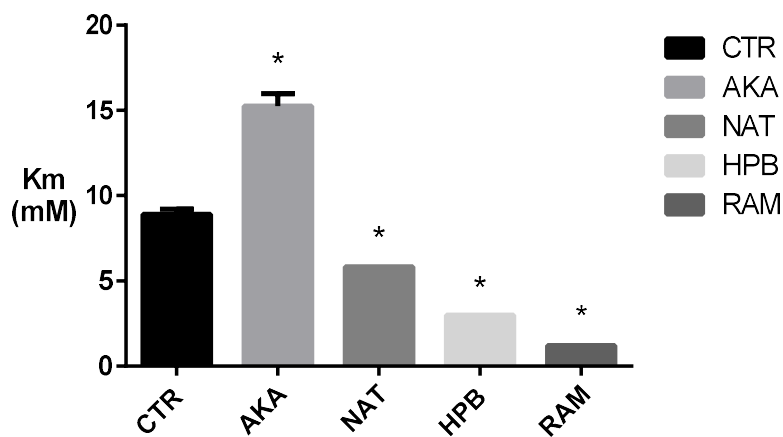
NAT - nativni uzorak komine pripremljen bez dodatka ciklodekstrina koncentracije 5 mg/mL; HPB - uzorak komine pripremljen dodatkom hidroksipropil- β -CD koncentracije 9 mg/mL; RAM - uzorak komine pripremljen dodatkom nasumično metiliranog β -CD koncentracije 9 mg/mL; AKA - uzorak akarboze koncentracije 1 mg/mL; CTR - pozitivna kontrola



Slika 21. Usporedba maksimalnih brzina (V_{max}) uzoraka i kontrole

NAT - nativni uzorak komine pripremljen bez dodatka ciklodekstrina koncentracije 5 mg/mL; HPB - uzorak komine pripremljen dodatkom hidroksipropil- β -CD koncentracije 9 mg/mL; RAM - uzorak komine pripremljen dodatkom nasumično metiliranog β -CD koncentracije 9 mg/mL; AKA - uzorak akarboze koncentracije 1 mg/mL; CTR - pozitivna kontrola

Postoje statistički značajne razlike i u vrijednostima maksimalne brzine između uzoraka koji su sadržavali kominu masline i kontrole s obzirom da je $p < 0,0009$. Uzorci koji su sadržavali kominu masline dosegli su manje V_{max} vrijednosti u odnosu na kontrolu (Slika 21). Nije postojala statistički značajna razlika između V_{max} vrijednosti kontrole i uzoraka koji su sadržavali akarbozu.



Slika 22. Usporedba Michaelisovih konstanti (K_m) uzoraka i kontrole

NAT - nativni uzorak komine pripremljen bez dodatka ciklodekstrina koncentracije 5 mg/mL; HPB - uzorak komine pripremljen dodatkom hidroksipropil- β -CD koncentracije 9 mg/mL; RAM - uzorak komine pripremljen dodatkom nasumično metiliranog β -CD koncentracije 9 mg/mL; AKA - uzorak akarboze koncentracije 1 mg/mL; CTR - pozitivna kontrola

Usporedbom dobivenih vrijednosti uzoraka i kontrole zaključeno je da postoje statistički značajne razlike u K_m vrijednostima između kontrole i svih ispitivanih uzoraka s obzirom na vrijednost $p < 0,0001$. K_m se povisio kod uzoraka akarboze, a smanjio kod uzoraka koji su sadržavali kominu masline u odnosu na kontrolu (Slika 22).

Obzirom da je V_{\max} uz dovoljnu koncentraciju supstrata isti kao kod kontrole, a K_m veći, dakle potrebno je više supstrata za postizanje polovice maksimalne brzine enzimske reakcije, zaključeno je kako je akarboza kompetitivni inhibitor koji se natječe sa supstratom za enzim te je taj rezultat u skladu s literaturom (Osonoi i sur., 2010, Kim i sur., 1999).

Polifenoli iz komine masline se ponašaju kao akompetitivni inhibitori koji se vežu na kompleks enzim-supstrat i onemogućuju nastajanje produkta s obzirom na manji V_{\max} i K_m u prisustvu uzoraka komine u odnosu na kontrolu.

