Hipoglikemijski i hepatoprotektivni učinak vrsta roda Globularia na HepG2 stanicama u hiperglikemijskim uvjetima

Čuljak, Sandra

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:163:243481

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sandra Čuljak

Hipoglikemijski i hepatoprotektivni učinak vrsta roda Globularia na HepG2 stanicama u hiperglikemijskim uvjetima

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

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

ZAHVALA

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

Dodatno se zahvaljujem prijateljima na nesebičnom razumijevanju i podršci.

I na kraju, zahvaljujem se svojoj obitelji na iskazanoj podršci i razumijevanju tijekom cijelog školovanja.

SADRŽAJ

1.UVOD……1

1.1. Šećerna bolest……1

1.1.2. *Tip 1 šećerne bolesti*……2

1.1.2. *Tip 2 šećerne bolesti*…….....3

1.2. Komplikacije šećerne bolesti……..4

1.2.1. *Oksidativni stres.*…….....5

1.2.2. *Oksidativni stres u šećernoj bolesti*……..7

1.3. Funkcionalna sposobnost jetre……..9

1.3.1. *Uloga jetre u metabolizmu proteina*……10

1.3.2. *Indikatorski enzimi kod oštećenja jetre*……...11

1.3.3. *Alanin-aminotransferaza (ALT)*……..11

1.3.4. *Aspartat-aminotransferaza (AST)*……....12

1.4. Hepatoprotektivno djelovanje fitokemikalija……..13

1.4.1. *Fitoterapija u šećernoj bolesti*……..13

1.4.2. *Globularia alypum*……15

1.4.3. *Globularin*……18

2. OBRAZLOŽENJE TEME……..…….19

3. MATERIJALI I METODE…….20

3.1. Kultura stanica HepG2……..20

3.1.1. *Priprema kulture HepG2* ……..20

3.2. Vijabilnost HepG2 stanica……21

3.3. Tretiranje stanica glukozom i globulariom……..23

3.4. Liziranje HepG2 stanica i alikvotiranje uzoraka za analizu…….25

3.5. Određivanje aktivnosti alanin-aminotransferaze (ALT) u lizatu HepG stanica…….25

3.6. Određivanje aktivnosti aspartat-aminotransferaze (AST) u lizatu HepG2 stanica……..26

3.7. Određivanje albumina u lizatu HepG2 stanica- metoda s indikatorom……..27

3.8. Određivanje aktivnosti inhibicije α-glukozidaze……28

3.9. Statistička obrada podataka…….28

4. REZULTATI…….29

4.1. Rezultati……...29

5. RASPRAVA……37

6. ZAKLJUČAK…….40

7. LITERATURA……42

8. SAŽETAK / SUMMARY……46

1. UVOD

Šećerna bolest je najčešća metabolička i jedna od najčešćih endokrinoloških bolesti. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije, procjenjuje se da je 2006. g. bilo 180 milijuna oboljelih od šećerne bolesti , s procjenom da će se taj broj udvostručiti do 2030. g. (Vučić Lovrenčić i Ročić, 2008). WHO i IDF (engl. International Diabetes Federation) su 1991. prvi puta obilježile Svjetski dan šećerne bolesti, koji se od tada svake godine diljem svijeta obilježava 14. studenog (www.who.int).

1.1 Šećerna bolest

Šećerna bolest (lat. diabetes mellitus) obuhvaća heterogenu skupinu kroničnih metaboličkih poremećaja koji nastaju zbog apsolutnog ili relativnog nedostatka hormona inzulina (Vučić Lovrenčić i Ročić, 2008). Prema etiologiji šećerna bolest se može klasificirati kao:

1.Tip 1 šećerne bolesti (autoimunosni ili idiopatski)

2.Tip 2 šećerne bolesti

3.Gestacijski dijabetes

4.Ostali specifični tipovi (specifični genski defekti na razini ß-stanice ili djelovanja inzulina, bolesti pankreasa, autoimune endokrinopatije, lijekovi i kemikalije, itd.)

5.Poremećena regulacija glukoze (predijabetes) koja se može očitovati kao:

- poremećaj tolerancije glukoze (IGT. engl. *impaired glucose tolerance*)
- poremećaj glukoze natašte (IFG, engl. *impaired fasting glucose*)

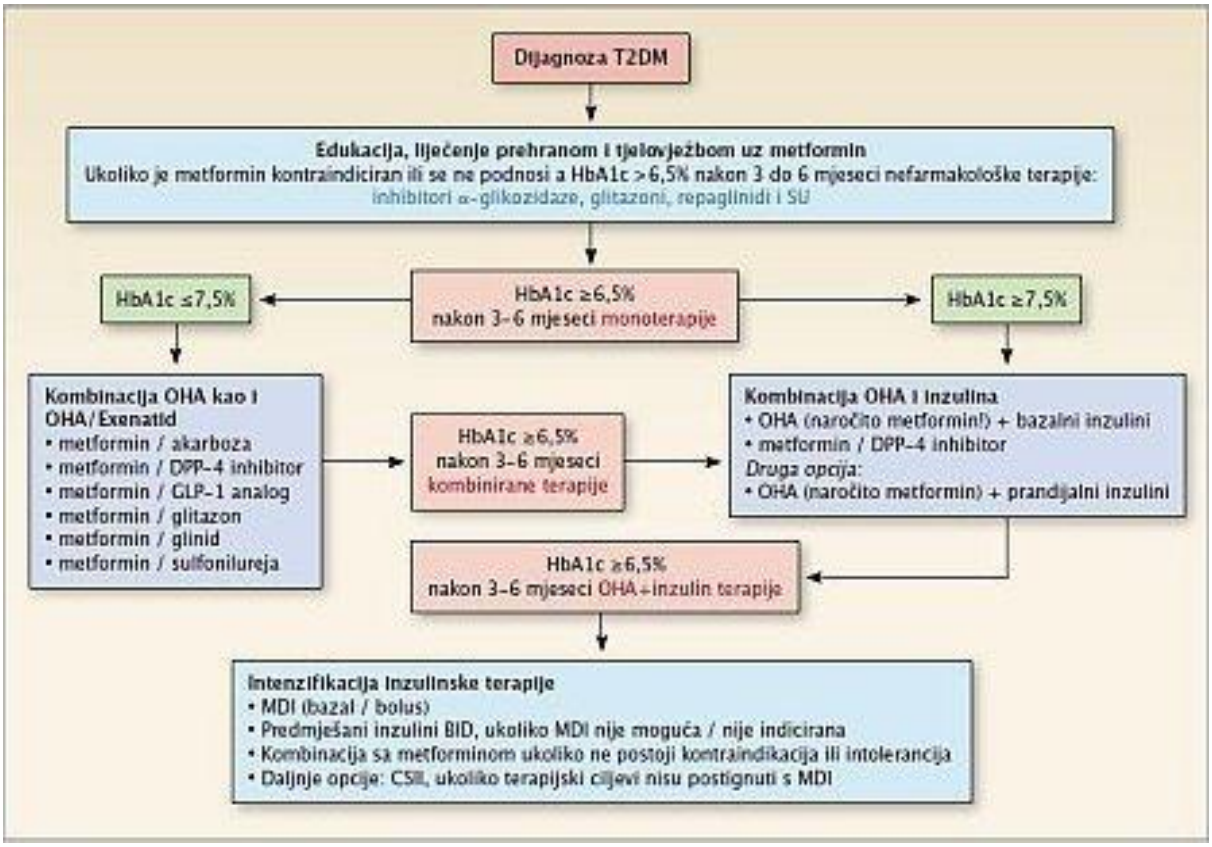
1.1.1. Tip 1 šećerne bolesti

Tip 1 šećerne bolesti zahvaća, ovisno o populaciji, od 5-10% ukupno oboljelih. Nastaje kao posljedica progresivnog, autoimunog razaranja ß-stanica Langerhansovih otočića. 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). Oko 80-90% oboljelih ima autoantitijela koja se mogu pojaviti u cirkulaciji već nekoliko mjeseci pa i godina prije pojave jasnih simptoma bolesti (Štraus i Petlevski, 2009). Ta autoantitijela su: ICA (engl. *islet cell antibodies*), IAA (engl. *autoantibodies to insuline*), GADA (engl. *glutamic acid decarboxylase autoantibodies*), IA-2 i IA-2ß (engl. *tyrosine phosphatase autoantibodies*). Dokazivanje autoantitijela ima kliničko značenje u diferencijalnoj dijagnostici latentnog autoimunosnog 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 nužno zahtijeva njegov terapijski unos kako bi se spriječili nastanak ketoacidoze, kome i smrti. Osobe oboljele od šećerne bolesti u kojih se autoantitijela ne mogu dokazati svrstavaju se u idiopatski tip šećerne bolesti (Božičević, 2004).

1.1.2. Tip 2 šećerne bolesti

Tip 2 šećerne bolesti najčešće se pojavljuje u odraslih i ovoj skupini pripada 90% oboljelih od šećerne bolesti. Nastaje kao rezultat poremećaja u sekreciji inzulina zbog dugogodišnje periferne rezistencije na inzulin. Tijekom vremena periferna se rezistencija povećava do razine na kojoj ß-stanice više ne mogu kompenzirati sve veće potrebe za inzulinom, te se pojavljuje klinički manifestna šećerna bolest. Osim nasljedne komponente, koja je jača nego u tipu 1 šećerne bolesti, za razvoj dijabetesa 2 značajnu ulogu imaju pretilost i nedovoljna tjelesna aktivnost (Vučić Lovrenčić i Ročić, 2008). Šećerna bolest rijetko se pojavljuje sama. U 65% slučajeva pojavljuje se udružena s hipertenzijom, a gotovo 50% bolesnika ima i pridruženi poremećaj lipida. Oralni hipoglikemici obično postaju obavezni dio terapije, a jedna trećina oboljelih osoba mora primati inzulin (Rang i sur., 2006).

Radna skupina Hrvatskoga društva za dijabetes i bolesti metabolizma 2009. godine je objavila hrvatske smjernice za liječenje šećerne bolesti tipa 2. Kao predloškom za stvaranje hrvatskih smjernica o farmakoterapiji koristili su se njemačkim smjernicama, dok su smjernice o prehrani i tjelovježbi nastali prema američkim i kanadskim smjernicama (www.hljk.hr.).

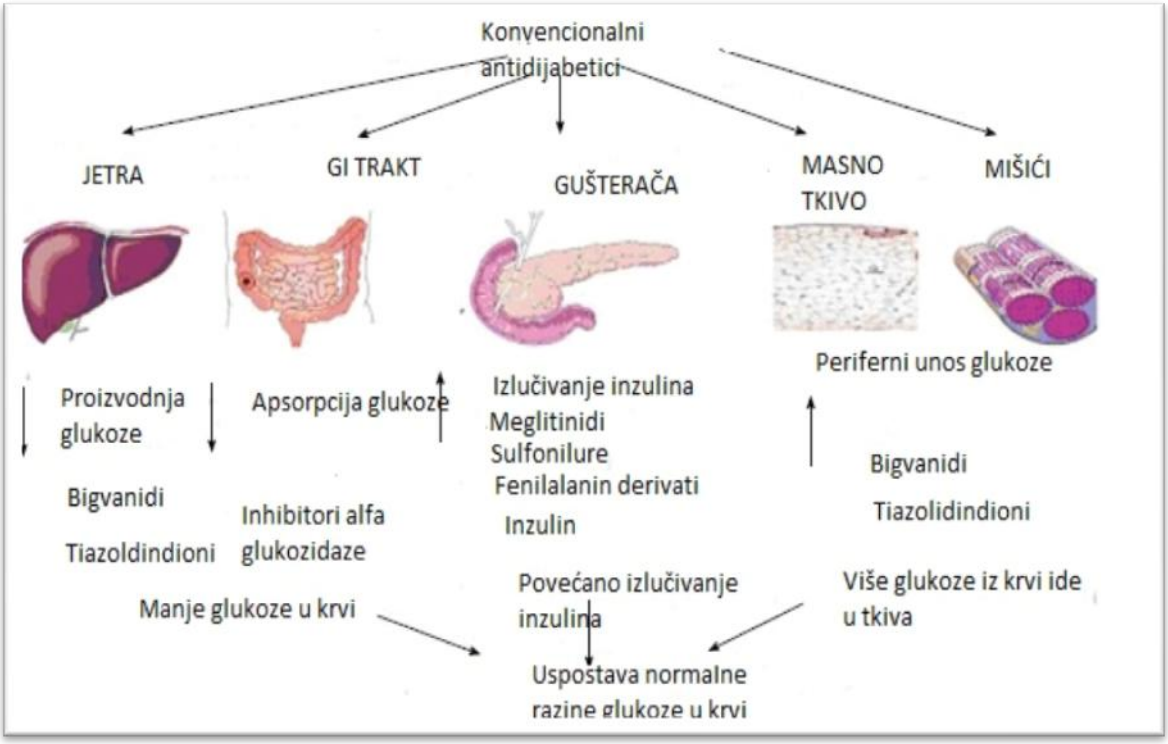


Slika 1. Shematski prikaz hrvatskih smjernica za liječenje šećerne bolesti tipa 2 (www.hljk.hr)

1.2. Komplikacije šećerne bolesti

Komplikacije šećerne bolesti dijele se na akutne i kronične. Akutne komplikacije šećerne bolesti jesu hipoglikemija, dijabetička ketoacidoza, laktatna acidoza i hiperosmolalna koma. Nastaju brzo, dramatičnog su tijeka i zahtijevaju hitnu intervenciju. Kronične ili kasne komplikacije šećerne bolesti nastaju kao posljedica slabe metaboličke kontrole bolesti, tj. dugotrajne hiperglikemije. Kronične komplikacije šećerne bolesti dijele se na mikroangiopatije (retinopatije, nefropatije i neuropatije), i makroangiopatije (moždani udar, ishemijske bolesti srca i periferne vaskularne bolesti) (Štraus i Petlevski, 2009).