Dosadašnja istraživanja su pokazala različite tipove inhibicija α -glukozidaze polifenolima. Hadrich i sur. (2015) su pokazali jaki inhibitorni učinak hidroksitirosola na α -glukozidazu in vitro, s jačim učinkom od akarboze i mnogo jačim od oleuropeina uz zaključak da je hidroksitirosol nekompetitivni inhibitor, a akarboza akompetitivni inhibitor. Tiwari i sur.(2010) pokazali su potentnu inhibiciju α -glukozidaze oleanoličnom kiselinom in vitro. Polifenoli komine masline nisu dosad istraživani u smislu inhibicije α -glukozidaze.

5. ZAKLJUČCI

- U okviru ovog diplomskog rada provedena su ispitivanja inhibicije enzima α -glukozidaze ekstraktima komine masline s i bez ciklodekstrina te je utvrđena jačina i tip inhibicije enzima svakog uzorka.
- Ispitani uzorci ekstrakata komine pokazali su sposobnost inhibicije α -glukozidaze pri čemu je HPB pokazao najjaču, a nativni uzorak najslabiju inhibiciju ako uzmemo u obzir smanjeni udio suhe komine kod uzoraka s ciklodekstrinima.
- Postojale su statistički značajne razlike u kinetičkim parametrima Michaelis-Menten kinetike, K_m i V_{max} , između kontrole i uzoraka. K_m je veći kod uzorka akarboze, a manji kod uzoraka koji su sadržavali kominu masline u odnosu na kontrolu. V_{max} je manja kod uzoraka koji sadrže kominu masline u odnosu na kontrolne uzorke.
- Akarboza je pokazala kompetitivnu inhibiciju enzima kao što je bio slučaj i u dosadašnjim ispitivanjima, dok su uzorci s kominom iskazali akompetitivnu inhibiciju.
- S obzirom na dobivene rezultate komina maslina u budućnosti može imati svoju ulogu u kontroli postprandijalne hiperglikemije inhibicijom α -glukozidaze, no potrebna su dodatna ispitivanja te identifikacija komponenti odgovornih za pokazani učinak.

6. LITERATURA

Ackermann RT, Mulrow CD, Ramirez G, Gardner CD, Morbidoni L, Lawrence VA. Garlic shows promise for improving some cardiovascular risk factors. *Arch Intern Med* 2001; 161: 813–824

Akarboza, <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a8980?lang=en®ion=HR>, pristupljeno 05.09.2018.

Al-Azzawie HF, Alhamdani MS. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci.* 2006;78:1371–1377.

Albuquerque JA, González J, García D, Cegarra J. Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresour Technol.* 2004;91(2):195-200.

Asgary S, Parkhideh S, Solhpour A, Madani H, Mahzouni P, Rahimi P. Effect of ethanolic extract of *Juglans regia* L. on blood sugar in diabetes induced rats. *J Med Food* 2008; 11: 533–538

Barbaro, Toietta, Maggio, Arciello, Tarocchi, Galli, Balsano. Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health. *Int J Mol Sci.* 2014 ;15(10):18508-24

Bedekar A, Shah K, Koffas M. Natural products for type II diabetes treatment. *Adv Appl Microbiol* 2010; 71: 21–73

Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Ortuño A, Del Río J A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europea* L. leaves. *Food Chem.* 2000; 68(4): 457-62

Bhagavan, N. V., Ha, C.-E.). *Enzymes and Enzyme Regulation. Essentials of Medical Biochemistry*, 2011;47–58.

Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 1998;56:317–333

Brunetti, G., Plaza, C., & Senesi, N. Olive pomace amendment in Mediterranean conditions: effect on soil and humic acid properties and wheat (*Triticum turgidum* L.) yield. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(17), 6730–6737.

Bulotta S, Celano M, Lepore SM, Montalcini T, Pujia A1, Russo D. Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *J Transl Med*. 2014;12:219.

Chanioti, S., Tzia, C., Optimization of ultrasound-assisted extraction of oil from olive pomace using response surface technology: oil recovery, unsaponifiable matter, total phenol content and antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol* 2017. 79, 178–189.

Ciklodekstrini, https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structures-of-a-b-and-g-cyclodextrins_fig1_268983067, pristupljeno 11.09.2018.

De Bock M., Derraik J.G., Brennan C.M., Biggs J.B., Morgan P.E., Hodgkinson S.C., Hofman P.L., Cutfield W.S. Olive (*olea europaea* l.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: A randomized, placebo-controlled, crossover trial. 2013;8:17

Del Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem*, 2004, 39, 1033-1046.

Derosa G1, Maffioli P. α -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice. *Arch Med Sci*. 2012;8(5):899-906

El-Abhar HS, Schaalán MF. Phytotherapy in diabetes: Review on potential mechanistic perspectives. *World J Diabetes* 2014; 5: 176–197

Fernández-Arche, A., Marquez-Martin, A., De la Puerta Vazquez, R., Perona, J. S., Terencio, C., Perez-Camino, C., & Ruiz-Gutierrez, V. Long-chain fatty alcohols from pomace olive oil modulate the release of proinflammatory mediators. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2009, 20(3), 155-162

García-Padial M, Martínez-Ohárriz MC, Isasi JR, Ve'laz I, Zornoza A. Complexation of tyrosol with cyclodextrins. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 2013, 75, 241-245.

Haber SL, Keonavong J. Fenugreek use in patients with diabetes mellitus. *Am J Health Syst Pharm* 2013; 70: 1196–1203

Hadrich F, Bouallagui Z, Junkyu H, Isoda H, Sayadi S. The α -Glucosidase and α -Amylase Enzyme Inhibitory of Hydroxytyrosol and Oleuropein. *J Oleo Sci.* 2015;64(8):835-43.

Hamden K, Allouche N, Damak M, Elfeki A. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats *Chem Biol Interact.* 2009;180(3):421-32.

Hidroksitirozol, <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/3hydroxytyrosol1154161059760111?lang=en®ion=HR>, pristupljeno 05.09.2018.

Inhibicije enzima (kompetitivna, akompetitivna i nekompetitivna), https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/14obkp10mehanizmi_djelovanja_enzima.pdf, pristupljeno 06.09.2018.

Jemai H, El Feki A, Sayadi S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J Agric Food Chem.* 2009; 57(19): 8798- 804.

Kaiser D, Oetjen E. Something old, something new and something very old: drugs for treating type 2 diabetes. *Br J Pharmacol.* 2014;171(12):2940-50

Kalra S. Alpha glucosidase inhibitors. *J Pak Med Assoc.* 2014;64(4):474-6.

Khalatbary AR, Zarrinjoei GR. Anti-Inflammatory Effect of Oleuropein in Experimental Rat Spinal Cord Trauma. *Iran Red Crescent Med J.* 2012; 14(4): 229-34

Kim MJ, Lee SB, Lee HS, Lee SY, Baek JS, Kim D, Moon TW, Robyt JF, Park KH. Comparative study of the inhibition of alpha-glucosidase, alpha-amylase, and cyclomaltodextrin glucanotransferase by acarbose, isoacarbose, and acarviosine-glucose. *Arch Biochem Biophys.* 1999; 371(2):277-83.

Kontogianni VG, Charisiadis P, Margianni E, Lamari FN, Gerothanassis IP, Tzakos AG. Olive Leaf Extracts Are a Natural Source of Advanced Glycation End Product Inhibitors. *J Med Food*. 2013; 16 (9): 817–22.

Matsui, T., Ogunwande, I. A., Abesundara, K. J. M. and Matsumoto, K. Antihyperglycemic Potential of Natural Products *Mini Rev Med Chem*. 2006 ;6(3):349-56.

Mehanna A. Antidiabetic agents: past, present and future. *Future Med Chem*. 2013;5(4):411-30

Michaelis-Menten kinetika enzimске inhibicije, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Enzyme_kinetics_curve.png, pristupljeno 09.09.2018

Michaelis-Menten krivulja, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22430/figure/A1051/?report=objectonly>, pristupljeno 07.09.2018

Mourtzinis I, Salta F, Yannakopoulou K, Chiou A, Karathanos VT. Encapsulation of olive leaf extract in beta-cyclodextrin. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(20), 8088-8094

Nunes, M.A., Pimentel, F.B., Costa, A.S.G., Alves, R.C., Oliveira, M.B.P.P., Olive by products for functional and food applications: challenging opportunities to face environmental constraints. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol*. 2016. 35, 139–148.

Oleuropein, <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/12247?lang=en&ion=H> R , pristupljeno 05.09.2018.