Šećerna bolest tip 2 je povezana s mnogim bolestima jetre uključujući povišene jetrene enzime, cirozu, hepatocelularni karcinom, bolesti masne jetre te akutno zatajenje jetre . Farmakološka terapija šećerne bolesti tip 2 kod pacijenata sa bolestima jetre u većini slučajeva je ista kao i kod pacijenata bez bolesti jetre. Inhibitori alfa glukozidaze mogu biti korisni kod pacijenata sa bolestima jetre jer djeluju direktno na gastrointestinalni trakt, sprečavaju razgradnju kompleksnih ugljikohidrata u tankom crijevu, odgađaju njihovu apsorpciju i smanjuju stupanj apsorpcije glukoze te smanjuju postprandijalni porast koncentracije glukoze u krvi (Tolman G. i sur., 2007.).



Slika 2. Patofiziološki mehanizam hiperglikemije usklađen sa prikladnim lijekovima (preuređeno prema: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/).

1.2.1. Oksidativni stres

Oksidativni stres nastaje kao posljedica triju čimbenika: povećano stvaranje oksidansa, smanjenje antioksidativne zaštite i neuspješan popravak oštećenja.

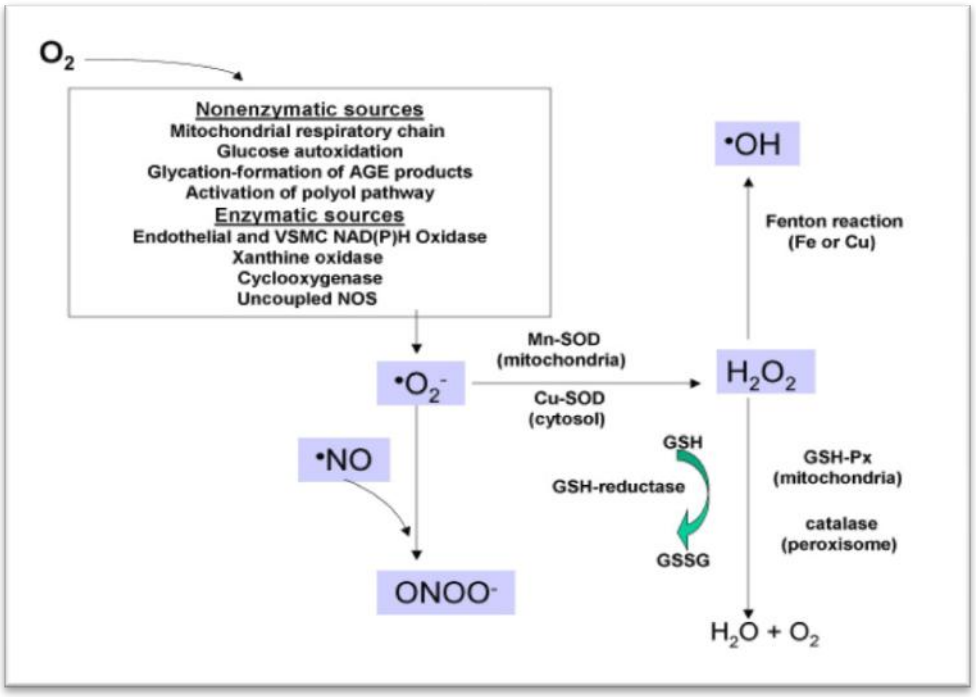
Reaktivni kisikovi spojevi (ROS) i reaktivni dušikovi spojevi (RNS) s jedne strane doprinose normalnoj fiziološkoj funkciji, kao što su stanična diferencijacija, stanična signalizacija, apoptoza i baktericidno djelovanje, a s druge strane, povećane koncentracije oksidansa uzrokuju lipidnu peroksidaciju, oksidaciju proteina te oštećenje DNA. Stanice se brane protiv oksidativnog napada dobro razvijenim enzimskim i neenzimskim sustavom antioksidansa (Rossman i sur., 2013.).

Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija odvija se napadom radikala na dvostruke veze masnih kiselina, pri čemu nastaju peroksidi, koji dalje reagiraju s drugim masnim kiselinama. To je autokatalitička reakcija. Posljedice su: promjena u fluidnosti i permabilnosti membrana, utjecaj na integrirane enzime, stvaranje reaktivnih metabolita: malondialdehida (MDA), 4-hidroksinonenala (HNE), izoprostana i drugih produkata lipidne peroksidacije. (Gašparović i sur., 2013.). Lipidna peroksidacija, glikacija lipoproteina i lipooksidacija doprinose razvoju kardiovaskularnih komplikacija u šećernoj bolesti (Wright i sur., 2006.). Apoprotein B (Apo-B) i fosfolipidne komponente LDL-čestica podliježu glikiranju što LDL čini podložnijim oksidativnim modifikacijama. LDL-receptori ne prepoznaju LDL kada je Apo-B glikiran te se smanjuje njegovo uklanjanje. Tako promijenjene LDL-čestice prepoznaju i vežu „scavanger" receptori na površini makrofaga. To dovodi do nastanka pjenastih stanica i početka nastanka ateroskleroze (Čolak i Majkić-Singh, 2009.).

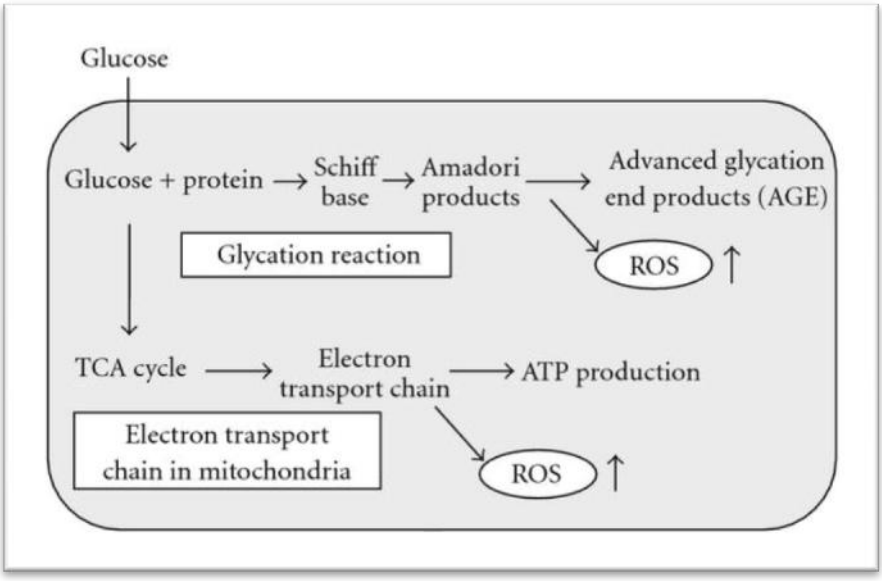
1.2.2. Oksidativni stres u šećernoj bolesti

Oksidativni stres se smatra glavnim uzročnikom koji dovodi do razvitka inzulinske rezistencije, disfunkcije β-stanica Langerhansovih otočića gušterače, poremećaja tolerancije glukoze. Uključen je u progresiju kroničnih komplikacija šećerne bolesti uključujući mikrovaskularne i makrovaskularne komplikacije. Superoksidni radikal smatra se zajedničkim patogenim faktorom koji dovodi do inzulinske rezistencije, disfunkcije β-stanica, oštećene tolerancije glukoze te mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija. Smatra se da povišena koncentracija glukoze u krvi, kakva se opaža postprandijalno, značajno pridonosi oksidativnom stresu čak i više nego kronično povišena razina glukoze u krvi (Wright i sur., 2006.). β-stanice podložne su oksidativnom oštećenju više nego druga tkiva jer mitohondriji β-stanica sadrže izuzetno nisku koncentraciju antioksidativnih enzima (glutation peroksidaza, superoksid dismutaza i katalaza) (Delmastro i Piganelli, 2011.). Dokaz oksidativnog stresa u šećernoj bolesti temelji se na studijama koje mjere markere oksidativnog stresa: F_2-izoprostan, razine nitrotirozina i superoksidnog radikala. Izvori oksidativnog stresa: neenzimatski, enzimatski i mitohondrijski (Johansen i sur., 2005.).



Slika 3. Stvaranje reaktivnih spojeva u šećernoj bolesti (Johansen i sur., 2005.)

Postoji više mehanizama kojima hiperglikemija povećava stvaranje slobodnih radikala te dovodi do oksidativnog stresa. Jedan od njih je nastanak tzv. krajnjih produkata uznapredovale glikacije (engl. *advanced glycation endproduct*, AGE) te interakcija AGE sa njihovim receptorima RAGE (Štraus i Petlevski, 2009.). Glikacija (Maillardova reakcija) je reakcija između bioloških amina (amino-skupina proteina i nukleinskih kiselina) i karbonilne skupine reducirajućih ugljikohidrata (glukoza, fruktoz, manoza, riboza). Ovisna je o koncentraciji glukoze te glukoza ostaje ireverzibilno vezana na protein do njegove razgradnje. Kao produkt Maillardove reakcije nastaju nestabilne Schiffove baze koje prelaze u tzv. Amadori produkte (ireverzibilan proces) koji su mnogo reaktivniji od same glukoze (pregrađuju se u reaktivne AGE). Stvaranje AGE-a mijenja tercijarnu strukturu proteina (reakcija ROS-a sa sulfhidrilnim skupinama u proteinima, fragmentacija peptidnog lanca i agregacija produkata unakrsnih reakcija rezultira promijenjenim električnim nabojem i povećanom osjetljivošću na proteolizu), što izravno mijenja njihovu normalnu funkciju. AGE nastaju polako, tijekom duljeg razdoblja, pogađa razne proteine (kolagen, tubulin, mijelin), dovodi do ukrućivanja krvnožilnih stijenki, stvaranje ugruška i ishemije. (Mataugh i sur., 2011; Štraus i Petlevski, 2009.)



Slika 4. Mehanizam stvaranja slobodnih radikala u šećernoj bolesti (Johansen i sur., 2005.)

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 obavlja 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 (Pašačić 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. Uloga jetre u metabolizmu proteina

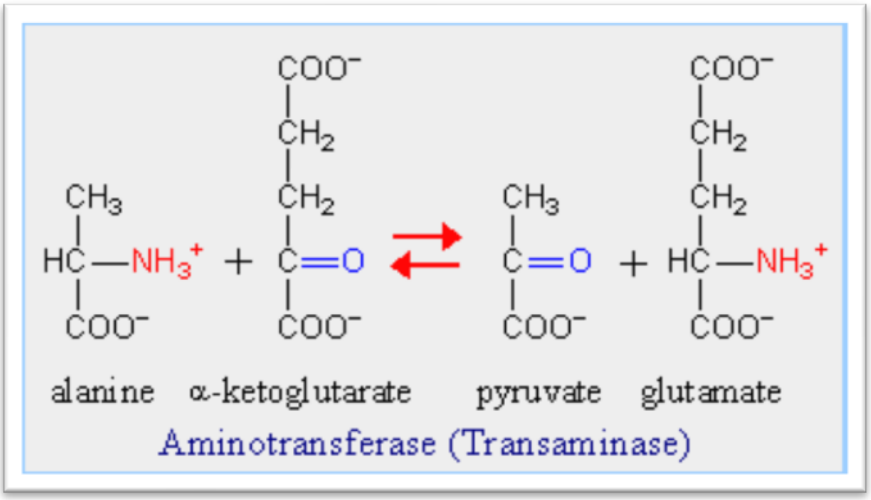
U jetri se sintetizira većina glavnih plazmatskih proteina, osim imunoglobulina i von Willebrandova faktora. Albumin i fibrinogen stvaraju se isključivo u jetri, gdje se stvara i manji dio globulina (α-globulini i β-globulini), dok se veći dio globulina (γ-globulin) stvara u plazma stanicama i stanicama retikuloendotelnog sustava (RES). Albumin je topljiv u vodi i u više ili manje razrijeđenim otopinama soli,a netopljiv u jako koncentriranim otopinama soli. Albumin ima molekularnu masu 66 kDa. Važan je za održavanje onkotičnog tlaka unutar vaskularnog prostora, a ima i transportnu funkciju jer se na njega vežu bilirubin, slobodne masne kiseline, razni elementi u tragu, hormoni kao koritizol, tiroksin, aldosteron, a također i kalcij, razni lijekovi itd. Iako do poremećaja u sintezi proteina dolazi zbog poremećene jetrene funkcije, na koncentraciju proteina u serumu također utječu smanjena dostupnost aminokiselina, katabolička stanja, gubitak proteina, djelovanje citokina i hormona te nasljedni manjak određenih proteina. Promjene u raspodjeli proteina i u koncentraciji ukupnih proteina u jetrenim bolestima ovise o tipu, jakosti i trajanju oštećenja jetre (Štraus i Čvorišćec, 2009.). Najčešće su promjene u smislu smanjenja albumina, dok su promjene globulina obično u smislu povećanja neke od globulinskih frakcija. Povećana koncentracija ukupnih proteina (hiperproteinemija) pojavljuje se pri dehidraciji, monoklonskoj gamapatij te u kroničnim bolestima kao što su jetrena ciroza, sarkom, kronične upale itd. Smanjena koncentracija proteina (hipoproteinemija) pojavljuje se pri prekomjernoj hidraciji, gubitku proteina iz organizma, smanjenoj sintezi proteina ili pojačanom katabolizmu proteina, npr. u hipertireozi ili šećernoj bolesti.

1.3.2. Indikatorski enzimi kod oštećenja jetrenih stanica

Po kemijskoj strukturi enzimi su proteini i djeluju kao biološki katalizatori. Pospješuju brzinu kemijske reakcije, a da se pri tome sami ne troše i ne mijenjaju. Aktivnost enzima se može izraziti kao količina pretvorenog supstrata u molovima, po molu enzima u jedinici vremena. Brzina reakcije ovisi o uvjetima pod kojima se reakcija odvija. Jedna enzimska jedinica (U) je aktivnost određenog enzima koja u jednoj minuti katalizira promjenu 1 mikromola supstrata. Jetra sadrži tri glavne skupine enzima: enzimi koji se sintetiziraju u stanicama jetrenog parenhima i luče u krv u kojoj obavljaju svoju fiziološku funkciju (koagulacijski faktori); indikatorski enzimi koji pri oštećenju stanica izlaze u krv te upozoravaju da postoji oštećenje zbog kojeg je omogućen prelazak sadržaja stanica u krv (ALT, AST, LDH , glutamat-dehidrogenaza i dr.) i enzimi stanica epitela žučnih vodova (GGT i dr.) (Štraus, 2009.).

1.3.3. Alanin-aminotransferaza (ALT) L-alanin-α-ketoglutarat-aminotransferaza

Enzim katalizira reverzibilnu reakciju transaminacije između L-alanina i α-ketoglutarata.



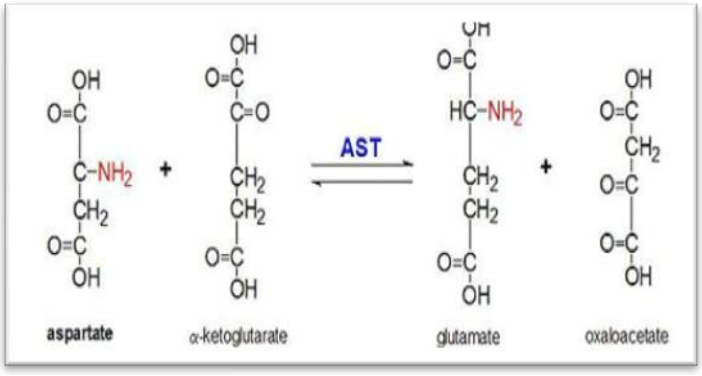
Slika 5. Reakcija koju katalizira alanin-aminotransferaza

ALT ima vrlo važnu ulogu u metabolizmu aminokiselina, proteina i ugljikohidrata. Lokaliziran je u citoplazmistanica, a nalazi se u gotovo svim organima, osim u kostima i zubima. Najviše ga ima u jetri, zatim u skeletnim mišićima, srcu, bubrezima, gušterači, itd.

ALT je tipičan citoplazmatski enzim i mijenja mu se aktivnost već pri promjeni propusnosti stanične membrane (Štraus, 2009.).

1.3.4. Aspartat-aminotransferaza (AST) L-aspartat-α-ketoglutarat-aminotransferaza

Enzim katalizira reverzibilnu reakciju transaminacije između L-asparaginske kiseline i α-ketoglutarata.



Slika 6. Reakcija koju katalizira aspartat-aminotransferaza

Ovom reakcijom spaja se metabolizam ugljikohidrata i dušikovih spojeva pa AST ima veliku ulogu u intermedijarnom metabolizmu. Najviše AST-a ima u jetri, srčanom mišiću, skeletnim mišićima, a u manjoj mjeri u mozgu, bubrezima, gušterači, plućima i ostalim tkivima. U stanicama 40% enzima je lokalizirano u citoplazmi i 60% u mitohondrijima to su ujedno dva izoenzima AST (Štraus, 2009.).

1.4. Hepatoprotektivno djelovanje fitokemikalija

Fitokemikalije s potencijalnom terapijskom ulogom razvile su se u određenim biološkim sustavima kao sastavni dio njihovog metabolizma ili kao sekundarni metaboliti koje proizvodi odgovarajući organizam kao zaštitu unutar vlastitog okruženja. Prirodni spojevi s farmakološkim djelovanjem u ljudi ostvaruju mnogobrojne interakcije s unutarstaničnim i izvanstaničnim molekulama. Biljke sadržavaju mnogobrojne fitokemikalije, uključujući jednostavne polifenole, fenolne kiseline, kumarine, tanine, lignane i lignine. Polifenoli su najpoznatiji mikronutrijenti obilno zastupljeni u prehrani, uz voće i pića, kao što su čaj i crno vino kao njihov glavni izvor. Flavonoidi su najrasprostranjeniji polifenolni spojevi prisutni u biljkama, koji se ovisno o stupnju oksidacije mogu podijeliti u nekoliko klasa: flavanoli, flavanonoli, flavanoni, flavoni, izoflavoni, flavonoli, antocijanini. Mnogi od tih spojeva ponašaju se kao regulatori unutarstaničnih procesa, kao što su stanična signalizacija ili ekspresija odgovarajućih gena. U hepatoprotektivne fitokemikalije ubrajaju se silimarin (lat. *Silybum marianum*), kurkumin (lat. *Curcuma longa*), berberin (lat. *Bereberis vulgaris*) i dr. Mehanizama koji pružaju hepatoprotektivni učinak je mnogo, a uključuju antioksidativno djelovanje, poboljšanje detoksikacije i zaštitu od gubitka glutationa, inhibiciju sinteze leukotriena i dr. (Domitović R., 2011).

1.4.1. Fitoterapija u šećernoj bolesti

Derivati biljnog podrijetla imaju širok spektar djelovanja na zdravlje. Više od 200 biljnih vrsta ima antidijabetska svojstva. Te biljke su klasificirane prema njihovom mehanizmu djelovanja (El-Abhar i sur., 2014):

-inhibicija aposorpcije glukoze

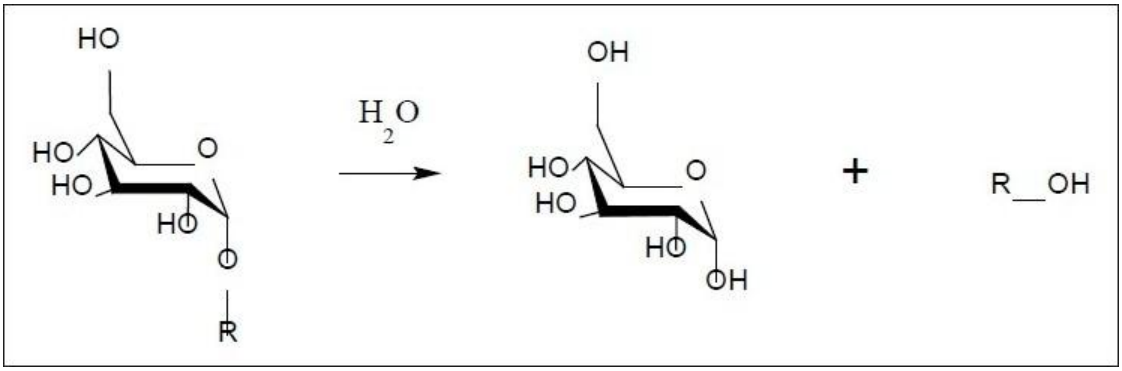
-povećanje lučenja inzulina iz gušterače

-pojačavanje unosa glukoze u adipozno i mišićno tkivo

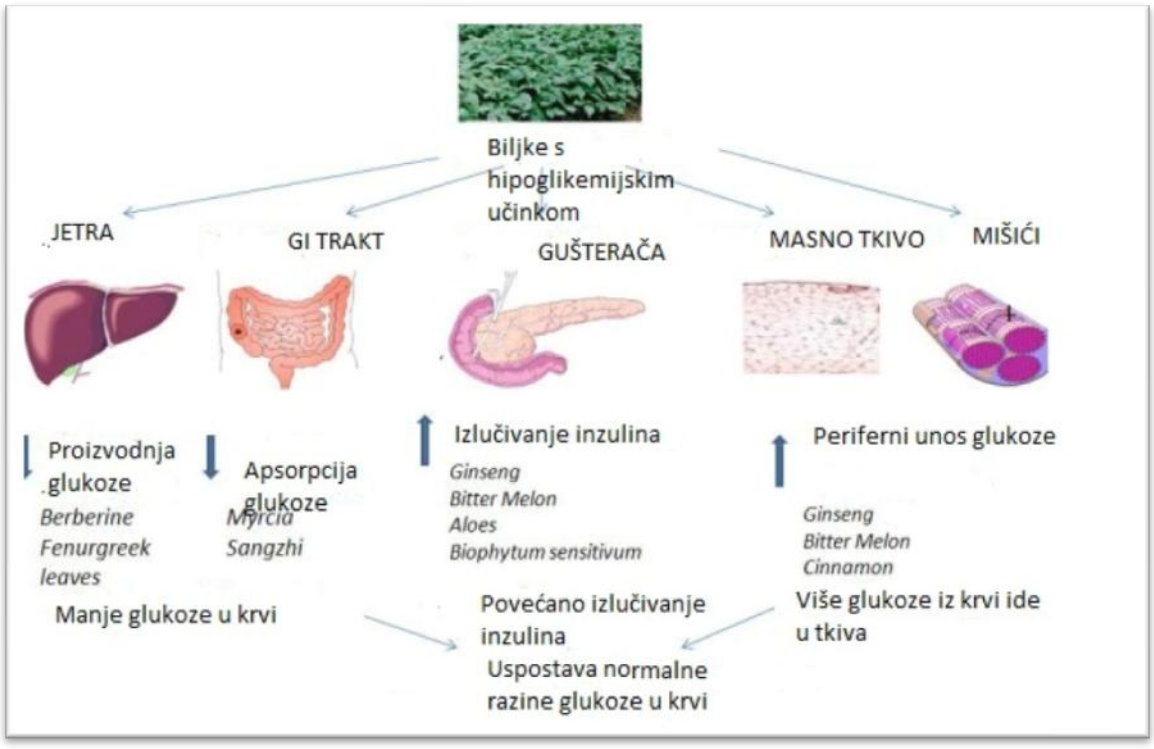
-smanjenje prekomjerne produkcije glukoze u jetri

Za razvoj komplikacija šećerne bolesti smatra se važnom postprandijlna hiperglikemija koja dovodi do oksidativnog stresa i upalnog stanja. Mehanizam uključuje glikozilaciju funkcionalnih (enzimi, albumin, hemoglobin), te strukturalnih proteina (kolagen i fibrilin).

Značajnu ulogu imaju lijekovi koji djeluju na način da inhibiraju alfa glukozidazu, enzim iz skupine glukozidaza smješten u epitelu tankog crijeva, koja katalizira pretvorbu oligosaharida i disaharida u monosaharide, nužne za apsorpciju. Inhibicijom α-glukozidaze brzina hidrolitičkog cijepanja oligosaharida je smanjena te se proces probave ugljikohidrata širi u donji dio tankog crijeva. To širenje procesa probave odgađa ukupnu apsorpciju glukoze u krv (Kumar S. i sur., 2011.). Neke biljne vrste su pokazale hipoglikemijsko djelovanje inhibicijom tog enzima.