Osonoi T, Saito M, Mochizuki K, Fukaya N, Muramatsu T, Inoue S, Fuchigami M, Goda T. The α -glucosidase inhibitor miglitol decreases glucose fluctuations and inflammatory cytokine gene expression in peripheral leukocytes of Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 2010; 59(12):1816-22.

Poudyal H, Campbell F, Brown L. Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate, high fat-fed rats. *J Nutr*. 2010;140:946–953.

Rahimzadeh M, Jahanshahi S, Moein S, Moein MR. Evaluation of alpha amylase inhibition by *Urtica dioica* and *Juglans regia* extracts. *Iran J Basic Med Sci* 2014; 17: 465–469

Ramirez-Tortosa, M.C.; Granados, S.; Quiles, J.L. Chemical composition, types and characteristics of olive oil. *Olive Oil Health* 2006, 45–61

Salas-Salvado J., Bullo M., Estruch R., Ros E., Covas M.I., Ibarrola-Jurado N., Corella D., Aros F., Gomez-Gracia E., Ruiz-Gutierrez V., et al. Prevention of diabetes with mediterranean diets: A subgroup analysis of a randomized trial. *Ann. Int. Med.* 2014;160:1-10

Seibert E1, Tracy TS. Fundamentals of enzyme kinetics. *Methods Mol Biol.* 2014;1113:9-22.

Spektrofotometar, https://bib.irb.hr/datoteka/432061.PRAKTIKUM_2009.pdf, pristupljeno 06.09.2018.

Susalit E, Agus N, Effendi I, Tjandrawinata RR, Nofiarny D, Perrinjaquet-Moccetti T, et al. Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine.* 2011; 18: 251-8.

Syed Haris Omar ,Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects, *Sci Pharm.* 2010, 78(2): 133–154.

Tirosol,<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/24hydroxyphenylethanol1381650194011?lang=en®ion=HR> , pristupljeno 05.09.2018.

Tiwari P,Mishra BN, Sangwan NS. Phytochemical and pharmacological properties of *Gymnema sylvestre*: an important medicinal plant. *Biomed Res Int* 2014(1): 830285

Tiwari Ashok Kumar, V. Viswanadh, Ponnappalli Mangala Gowri, Amtul Zehra Ali, S.V.S. Radhakrishnan , Sachin Bharat Agawane, K. Madhusudana, Janaswamy Madhusudana Rao, Oleanolic acid - An α -glucosidase inhibitory and antihyperglycemic active compound from the fruits of *Sonneratia caseolaris*. *Open Access Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 2010. 1(1): 19-23

Tuck, K.L.; Hayball, P.J. Major phenolic compounds in olive oil: Metabolism and health effects. *J. Nutr.Biochem.* 2002, 13, 636–644.

Uribe, E., Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., López, L.A., Pereira, K., López, J., Ah-Hen, K., Di Scala, K. Quality characterization of waste olive cake during hot air drying: nutritional aspects and antioxidant activity. *Food Bioprocess Technol.* 2013,6, 1207–1217

Worsfold, P. J., Zagatto, E. A. G. Spectrophotometry: Overview. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. 2017, 318–321.

Wright E, Jr, JL Scism-Bacon. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia , *LC Glass Int J Clin Pract*, 2006; 60(3): 308–314.

Yin Zhenhua, Wei Zhang, Fajin Feng, Yong Zhang, Wenyi Kang. α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. *Food Science and Human Wellness* 2014,3,136-174.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Broj oboljelih od dijabetesa u ozbiljnom je porastu. Ekstrakti biljaka i njihove izolirane komponente sve se više istražuju u smislu hipoglikemijskog potencijala, kao potpora u prevenciji i liječenju dijabetesa tipa 2. Inhibicija α -glukozidaze kao ključnog enzima u hidrolizi oligosaharida korisna je kod pacijenata s dijabetesom obzirom da smanjuje i usporava apsorpciju glukoze nakon jela.

Komina masline nakon proizvodnje maslinovog ulja zaostaje kao otpad, ali ostaje bogata bioaktivnim komponentama kao što su polifenoli koji pokazuju brojne korisne učinke za ljudsko zdravlje. Razvojem učinkovitih postupaka ekstrakcije tih vrijednih spojeva i formulacijom kvalitetnih i organoleptičkih ekstrakata koji se mogu upotrijebiti u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji rješava se problem odlaganja i negativnog utjecaja komine na okoliš, obzirom da su upravo bioaktivni spojevi komine odgovorni za njene biotoksične učinke.