Slika 3. Pretvorba oligosaharida u glukozu (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)



Slika 3. Mjesta djelovanja biljaka u liječenju šećerne bolesti (preuređeno prema: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)

1.4.2. Globularia alypum

Globularia alypum (hrv. Grmasta glavulja) je biljka iz porodice Plantaginaceae. To je višegodišnji grm većinom rasprostranjen na mediteranskom području. Koristi se u narodnoj medicini, te ima dokazan hipoglikemijski učinak. (Skim i sur., 1999). Rezultati istraživanja Ziyyat i suradnika iz 1997. su pokazala da je Globularia alypum druga najčešće korištena biljka , nakon piskavice (*Trigonella foenum graceum*) kod osoba sa šećernom bolesti. G. alypum se također koristi u liječenju kožnih bolesti, ekcema. Dekokt pripremljen od lišća, može se piti i sa medom, koristi se kod liječenja probavnih smetnji, visokog krvnog tlaka, šećerne bolesti. *In vitro* je dokazano da metanolni ekstrakt Globularie alypum smanjuje koncentraciju histamina i serotonina. (Bello i sur., 2002). Različiti ekstrakti Globularie alypum su značajan izvor spojeva sa antioksidativnim, antigenotoksičnim te antituberkulotskim svojstvima (Khlifi i sur., 2005; Harzallah i sur., 2010; Khlifi i sur., 2011).



Slika 4. Globularia alypum (www.flponent.atspace.org)

Globularia alypum sadrži veliku količinu antioksidansa kao što su polifenoli i flavonoidi, koji imaju važnu ulogu u adsorpcij i neutralizaciji slobodnih radikala, uključujući hidroksilne i superoksidne anione, smanjenju lipidne peroksidacije. Istraživanje Zennaki i sur. iz 2009. na štakorima, kojima je streptozicinom induciran dijabetes, pokazalo je da metanolni ekstrakt Globularie alypum ima pozitivan učinak protiv oksidativnog stresa tako što poboljšava aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u jetri, bubrezima i mišićima inhibirajući nakupljanje superoksidnog aniona.

Tablica 1. Ukupni kemijski sastav ekstrakta Globularia spp

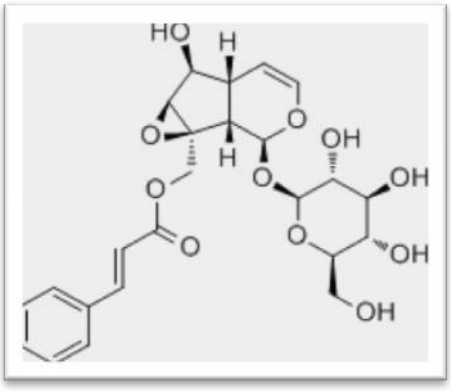
	***G. alypum* L.**	***G. cordifolia* L.**	***G. meridionalis* L.**	***G. punctata* L.**
FENOLI **(mg GAE/g extract)**	130.46 ± 5.99	111.35 ± 3.30	123.44 ± 0.77	98.50 ± 1.23
FLAVONOIDI **(mg QE/g extract)**	30.43 ± 0.29	36.54 ± 1.45	39.72 ± 0.60	48.49 ± 2.37
TANINI **(mg CE/g extract)**	3.00 ± 0.06	10.02 ± 0.28	6.21 ± 0.11	4.07 ± 0.11
IRIDOIDI **(mg AE/g extract)**	27.49 ± 3.08	311.23 ± 6.20	247.37 ± 2.70	343.33 ± 4.88

*GAE – gallic acid equivalent, QE – quercetin equivalent, CE – catechin equivalent, AE – aucubin equivalent

Za hipoglikemijski učinak (inhibicija α-glukozidaze) odgovorni su polifenoli, a najveći udio sadrže *Globularia alypum i Globularia merdionalis.*

Za antiokdidativni učinak odgovorni su iridoidi i flavonoidi, a najveći udio sadrže *Globularia punctata* i *Globularia cordifolia.*

1.4.3. Globularin



Slika 5. Struktura globularina (www.chemblink.com)

Molekulska formula : $C_{24}H_{28}O_{11}$

Molekulska masa: 492.48

Globularin je spoj koji spada u skupinu iridoidnih glikozida. Izoliran je iz lista biljke Globularia alypum. Molekulska formula spoja $C_{24}H_{28}O_{11}$ izvedena je kombinacijom različitih metoda kao što su UV, IR, MS i NMR. Istraživanja na štakorima kojima je inducirana hiperglikemija pokazala su da globularin u dozi od 100 mg/kg ima hipoglikemijski učinak nakon intraperitonealne primjene, te nisu zapaženi toksični učinci u toj dozi (Merghace S. i sur., 2013.).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U šećernoj bolesti dugotrajna hiperglikemija različitim mehanizmima uzrokuje povećano stvaranje slobodnih radikala što dovodi do pojačanog oksidativnog stresa u različitim tkivima i posljedično do nastanka kasnih komplikacija šećerne bolesti. Reaktivne vrste djeluju citotoksično, oštećujući stanične lipide, proteine i DNA. Indikatorski enzimi koji se često koriste u kliničkoj praksi za procjenu stupnja oštećenja jetrenih stanica (hepatocita) su ALT, AST, GGT i LDH. Zbog poremećene jetrene funkcije dolazi i do promjene koncentracije proteina. Najčešće su promjene u smislu smanjenja koncentracije albumina.

Cilj ovog istraživanja je ispitati hipoglikemijski i hepatoprotektivni učinak četri vrste iz roda Globularia, Plantaginaceae (*G. cordifolia, G. punctata, G. merdionalis* i *G. alypum*) u dvije koncentracije (0,5 i 1 mg/mL) na aktivnost indikatorskih enzima oštećenja jetrenih stanica (AST, ALT) u hiperglikemijskim uvjetima, te ispitati njihov učinak na sintezu albumina u hepatocitima tretiranih 20 mM otopinom glukoze, čime ispitujemo njihov mogući hepatoprotektivni učinak, a testom inhibicije enzima alfa- glukozidaze u *in vitro* uvjetima ispitati ćemo njihov hipoglikemijski učinak. Aktivnost enzima (ALT, AST) određena je spektrofotometrijski i izražena u internacionalnim jedinicama (U/L). Koncentracija albumina mjerena je metodom s indikatorom brom krezol zelenilom (BCG) i izražena u g/L.

Određivanje inhibicije alfa glukozidaze rađeno je prema metodi Tiwaria i suradnika korištenjem p- nitro fenil-α-D glukopiranozida kao supstrata, a kao pozitivna kontrola korištena je akarboza u istim koncentracijama.

Rezultati su statistički obrađeni u Microsoft Office Excel 2010 programu.

U znanstvenoj literaturi opisana je jedino Globularia alypum dok za ostale vrste iz tog roda nema dovoljno podataka o njihovom hipoglikemijskom i hepatoprotektivnom učinku.

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 i rastu sve do trenutka postizanja 100%-tne konfluentnosti ili dok ne iscrpe hranjivu podlogu u kojoj rastu. Ova kultura kultivirana je u kompletnom hranjivom MEM mediju (engl. *Minimum Essential Medium*, MEM), uz dodatak fetalnog goveđeg seruma (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS) krajnje koncentracije od 10%, u inkubatoru na 37◦C u struji zraka s 5% CO_2 i relativnom vlažnosti od 95%.

3.1.1. Priprema kulture HepG2

Kultura stanica HepG2 koja je korištena u ovom radu pohranjena je kompletnom 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. U flask (BD Falcon) od 25 cm^2 stavi se 10 mL kompletnog MEM medija i ostavi se u inkubator da se zagrije na 37 °C.Zatim se izvadi flask iz inkubatora te pipetom prenesu stanice u flask i pohrane u inkubator na 37 °C u struji zraka sa 5%-tnim CO_2 i relativnom vlažnosti od 95%. Nakon 48h kada je postignuta konfluentnost veća od 80% odsisan je medij sa stanica , ispran sa 5mL fosfatnog pufera (engl. phosphate buffer saline, PBS), odsisan PBS, ispran s 5 mL EDTA-fiziološke otopine (EDTA-F.O.), odsisan EDTA-F.O. i na kraju dodan 1 mL 0.5%-tnog tripsina kako bi se stanice odvojile od podloge i stavljen flask u inkubator na 5 minuta. Zatim je u flask dodan još 5mL kompletnog MEM medija da se tripsin razrijedi. 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 kompletnog MEM medija. Flask se stavi u inkubator na 37° C u struji zraka s 5%-tnim CO^2 i relativnom vlažnosti od 95% na 48h,

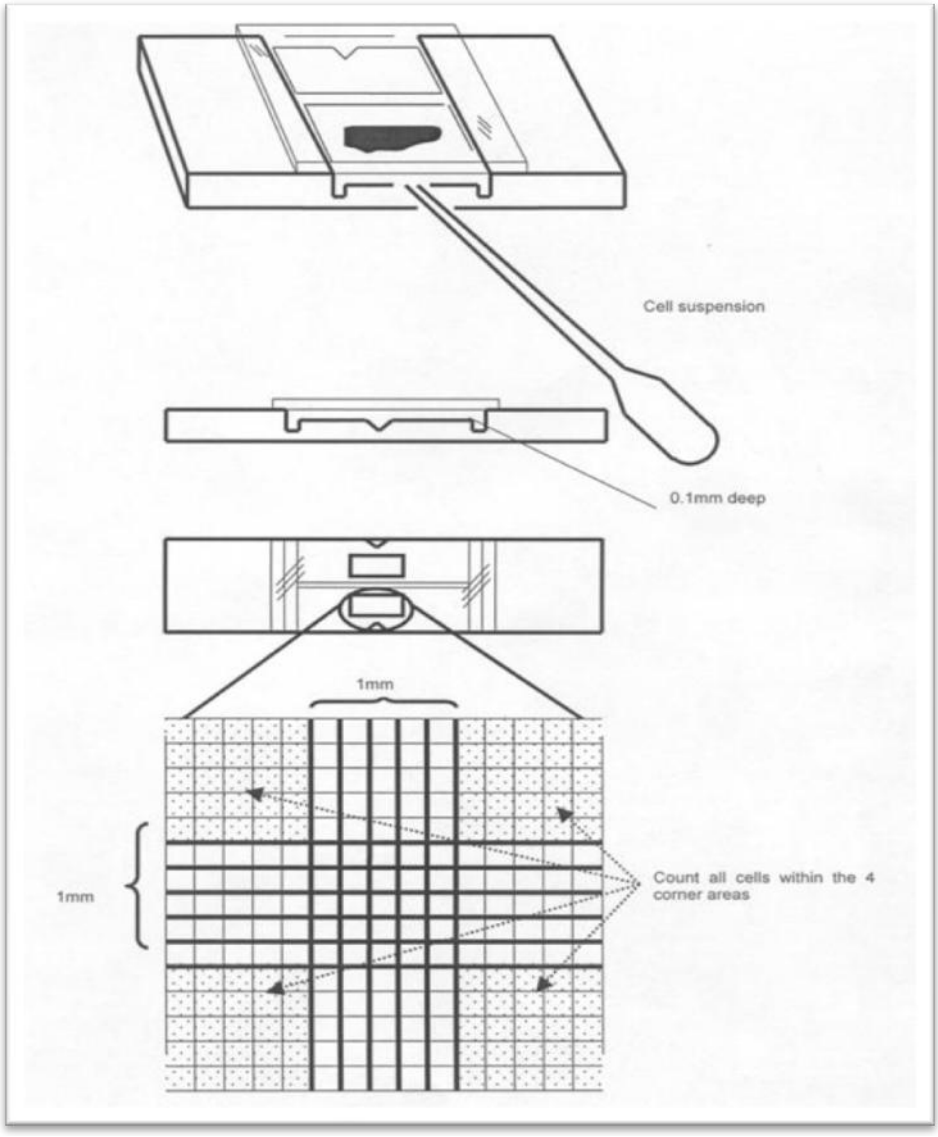
3.2. Vijabilnost HepG2 stanica

Vijabilnost i broj stanica određuje se metodom bojanja stanica bojom tripan plavo (Tripan Blue). Tripan Blue je boja koja ulazi u mrtve stanice, a okolinu oboji u plavo, dok žive stanice ostaju neobojene. Neobojene stanice se zatim broje pod svjetlosnim mikroskopom.

Nakon inkubacije od 48h potrebno je ponovo presaditi HepG2 stanice. 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“ epruveticu se pomiješa 50 µL suspenzije stanica i 50 µL 0,04% otopine boje tripan plavo, te se ostavi na sobnoj temperaturi 10 min. Stanice se broje pomoću Burker –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

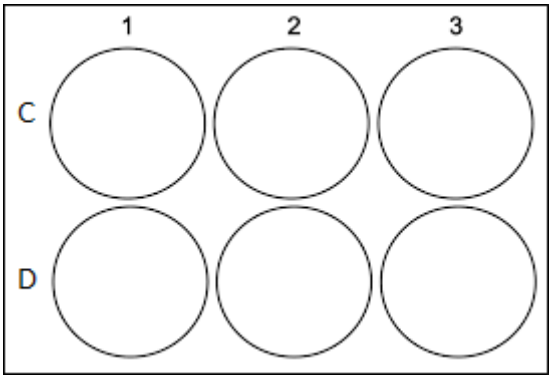


Slika 6. Shematski prikaz Burker-Turkove komorice i princip brojanja stanica

3.3. Tretiranje stanica glukozom i Globulariom

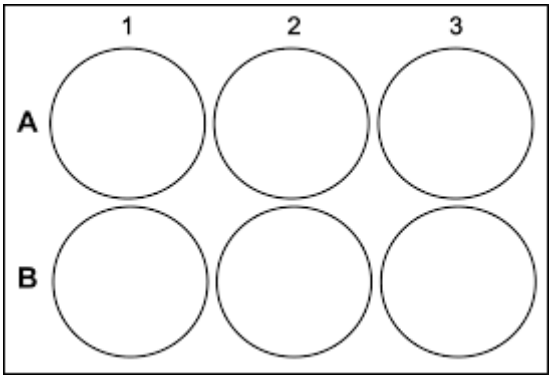
HepG2 stanice nasađene su na pločice sa 6 bunarića (engl. *six –well plates*, BD Falcon). Za tretiranje korišteno je 1 670 000 stanica po bunariću. Potom su stanice inkubirane 24 sata na 37° C u struji zraka s 5% CO_2 i relativnom vlažnosti od 95%. Prije tretiranja stanica odsiše se mediji i ispere s PBS-om zatim se odsiše PBS. Stanice su tretirane prema sljedećoj shemi:

Odvagane su četri vrste Globulariae spp. (G.cordifolia, G.punctata, G.merdionalis, G.alypum) u dvije koncentracije 0,5 i 1 mg/mL. Stanice su tretirane 20mM glukozom (D), zatim sa vrstama Globularia i glukozom.



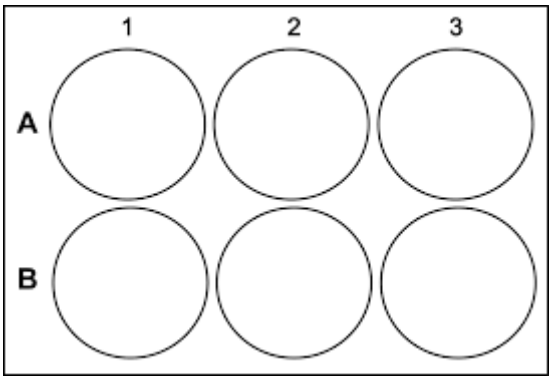
→ C = kontrola = HepG2 stanice tretirane kompletnim MEM- 2 mL

→ D = HepG2 stanice tretirane 20 mM glukozom



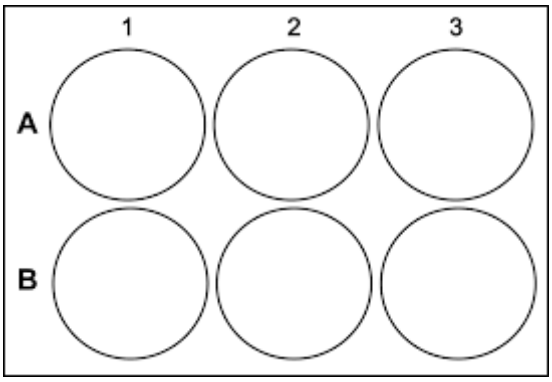
→ HepG2 stanice tretirane 0,5 mg/mL G.cordifolia i 20 mM glukozom

→ HepG2 stanice tretirane 1 mg/mL G.cordifolia i 20 mM glukozom



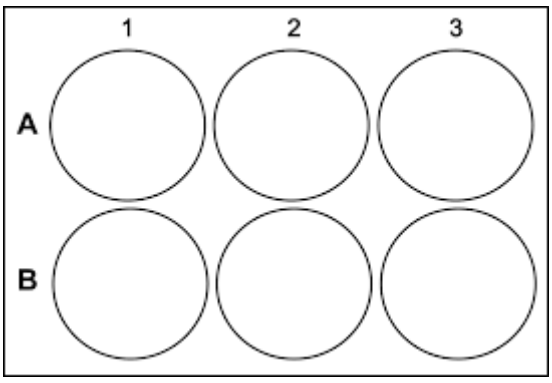
→ HepG2 stanice tretirane 0,5mg/mL G.punctata i 20 mM glukozom

→ HepG2 stanice tretirane 1 mg/ml G. punctata i 20 mM glukozom



→ HepG2 stanice tretirane 0,5 mg/mL G. merdionalis i 20 mM glukozom

→ HepG2 stanice tretirane 1 mg/mL G. merdionalis i 20 mM glukozom



→ HepG2 stanice tretirane 0,5 mg/mL G.alypum i 20 mM glukozom

→ HepG2 stanice tretirane 1 mg/mL G.alypum i 20 mM glukozom

Nakon tretiranja stanica sa po 2 mL pripadajućih otopina, inkubirane su 24 sata na 37°C u struji zraka s 5%-tnim CO_2 i relativnom vlažnosti od 95 %.

3.4. Liziranje HepG2 stanica i alikvotiranje uzorka za analizu

Nakon uklanjanja medija iznad svih stanica, adherirane su stanice isprane 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 treba držati 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 20 min na 14 000 rpm na +4° C. Nakon toga je supernatant alikvotiran. Načinjena su 4 alikvota , za ALT, AST, α.glukozidazu te albumine. Svi uzorci su pospremljeni na -80° C do određivanja.

3.5. Određivanje aktivnosti alanin aminotransferaze (ALT) u lizatu HepG2 stanica

Aktivnost alanin-aminotransferaze (ALT) određuje se spektrofotometrijski reakcijom s 2-Oksoglutaratom prema standardnom postupku (IFCC metoda, 37° C, TRIS pufer).

ALT katalizira transaminaciju između L-alanina i 2-oksoglutarata. Pri tome iz alanina nastaje piruvat, koji s NADH i djelovanjem LDH prelazi u laktat (indikatorska reakcija), a ekvivalentna količina NADH se reducira u NAD. Smanjenje apsorpcije odgovara prelasku reduciranog oblika koenzima u oksidirani oblik i mjera je aktivnosti enzima (Štraus, 2009.)

1. L-Alanin + 2-Oksoglutarat ⟶ Piruvat + L-Glutamat
2. Piruvat + NADH ⟶ L-Laktat +NAD
3. Piruvat (u uzorku) + NADH ⟶ L-Laktat + NAD

Sastav reagensa:

Aktivni sastojci:	Koncentracije:
1. L-Alanin	440 mmol/L
2. NADH	> 0.18 mmol/L
3. LDH	> 1820 U/L
4. 2-Oksoglutarat	16.5 mmol/L
5. Tris pufer	88 mmol/L

3.6. Određivanje aktivnosti aspartat aminotransferaze (AST) u lizatu HepG2 stanica

Aktivnost aspartat-aminotransferaze (AST) određuje se spektrofotometrijski reakcijom s 2.oksoglutaratom prema standardnom postupku (IFCC metoda, 37°C, TRIS pufer)

AST katalizira transaminaciju između aspartata i 2-oksoglutarata. Pri tome iz aspartata nastaje oksaloacetat.

1. L-Aspartat + 2-Oksoglutarat ⟶ Oksalacetat + L-Glutamat
2. Oksalacetat + NADH ⟶ L-Laktat + NAD
3. Piruvat + NADH ⟶ L-Laktat + NAD

Sastav reagensa:

Aktivni sastojci:	Koncentracije:
2-Oksoglutarat	13.2 mmol/L
L-Aspartat	220 mmol/L
MDH	> 600 U/L
LDH	> 1000 U/L
NADH	> 0.18 mmol/L

Tris pufer	88 mmol/L
EDTA	5,5 mmol/L

3.7. **Određivanje albumina u lizatu HepG2 stanica- metoda s indikatorom**

Metoda određivanja albumina temelji se na načelu da albumini vežu indikator bromkrezol zelenilo (BCG) i boja otopine se promijeni uslijed ''proteinske greške'' indikatora, što se mjeri fotometrijski.

Reagensi :

1.Glicin, 1mol/L (75 g/L)- otopi se 75g glicina u 1L destilirane vode

2.Kloridna kiselina, 1 mol/L- 100,65 mL koncentrirane HCl specifične težine 1,19 razrijedi se na 1L

3.Bromkrezol zelenilo, BCG, 20 mmol/L (13,96 g/L)- 1,396 g bromkrezol zelenila, tetrabromo-m-krezolsulfonftalein-natrijeva sol (Mr 720) otopi se uz zagrijavanje u 100 mL apsolutnog etanola.

4.Puferirana otopina BCG- miješa se 94,5 mL otopine glicina (1), 5,5 mL 1 mol/L otopine HCl i 3 mL 20 mmol/L otopine BCG u 800 mL vode, ph se podesi na 3,80 i dopuni destilatom na 1L

5.Standardna otopina albumina, 50g/L

3.8. Određivanje aktivnosti inhibicije α-glukozidaze

Za određivanje aktivnosti inhibicije α-glukozidaze korištena je metoda Tiwaria i suradnika.

POSTUPAK:

Test se izvodi na 96-well mikrotitarskoj pločici.

-100 µL uzorka različitih koncentracija (0,5 M i 1 M) inkubirano je sa 50 µL α-glukozidaze (1.0 U/mL) u fosfatnom puferu (0,1 M, pH 6,8), 10 min na 37°C

-reakcija je inicirana dodatkom 50 µL supstrata: 5 mM, p-nitrofenil-α-glukopiranozid u 0.1 M fosfatnom puferu, pH 6,8

-kinetika otpuštanja p-nitrofenola je mjerena spektrofotometrijski sa čitačem pločica (mi smo koristili Viktor^3 1420Multilable Counter, PerkinElmer), 5 min, u intervalima od 30 s na 405 nm

-kao pozitivna kontrola korištena je akarboza

3.9. Statistička obrada podataka

Iz dobivenih rezultata izračunate su srednje vrijednosti i standardne devijacije za određivane parametre- ALT, AST, albumine i α-glukozidazu. Podaci su statistički obrađeni u programu Microsoft Office Excelu 2010. Tražila se statistički značajna razlika između skupina. Za to je korišten Studentov t-test. Za sva ispitivanja vrijednosti $P< 0,05$ smatra se statistički značajnom, jer tada s 95%-tnom sigurnošću možemo tvrditi da je razlika u rezultatima između dvije skupine signifikantna.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati

U ovom istraživanju korištena je kultura stanica hepatocita humanog karcinoma jetre HepG2, koja je tretirana s 4 vrste roda Globularia u dvije koncentracije 0.5 i 1 mg/mL. Nakon liziranja, u lizatima stanica određena je koncentracija albumina, te aktivnosti enzima, ALT, AST, a aktivnost α-glukozidaze određena je posebnim in vitro testom uz p- nitro fenil-α-D glukopiranozid kao supstrat, a kao pozitivna kontrola korištena je akarboza u istim koncentracijama.

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

Dobivene vrijednosti albumina, aktivnosti enzima, ALT, AST i α-glukozidaze , srednje vrijednosti i standardne devijacije (S.D) te P-vrijednosti prikazane su tabelarno. Za sva ispitivanja vrijednosti $P< 0,05$ smatra se statistički značajnom (AL, AST, albumini) te $P<0,01$ za α-glukozidazu.