Osnovni cilj ovog istraživanja bio je utvrditi posjeduju li ekstrakti komine masline inhibitornu aktivnost na α -glukozidazu, utvrditi tip inhibicije te utvrditi može li se postupcima inkapsulacije ciklodekstrinima dodatno poboljšati biološka aktivnost dobivenih ekstrakata. Dokazana je inhibicija enzima ekstraktima komine masline i pri tome su svi uzorci iskazali podjednaku jačinu inhibicije te je ustanovljen akompetitivni tip inhibicije α -glukozidaze.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za kemiju prehrane
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Ispitivanje inhibicije α -glukozidaze ekstraktima komine masline

Tea Kljakić

SAŽETAK

Broj oboljelih od dijabetesa u ozbiljnom je porastu. Ekstrakti biljaka i njihove izolirane komponente sve se više istražuju u smislu hipoglikemijskog potencijala, kao potpora u prevenciji i liječenju dijabetesa tipa 2. Inhibicija α -glukozidaze kao ključnog enzima u hidrolizi oligosaharida korisna je kod pacijenata s dijabetesom obzirom da smanjuje i usporava apsorpciju glukoze nakon jela. Komina masline nakon proizvodnje maslinovog ulja zaostaje kao otpad, ali ostaje bogata bioaktivnim komponentama kao što su polifenoli koji pokazuju brojne korisne učinke za ljudsko zdravlje. Razvojem učinkovitih postupaka ekstrakcije tih vrijednih spojeva i formulacijom kvalitetnih i organoleptičkih ekstrakata koji se mogu upotrijebiti u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji rješava se problem odlaganja i negativnog utjecaja komine na okoliš, obzirom da su upravo bioaktivni spojevi komine odgovorni za njene biotoksične učinke. Osnovni cilj ovog istraživanja bio je utvrditi posjeduju li ekstrakti komine masline inhibitornu aktivnost na α -glukozidazu, utvrditi tip inhibicije te utvrditi može li se postupcima inkapsulacije ciklodekstrinima dodatno poboljšati biološka aktivnost dobivenih ekstrakata. Dokazana je inhibicija enzima ekstraktima komine masline i pri tome su svi uzorci iskazali podjednaku jačinu inhibicije te je ustanovljen akompetitivni tip inhibicije α -glukozidaze.

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

Rad sadrži: 45 stranica, 22 grafička prikaza, 11 tablica i 55 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: komina masline, α -glukozidaza, dijabetes, ciklodekstrini

Mentor: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Dr. sc. Lovorka Vujić, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

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

Rad prihvaćen: srpanj, 2019.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Food Chemistry
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diploma thesis

Study of inhibition of α -glucosidase with olive pomace extracts

Tea Kljakić

SUMMARY

The number of people with diabetes is growing steadily. Plant extracts and their isolated components are being more investigated in terms of hypoglycemic potential as a support for prevention and treatment of type 2 diabetes. Inhibition of α -glucosidase as a key enzyme in oligosaccharide hydrolysis is useful in diabetic patients as it reduces and slows glucose absorption after eating. Olive pomace after olive oil production stays behind as waste, but remains rich in bioactive components such as polyphenols that have many beneficial effects on human health. By developing effective methods of extraction of these valuable compounds and by formulation of quality and organoleptic extracts that can be used in the pharmaceutical and food industry, the problem of decomposition and negative impacts of pomace on the environment is being solved, since bioactive pomace compounds are responsible for its biotoxic effects. The main purpose of this study was to determine if olive pomace extracts have inhibitory activity on α -glucosidase, to determine the type of inhibition and to determine whether the cyclodextrin encapsulation procedures could further enhance the biological activity of extracts. Inhibition of enzyme with olives pomace extracts is proved and all the samples showed an equal strength of inhibition and an acompetitive type of α -glucosidase inhibition was established.

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

Thesis includes: 45 pages, 22 figures, 11 tables and 55 references. Original is in Croatian language.

Keywords: olive pomace, α -glucosidase, diabetes, cyclodextrins

Mentor: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lovorka Vujić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Marija Grdić Rajković, Ph.D. Assistant Profesor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July, 2019.