Kratice:

1. C=kontrola= HepG2 stanice u mediju (MEM)

2. D=dijabetes=HepG2 stanice tretirane 20mM glukozom

3. i 4.Cor 0,5 i 1 = Globularia cordifolia, 0,5 M i 1 M, HepG2 stanice tretirane 0,5 M G.cor. i 20 mM glukozom te 1 M G.cor. i 20 mM glukozom

5. i 6. Punc 0,5 i 1= Globularia punctata , 0,5 i 1 M, HepG2 stanice tretirane 0,5 M G.pun. i 20 mM glukozom te 1 M G.punc. i 20 mM glukozom

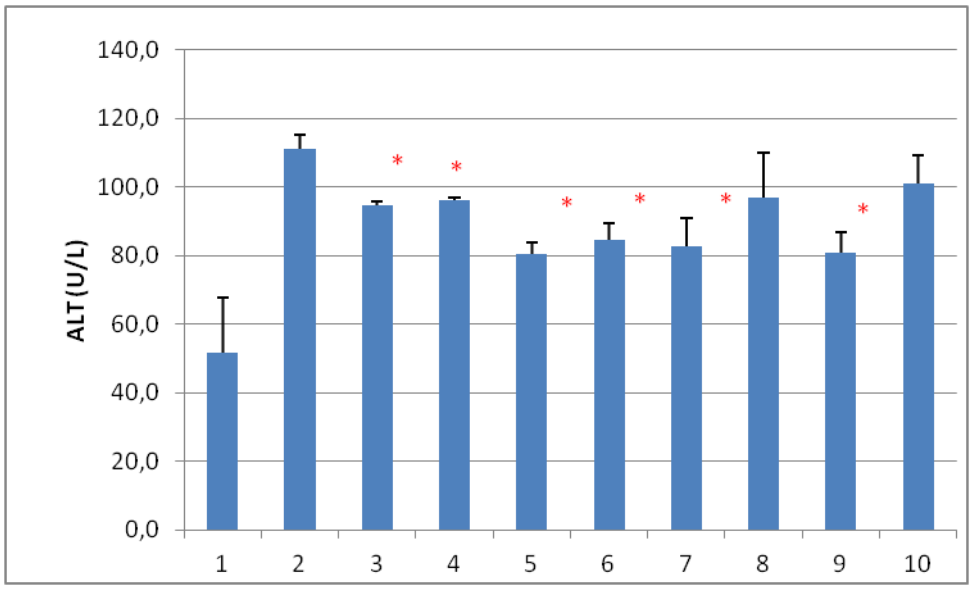
7. i 8.Me 0,5 i 1,0 = Globularia merdionalis, 0,5 i 1 M, HepG2 stanice tretirane 0,5 M G.pun. i 20 mM glukozom te 1 M G.punc. i 20 mM glukozom

9. i 10. Aly 0,5 i 1,0= Globularia alypum , 0,5 i 1,0 M, HepG2 stanice tretirane 0,5 M G.aly. i 20 mM glukozom te 1 M G.aly. i 20 mM glukozom

$P<0,05$ = statistički značajna razlika između uspoređivanih skupina

Tablica 2. Aktivnost ALT u HepG2 stanicama

Globulariae spp.		ALT (U/L)								
C	D	cor 0,5	cor 1,0	punc 0,5	punc 1,0	me 0,5	me 1,0	aly 0,5	aly 1,0	
40	108	96	97	77	82	84	97	75	99	
63	114	94	96	80	81	90	110	87	94	
		94	95	84	90	74	84	80	110	
51,5	111,0	94,7	96,0	80,3	84,3	82,7	97,0	80,7	101,0	s.v.
16,3	4,2	1,2	1,0	3,5	4,9	8,1	13,0	6,0	8,2	s.d.
	0,03	0,006	0,002	0,002	0,008	0,02	0,2	0,09	0,2	t-test
	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05		p<0,05		

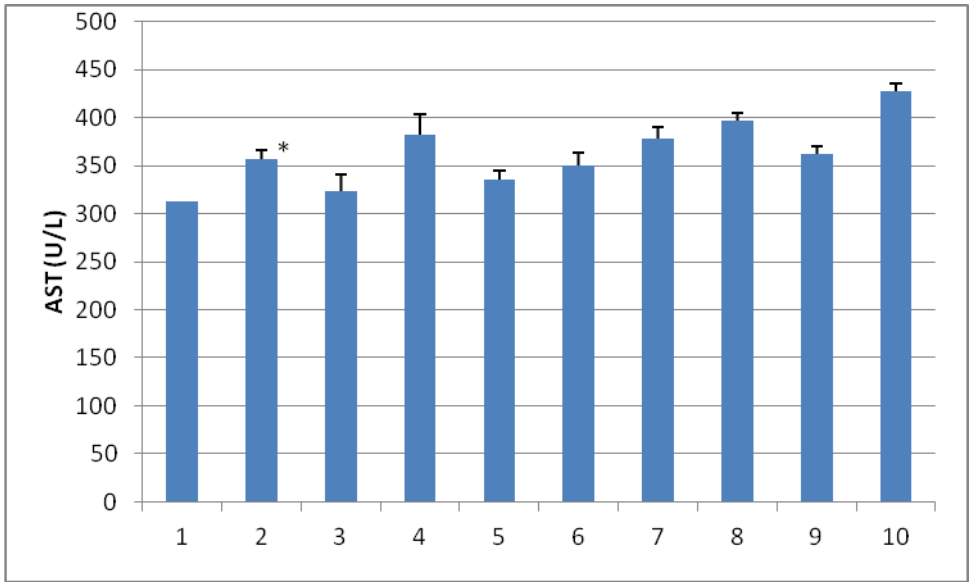


Slika 7. Grafički prikaz aktivnost ALT u lizatu HepG2 stanica tretiranih 20mM glukozom i Globularia spp. (0,5 i 1 mg/mL)

*- statistički značajne razlike između stanica tretiranih Globularia spp i 20 mM glukozom u odnosu na stanice tretirane samo 20 mM glukozom, prihvaćene ako je P<0,05

Tablica 3. Aktivnost AST u HepG2 stanicama

AST (U/L) Globulariae spp.										
C	D	cor 0,5	cor 1,0	punc 0,5	punc 1,0	me 0,5	me 1,0	aly 0,5	aly 1,0	
313	350	312	367	328	340	370	391	355	423	
312	363	336	397	342	360	387	402	368	433	
312,5	356,5	324	382	335	350	378,5	396,5	361,5	428	s.v.
0,7	9,2	17	21,2	9,9	14,1	12	7,8	9,2	7,1	s.d.
	0,02	0,14	0,26	0,15	0,64	0,18	0,04	0,64	0,01	t-test
	p<0,05									



Slika 8. . Grafički prikaz aktivnost AST u lizatu HepG2 stanica tretiranih 20mM glukozom i Globularia spp. (0,5 i 1 mg/mL)

*- statistički značajne razlike između stanica tretiranih 20mM glukozom i netretiranih stanica hepatocita

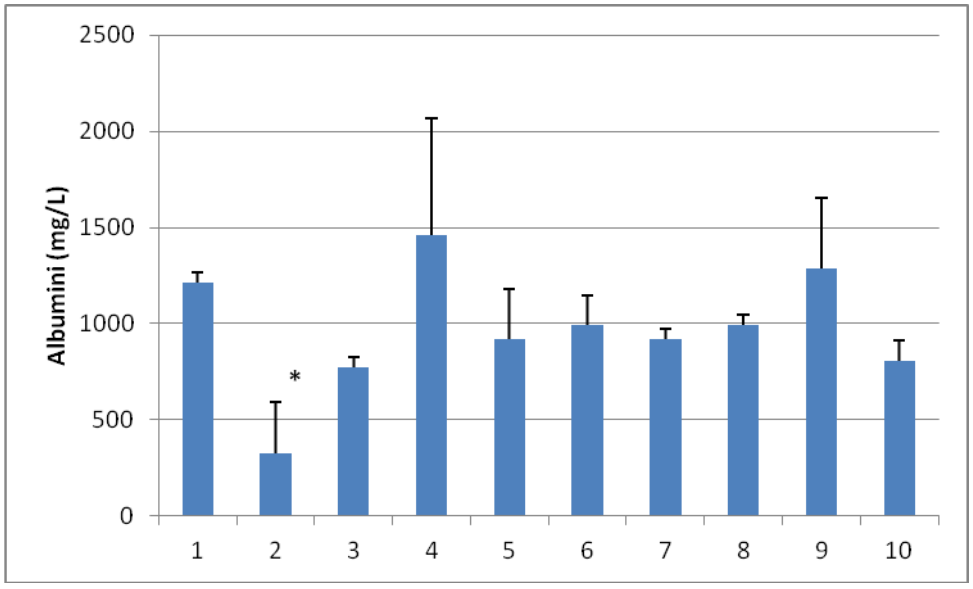
Tablica 4. Koncentracija albumina (g/L) u HepG2 stanicama (t-test)

Albumini (mg/L)		Globulariae spp.								
C	D	cor 0,5	cor 1,0	punc 0,5	punc 1,0	me 0,5	me 1,0	aly 0,5	aly 1,0	
1250	141,2	808,8	1888,8	735,3	882,3	882,3	955,8	1029	882,3	
1176	514,7	735,3	1029	1102,9	1102,9	955,8	1029	1544,1	735,3	
1213	327,95	772,05	1458,9	919,1	992,6	919,05	992,4	1286,55	808,8	s.v.
52,3	264,1	51,9	607,9	259,9	155,9	51,9	51,7	364,2	103,9	s.d.
	0,04	0,14	0,13	0,15	0,09	0,08	0,07	0,09	0,13	t-test
	p<0,05									

Račun:

$\frac{A_{probe}}{A_{standarda}}$ x koncentracija standarda = g albumina/L

Konc.standarda =50g/L



Slika 9. Grafički prikaz koncentracije albumina u lizatu HepG2 stanica tretiranih 20mM glukozom i Globularia spp. (0,5 i 1 mg/mL)

*- statistički značajne razlike između stanica tretiranih 20mM glukozom i netretiranih stanica hepatocita

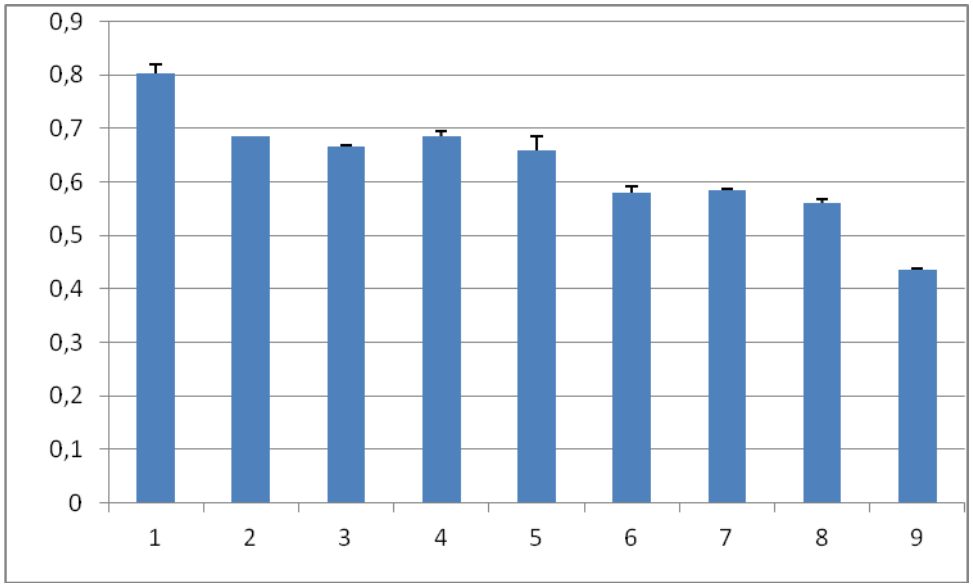
Tablica 5. Inhibicija α-glukozidaze u lizatu HepG2 stanica

Globularia spp		Inhibicija α-glukozidaze			A=405 nm					
	cor		punc		me		aly			
100%	0,5	1	0,5	1	0,5	1	0,5	1		
0,81	0,685	0,667	0,695	0,634	0,589	0,581	0,563	0,437		
0,775	0,686	0,663	0,68	0,69	0,563	0,582	0,558	0,437		
0,815	0,684	0,666	0,691	0,671	0,578	0,583	0,558	0,436		
0,81	0,683	0,668	0,674	0,639	0,588	0,588	0,568	0,434		
0,8025	0,6845	0,666	0,685	0,6585	0,5795	0,5835	0,56175	0,436	s.v.	
0,018	0,001	0,002	0,01	0,027	0,012	0,003	0,005	0,001	s.d.	
	14,8	17,1	14,7	17,9	27,8	27,3	30	45,7	% inhibicije	
	1,43733E-05	6,30158E-06	2,93498E-05	0,000113	9,55287E-07	4,02863E-07	2,561E-07	1,74874E-08	t-test	

Račun:

Npr.: 0,684 x 100/0,803 = 85,18

100-85,18 = 14,8



Slika 10. Grafički prikaz aktivnosti α- glukozidaze u lizatu HepG2 stanica tretiranih 20 mM glukozom i Globularia spp. (0,5 i 1 mg/mL)

Tablica 6. α-Glukozidaza inhibitorni učinak (%) različitih Globularia spp.

Konc. ekstrakta biljke	*Pozitivna kontrola(Akarboza) % inhibicije*	*Globularia cordifolia (GC) % inhibicije*	*Globularia punctata (GP) % inhibicije*	*Globularia meridionalis (GM) % inhibicije*	*Globularia alypum (GA) % inhibicije*
0.5 mg mL^{-1}	48.0[a]	14.8[a]	14.7[a]	27.8[a]	30.0[a]
1.0 mg mL^{-1}	57.0[a]	17.1[a]	17.9[a]	27.3[a]	45.7[a]

[a] $p < 0.01$ uspoređeno sa 100% aktivnosti α-glukozidaze

Cilj ovog istraživanja bio je pokazati djelovanje Globularia spp. na inhibiciju enzima α-glukozidaza. Kao referentno sredstvo korištena je akarboza.

Rezultati su pokazali inhibiciju enzima α-glukozidaza. Statistički najveće smanjenje pokazala je *Globularia alypum.*

Prilikom izloženosti HepG2 stanica 20 mM glukozi izazvani su hiperglikemijski uvjeti. Time dolazi do promjene, odnosno povećanja vrijednosti jetrenih enzima (ALT i AST), te smanjenja funkcije sinteze albumina. Globularia spp. bi trebale smanjiti vrijednost jetrenih enzima te povećati sintezu albumina.

Dobiveni rezultati pokazuju sljedeće:

- Kod tretiranja HepG2 stanica Globularia spp. pokazan je statistički značajan pad aktivnosti ALT u odnosu na vrijednosti ALT u hiperglikemijskim uvjetima (D) ($p<0,05$) (Tablica 1.) Statistički najveće smanjenje pokazale su *G. punctata* (0,5 mg/mL) te *G. alypum* (0,5 mg/mL).

- Međusobna usporedba stanica sa i bez Globularia spp. nije pokazala statistički značajno manju aktivnost AST kod stanica koje su tretirane Globularia spp u odnosu na stanice tretirane samo 20 mM glukozom (D) (Tablica 2.). Moguće je da smo ovakve rezultate dobili radi malog broja uzoraka, pa bi pokus trebali ponoviti s većim brojem uzoraka.

- Koncentracija albumina (g/L): Nakon tretiranja HepG2 stanica Globularia spp (0,5 i 1 mg/mL) nije pokazano statistički značajno povećanje sinteze albumina u odnosu na stanice u hiperglikemijskim uvjetima (D) (Tablica 3.).

5. RASPRAVA

Ključnu ulogu u patogenezi i kroničnim komplikacijama šećerne bolesti igraju oksidativni stres i slobodni radikali. Dugotrajna hiperglikemija uzrokuje povećano stvaranje slobodnih radikala i drugih reaktivnih vrsta, naročito reaktivnih kisikovih (engl. *reactive oxigen species,* (ROS). Porast ROS u šećernoj bolesti rezultat je njihovog povećanog stvaranja i/ili smanjenog uklanjanja antioksidativnim obrambenim mehanizmima: glikacijom proteina i nukleinskih kiselina, autooksidacijom glukoze, aktivacijom različitih unutarstaničnih signalnih puteva, lipidnom peroksidacijom i lipooksidacijom, itd. (Oršolić i sur., 2011.). Za razvoj komplikacija šećerne bolesti smatra se važnom postprandijalna hiperglikemija koja dovodi do oksidativnog stresa i upalnog stanja. Značajnu ulogu imaju lijekovi koji djeluju na način da inhibiraju α-glukozidazu, koja katalizira pretvorbu oligosaharida i disaharida u monosaharide, nužne za apsorpciju.

U ovom istraživanju ispitan je hepatoprotektivan učinak različitih Globularia spp : *Globularia cordifolia, Globularia punctata, Globularia merdionalis* i *Globularia alypum* u dvije koncentracije 0,5 i 1 mg/mL na HepG2 stanice u hiperglikemijskim uvjetima. Stanice su istovremeno tretirane 20 mM glukozom i Globularia spp (0,5 i 1 mg/mL). Aktivnosti indikatorskih enzima oštećenja jetre ALT i AST određene su u lizatu HepG2 stanica spektrofotometrijski i izražene su u internacionalnim jedinicama (U/L). U hiperglikemijskim uvjetima uočeno je statistički značajno smanjenje sinteze albumina, te je ispitan učinak Globularia spp na poboljšanje funkcionalne sposobnosti jetre.

Uočen je statistički značajan porast aktivnosti enzima ALT i AST (P = 0,03; 0,02) kod stanica tretiranih samo 20 mM glukozom (D) u odnosu na kontrolnu skupinu. Uočen je statistički značajan pad aktivnosti enzima ALT kod tretiranja stanica Globularia spp (0,5 i 1 mg/mL) i 20 mM glukozom u usporedbi sa stanicama koje su tretirane samo 20 mM glukozom (D). Nije uočeno statistički značajno smanjenje aktivnosti enzima AST nakon tretiranja stanica Globularia spp i 20 mM glukozom u odnosu na stance tretirane samo 20 mM glukozom. Iako je uočen porast u sintezi albumina nakon tretiranja stanica Globularia spp u odnosu na stanice tretirane samo 20 mM glukozom (D) taj porast nije statistički značajan.

U ovom radu ispitivan je i učinak Globularia spp na sposobnost inhibicije α-glukozidaze , enzima koji katalizira pretvorbu oligosaharida i disaharida u monosaharide. Inhibitori α-

glukozidaze mogu biti korisni kod pacijenata sa bolestima jetre jer djeluju direktno na GI-trakt, smanjuju stupanj apsorpcije glukoze te smanjuju postprandijalni porast koncentracije glukoze u krvi. Tretiranjem stanica Globularia spp postignuta je inhibicija α-glukozidaze. Kao referentno sredstvo korištena je akarboza.

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

Mnoge biljne vrste sadrže veliki udio antioksidansa, kao što su polifenoli, koji imaju važnu ulogu u adsorpciji i neutralizaciji slobodnih radikala. Iz roda Globularia najviše proučavana vrsta je *Globularia alypum*. Globularia alypum je biljka iz porodice Plantaginaceae. To je višegodišnji grm većinom rasprostranjen na mediteranskom području. Koristi se u narodnoj medicini te ima dokazan hipoglikemijski učinak. Različiti ekstrakti Globularie alypum su značajan izvor spojeva sa antioksidativnim, antigenotoksičnim te antituberkulotskim svojstvima (Khlifi i sur., 2005.).

Brojna istraživanja su se bavila proučavanjem ekstrakta lista G.alypum te određivanjem kemijskog sadržaja. Rezultati istraživanja Khlifa i sur., iz 2011. pokazali su visoki udio polifenola za koje se zna da imaju hipoglikemijski učinak te da je sadržaj polifenola ovisan o otapalu koji se koristi. Polarne frakcije su pokazale veći sadržaj polifenola od nepolarnih frakcija. Vrsta otapala također utječe i na sadržaj tanina, flavonoida te antocijanina.

Djelloulli F. i sur., u svom istraživanju proučavali su hipoglikemijski učink G. alypum kao i utjecaj na lipidnu peroksidaciju u štakora kod kojih je šećerna bolest inducirana streptozicinom. Kod sterptozicinom inducirane šećerne bolesti karakteristična je apoptoza β-stanica gušterače te redukcija sinteze inzulina koja je inducirana kisikovim radikalima. U normalnim uvjetima β-stanice održavaju koncentraciju glukoze, modulirajući brzinu izlučivanja inzulina u ovisnosti o koncentraciji glukoze u krvi. Ovo istraživanje je pokazalo hipoglikemijski učinak G. alypum.

Lipidi imaju važnu ulogu u patogenezi šećerne bolesti. Visoka koncentracija lipida i lipoproteina u krvi je karakteristika nekontrolirane šećerne bolesti. Istraživanje Djelloulli F. i sur., pokazalo je povećanu koncentraciju lipida u serumu i jetri kod štakora kojima je streptozicinom induciran dijabetes. Trigliceridima bogati lipoproteini su povećani te dovode do hipertrigliceridemije, većinom zbog smanjene aktivnosti lipoprotein lipaze. Metanolni ekstrakt G. alypum pokazao je smanjenje triglicerida u jetri i serumu. Ovaj učinak se može

objasniti povećanom aktivnošću lipoprotein lipaze u serumu. Također sniženje lipida se može objasniti učinkom antioksidativnih komponenti G.alypum. Merghache i sur., su pokazali učinak globularina, iridoidnog glukozida izoliranog iz G.alypum, na sniženje ukupnog kolesterola i triglicerida u serumu kod štakora sa šećernom bolesti.

Ova istraživanja su pokazala da je jedan od mogućih mehanizama postizanja hipoglikemijskog učinka inhibicija apsorpcije glukoze iz GI trakta, što se podudara sa našim ispitivanjem učinka Globularia spp na inhibiciju α-glukozidaze u GI traktu. Od 4 ispitivane vrste roda Globularia, upravo je *Globularia alypum* pokazala najveću inhibiciju α-glukozidaze, što potvrđuje i najveći udio sadržaja polifenola, za koje se smatra da su odgovorni za hipoglikemijski učinak.

6. ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitivano je hepatoprotektivno djelovanje različitih Globularia spp. na aktivnost jetrenih enzima ALT i AST koji ukazuju na oštećenje hepatocita, utjecaj Globularia spp. na poboljšanje sintetske funkcije jetre (sinteza albumina), te učinak Globularia spp. u inhibiciji α-glukozidaze, radi postizanja hipoglikemijskog učinka.

Istraživanje je rađeno na kulturi HepG2 stanica u hiperglikemijskim uvjetima.

U lizatu HepG2 stanica određena je katalitička aktivnost enzima spektrofotometrijski, a koncentracija albumina fluorometrijski.

Na temelju rezultata dobivenih nakon provedenog istraživanja možemo zaključiti sljedeće:

1) Uočen je statisitički značajan porast aktivnosti enzima ALT u lizatu HepG2 stanica tretiranih 20 mM glukozom (D) u odnosu na kontrolnu skupinu (P = 0,03).

2) Tretiranje HepG2 stanica različitim Globularia spp. (0,5 i 1 mg/mL) statistički je značajno smanjilo aktivnost enzima ALT u odnosu na skupinu tretiranu samo 20 mM glukozom (D). Statistički najveći pad aktivnosti pokazale su *Globularia punctata* (0,5 mg/mL) *i Globularia alypum* (1 mg/mL).

3) Uočen je statistički značajan porast aktivnosti enzima AST u lizatu HepG2 stanica tretiranih 20 mM glukozom (D) u odnosu na kontrolnu slupinu (P= 0,02)

4) Tretiranje HepG2 stanica različitim Globularia spp. (0,5 i 1 mg/mL) nije pokazalo statistički značajno smanjenje aktivnosti enzima AST u odnosu na skupinu tretiranu samo 20 mM glukozom (D).

5) Statisitički značajno smanjenje funkcionalne sposobnosti jetre (sinteza albumina) uočeno je kod tretiranja stanica sa 20 mM glukozom u odnosu na kontrolnu skupinu (P = 0,04).

6) Iako je uočen porast u sintezi albumina kod stanica tretiranih Globularia spp. u odnosu na stanice tretirane samo 20 mM glukozom (D) taj porast nije statistički značajan te

nije uočeno poboljšanje sintetske funkcije jetre nakon tretiranja stanica različitim Globularia spp.

7) Rezultati ispitivanja učinka Globularia spp. na inhibiciju α-glukozidaze pokazali su pozitivan učinak tj. postignuta je statistički značajna inhibicija α-glukozidaze ($p<0.05$). Kao pozitivna kontrola korištena je akarboza u istim koncentracijama.

8) Tretiranje HepG2 stanica 20 mM glukozom dovelo je do oštećenja hepatocita što se očituje porastom aktivnosti ispitivanih jetrenih enzima, te smanjenje sintetske funkcije jetre što je utjecalo na smanjenu sintezu albumina. U ovom radu pokazano je da Globularia spp (0,5 i 1 mg/mL) ima hepatoprotektivno djelovanje na aktivnost ALT u HepG2 stanicama u hiperglikemijskim uvjetima.

9) Potrebno je provesti daljnja istraživanja na većem broju uzorka *in vivo* i *in vitro* korištenjem Globularia spp. kako bi se utvrdio njihov hepatoprotektivan učinak, mehanizam djelovanja te sigurnost primjene, kako bi se napravio napredak u sprječavanju, usporavanju progresije te liječenju šećerne bolesti.

7. LITERATURA

1. Burker Turk counting chamber, 2010., http://www.who.int/vaccines/en/poliolab/webhelp/Chapter_04/4_2_Cell_culture_procedures.htm, pristupljeno 2.06.2015.
2. Božičević S. Šećerna bolest. U:Medicinskobiokemijska dijagnostika u kliničkoj praksi. Topić E, Primorac D, Janković S, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2004, str. 123-133.
3. Čolak E, Majkić-Singh N. The effect of hiperglycemia and oxidative stress on the development and progress of vascular complications in type 2 diabetes. *JMB*, 2009, 28, 63-71.
4. Daycem K, Moktar H, Akrem EH, Sylvie C, Souchard JP, Coudere F, Bouajila J. Global Chemical Composition and Antioxidant and Anti-Tuberculosis Activities of Various Extracts *of Globularia alypum* L. (Globulariaceae) Leaves. *Molecules*, 2011, 16, 10592-10603.
5. Delmastro MM, Piganelli JD. Oxidative stress and redox modulation potencial in type 1 diabetes. *Clinical and Developmental Imunology*, 2011, 10, 15-30.
6. Djellouli F, Krouf D, Bouchenak M, Lacaille-Dubois MA. Favorable Effects of Globularia alypum L.Lyophilized Methanolic Extract on the Reverse Cholesterol Transport and Lipoprotein Peroxidation in Streptozotocin –Induced Diabetic Rats. *IJPPR*, 2014-15, 758-765.
7. Djeridane A, Yousfi M, Nadjemi B, Boutassouna D, Stocker P, Vidal N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem* , 2006, 97, 654-660.

8. Domitrović R. Hepatprotektivno djelovanje fitokemikalija. *Medicina fluminensis*, 2012, 3, 4-14.
9. El-Abhar SH, Schaalan FM. Phytotherapy in diabetes: Review on potential mechanistic perspectives. *World J Diabetes*, 2014, 6, 176-197.
10. Es-Safi N, Kollman A, Khlifi S, Ducort PH. Antioxidative effect of compounds isolated from Globularia alypum L. structure-activity relationship. *LWT-Food Sci Technol*, 2007, 40, 1246-1252.
11. Es-Safi N, Khlifi S, Kerhoas L, Kollman A, El Abbouyi A, Ducort PH. Iridoid glucosides from the aerial parts of Globularia alypum L. (Globulariaceae). *Chem Pharm Bul*, 2006, 54-85.
12. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-Activated signalling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*, 2002, 23, 599-622.
13. Fifa B, Debition E, Yedomonhan H, Avlessi F, Teulade JC, Sohounhloue C.K. D. α- Glucosidase inhibition, antioxidant and cytotoxicity activities of semiethanolic extracts of *Bridellia ferruginea* benth. and *Ceiba pentandra* L. Gaerth from Benin. *Res J Chem Sci*, 2012, 12, 31-36.
14. Gašparović AC, Jaganjac M, Mihaljević B, Šunjić SB, Žarković N. Assays for the measurement of lipid peroxidation. *Methods Mol Biol*. 2013, 965, 283-296.
15. Harmonizacija laboratorijskih nalaza u području opće medicinske biokemije, 2004., http://www.hkmb.hr/obavijesti/obavijesti-index.html, pristupljeno 8. 6. 2015.
16. Hrvatske smjernice za liječenje šećerne bolesti tipa 2, 2009., http://www.hljk.hr/LinkClick.aspx?fileticket=mi7QImTBbVA%3d&tabid=73, pristupljeno 8. 6. 2015.

17. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology*, 2005, 4-5.

18. Liu z, Fu C, Wang W, Xu B. Prevalence of chronic complications of type 2 diabetes Mellitus in outpatients – a cross- sectional hospital based survey in urban China. *HQLO*, 2010, 8, 62-71.

19. Merghache S, Zerriouh M, Merghache D, Tabt B, Djaziri R, Ghalem S. Evulation of Hypoglycaemic and hypolipidemic activities of Globularin isolated from Globularia Alypum L. in normal and streptozotocin – induced diabetic rats. *JAPS*, 2013, 3, 1-7.

20. Mansour RB, Gargouri B, Gargouri B, Elloumi N, Jilani IB, Ghrabi-Gammar Z, Lassoued S. Investigation of antioxidant activity of alcoholic extract of Globularia Alypum L. *J Med Plants Res*, 2012, 6, 4193-4199.

21. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmakologija. Zagreb, Golden marketing- Tehnička knjiga, 2006, str 387.

22. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis int he diagnosis and Management of diabetes mellitus. *Clin Chem*, 2002, 48, 436-472.

23. Skim F, Lazrek HB, Kaaya A, Jana El Amri M. Pharmacological studies of two *Globularia alypum* and *Zygophyllum gaetulum*. *Therapie*, 1999, 54, 711-715.

24. Štraus B. Enzimi. U: Štrausova Medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, Urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 273-295.

25. Štraus B, Petlevski R. Ugljikohidrati. U: Štrausova Medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 99-123.

26. Taleb-Dida N, Krouf D, Bouchenak M. Globularia alypum aqueous extract decreases Hypertriglyceridemia and ameliorates oxidative status of the muscle, kidney, and heart in rats fed a high-fructose diet. *Nutr Res*, 2011, 31, 488-495.

27. Tiwari A, Swapna K, Ayesha M, Zehra SB, Agawane A, Madhusudana K. Identification of proglycemic and antihyperglycemic activity in antioxidant Rich fraction of some common food grains International, *Food Res J*, 2011, 18, 915-923.
28. 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.
29. Zennaki S, Krouf D, Senouci D, Bouchenak M. *Globularia alypum* lyophilized methanolic extract decreases hyperglycemia and improves redox status in various tissues of streptozotocin –induced diabetic rats. *J Complement Integr Med*, 2009, 6-34.
30. World Diabetes Day, 2015., http://www.who.int/mediacentre/events/annual/world_diabetes_day/en/index.html, pristupljeno 2. 6. 2015.
31. Wright Jr E, Scism-Bacon JL, Glass LC. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *Int J Clin Pract*, 2006, 60, 308-314.

8. SAŽETAK

Šećerna bolest je najčešća metabolička bolest koja nastaje zbog apsolutnog ili relativnog nedostatka hormona inzulina. Smatra se da oksidativni stres igra značajnu ulogu u etiologiji i patogenezi šećerne bolesti i njenih kasnih komplikacija.

Tretiranje HepG2 stanica 20 mM glukozom uzrokuje hiperglikemijske uvjete koji dovode do oštećenja hepatocita što se očituje porastom jetrenih enzima (ALT i AST). Cilj ovog rada bio je ispitati hepatoprotektivni učinak Globularia spp na aktivnost jetrenih enzima (ALT i AST), ispitati učinak Globularia spp na poboljšanje funkcionalne sposobnosti jetre (sinteza albumina) te učinak na inhibiciju enzima α-glukozidaze, enzima koji katalizira pretvorbu oligosaharida i disaharida u monosaharide. Inhibicijom tog enzima postiže se hipoglikemijski učinak. Aktivnosti enzima izmjerenu su u lizatu stanica. Istraživanje je pokazalo statistički značajno povećanje aktivnosti enzima (ALT i AST) u lizatu HepG2 stanica tretiranih 20 mM glukozom u odnosu na kontrolnu skupinu ($P<0,05$). Tretiranje HepG2 stanica Globularia spp (0,5 i 1 mg/mL) i 20 mM glukozom statistički je značajno smanjilo aktivnost enzima ALT u odnosu na skupinu tretiranu samo 20 mM glukozom. Nije pokazano statistički značajno smanjenje aktivnosti AST nakon tretiranja različitim Globularia spp. Iako je uočen porast u sintezi albumina kod stanica tretiranih Globularia spp taj porast nije statistički značajan. Rezultati ispitivanja učinka Globularia spp na inhibiciju α-glukozidaze pokazali su pozitivan učinak tj postignuta je statistički značajna inhibicija α-glukozidaze.

Rezultati ovog rada upućuju na hepatoprotektivan učinak Globularia spp (0,5 i 1 mg/mL) na aktivnost enzima ALT u HepG2 stanicama u hiperglikemijskim uvjetima. Istraživanje je pokazalo i učinak Globularia spp u inhibiciji α-glukozidaze. Od 4 ispitivane vrste (*Globularia cordifolia, Globularia punctata, Globularia merdionalis* i *Globularia alypum),* najveću inhibiciju pokazala je G.alypum, koja i sadrži najveći udio polifenola, za koje se smatra da imaju hipoglikemijski učinak.

8. SUMMARY

Diabetes mellitus is widely spread epidemic disease that results from the absence of insuline, decreased secretion and /or impaired function. Oxidative stress is belived to play a pivotal role in the etiology and pathogenesis of diabetes mellitus and its late complications.

Treatmet of HepG2 cells with 20 mM glucose causes hyperglycemic conditions , which leads to damage on hepatocytes as evidenced by increased activitiy of liver enzymes (ALT, AST). The aim oft this work is to investigate hepatoprotective effect of Globularia spp on the activity of liver enzymes , effect Globularia spp on the albumin synthesis, and effect Globularia spp on the activitiy of inhibition α-glucosidase. Activities of these enzymes were measured in cell lysates. Treatment of cells with 20 mM glucose significantly ($P<0,05$) increased activities of liver enzymes compared to the control group. Treatment with 20 mM glucose and Globularia spp significantly ($P<0,05$) decreased activities of liver enzymes comperd to the group treated only with 20 mM glucose, while treatment with Globularia spp did not decreased activities of liver enzymes. Treatment of cells with Globularia spp did not showed statistically significant ($P<0,05$) increased albumin synthesis. Treatment of cells with Globularia spp significantly ($P<0,05$) showed α-glucosidase inhibitory activity.

The results of this study suggest the hepatoprotective effect Globularia spp (0,5 and 1 mg/mL) on the activity of ALT in HepG2 cells in hyperglycemic conditions. This study also indicate that Globularia spp exibitis inhibitiory activity of α-glucosidase.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Hipoglikemijski i hepatoprotektivni učinak vrsta roda Globularia na HepG2 stanicama u hiperglikemijskim uvjetima

Sandra Čuljak

SAŽETAK

Tretiranje HepG2 stanica 20 mM glukozom uzrokuje hiperglikemijske uvjete koji dovode do oštećenja hepatocita što se očituje porastom jetrenih enzima (ALT i AST). Cilj ovog rada bio je ispitati hepatoprotektivni učinak Globularia spp na aktivnost jetrenih enzima (ALT i AST), ispitati učinak Globularia spp na poboljšanje funkcionalne sposobnosti jetre (sinteza albumina) te učinak na inhibiciju enzima α-glukozidaze, enzima koji katalizira pretvorbu oligosaharida i disaharida u monosaharide. Inhibicijom tog enzima postiže se hipoglikemijski učinak. Aktivnosti enzima izmjereni su u lizatu stanica. Istraživanje je pokazalo statistički značajno povećanje aktivnosti enzima (ALT i AST) u lizatu HepG2 stanica tretirani 20 mM glukozom u odnosu na kontrolnu skupinu ($P<0,05$). Tretiranje HepG2 stanica Globularia spp (0,5 i 1 mg/mL) i 20 mM glukozom statistički je značajno smanjilo aktivnost enzima ALT u odnosu na skupinu tretiranu samo 20 mM glukozom. Nije pokazano statistički značajno smanjenje aktivnosti AST nakon tretiranja različitim Globularia spp. Iako je uočen porast u sintezi albumina kod stanica tretiranih Globularia spp taj porast nije statistički značajan. Rezultati ispitivanja učinka Globularia spp na inhibiciju α-glukozidaze pokazali su pozitivan učinak tj postignuta je statistički značajna inhibicija α-glukozidaze.

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

Rad sadrži: 46 stranica, 10 grafičkih prikaza, 6 tablica i 31 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Globularia spp, kultura stanica hepG2, hiperglikemija, ALT, AST, α-glukozidaza

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Roberta Petlevski**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Željka Vanić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Lovorka Vujić, *viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2015.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Hypoglycemic and hepatoprotective effect off genus Globularia in HepG2 cells under hyperglycemic conditions

Sandra Čuljak

SUMMARY

Treatmet of HepG2 cells with 20 mM glucose causes hyperglycemic conditions , which leads to damage on hepatocytes as evidenced by increased activitiy of liver enzymes (ALT, AST). The aim oft this work is to investigate hepatoprotective effect of Globularia spp on the activity of liver enzymes , effect Globularia spp on the albumin synthesis, and effect Globularia spp on the activitiy of inhibition α-glucosidase. Activities of these enzymes were measured in cell lysates. Treatment of cells with 20 mM glucose significantly ($P<0,05$) increased activities of liver enzymes compared to the control group. Treatment with 20 mM glucose and Globularia spp significantly ($P<0,05$) decreased activities of liver enzymes comperd to the group treated only with 20 mM glucose, while treatment with Globularia spp did not decreased activities of liver enzymes. Treatment of cells with Globularia spp did not showed statistically significant ($P<0,05$) increased albumin synthesis. Treatment of cells with Globularia spp significantly ($P<0,05$) showed α-glucosidase inhibitory activity.

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

Thesis includes: 46 pages, 10 figures, 6 tables and 31 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Globularia spp, HepG2 cell culture, hyperglycemic conditions, ALT, AST, α-glucosidase

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
Željka Vanić, Ph.D. *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lovorka Vujić, Ph.D. *Senior Assistant,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2015.