Antioksidativni učinak vodenog ekstrakta lista biljke Betula pendula Roth (Betulaceae) u hiperglikemijskim uvjetima in vitro

Petrunić, Antonija

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:163:737131

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Antonija Petrunić

Antioksidativni učinak vodenog ekstrakta lista biljke *Betula pendula* Roth (Betulaceae) u hiperglikemijskim uvjetima *in vitro*

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

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

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Roberti Petlevski koja je svojim stručnim i znanstvenim savjetima oblikovala ideju i pomogla mi u izradi ovog diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima koji su me podupirali i uvijek poticali moju težnju k ostvarivanju sve viših i viših ciljeva. Hvala na beskonačnom strpljenju, bezuvjetnom razumijevanju i ljubavi. Hvala što ste uvijek vjerovali u mene i moj uspjeh.

Zahvaljujem se svojoj sestri jer je jedina i neponovljiva. Hvala ti na podršci i ljubavi.

Zahvaljujem se Petri i Luki jer su svojom radošću moje studiranje činili sretnijim i imali razumijevanja za sve one sate koje sam posvetila knjizi, a ne njima.

Zahvaljujem se svim kolegama koji su mi svojim prisutstvom uljepšali vrijeme provedeno na fakultetu i pridonijeli osjećaju da je to vrijeme najljepši dio mog života. Bez vas studij ne bi prošao tako zabavno. Hvala vam na bezbrojnim kavama, zajedničkim trenutcima i razgovorima koji su od mene načinili osobu.

Hvala Dominiku na beskrajnoj ljubavi i potpori.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. ŠEĆERNA BOLEST 1

1.1.1. TIP 1 ŠEĆERNE BOLESTI 3

1.1.2. TIP 2 ŠEĆERNE BOLESTI 3

1.1.3. TRUDNIČKA ŠEĆERNA BOLEST 4

1.1.4. OSTALI TIPOVI ŠEĆERNE BOLESTI 4

1.2. KOMPLIKACIJE ŠEĆERNE BOLESTI 6

1.3. OKSIDATIVNI STRES 7

1.3.1. SLOBODNI RADIKALI 7

1.4. OKSIDATIVNI STRES I ŠEĆERNA BOLEST 9

1.5. ANTIOKSIDANSI 11

1.5.1. VITAMIN C 11

1.5.2. VITAMIN E 11

1.5.3. KAROTENI 11

1.5.4. REDUCIRANI GLUTATION 11

1.6. GLUTATION-S-TRANSFERAZA 13

1.7. SLOBODNE TIOLNE SKUPINE 14

1.8. *BETULA PENDULA* ROTH (BETULACEAE) 14

1.8.1. KEMIJSKE SASTAVNICE 15

1.8.2. RUTIN 16

2. OBRAZLOŽENJE TEME 17

3. MATERIJALI I METODE 18

3.1. HEP G2 KULTURA STANICA 18

3.2. TRETIRANJE STANICA GLUKOZOM I VODENIM EKSTRAKTOM LISTA BILJKE *BETULA PENDULA* 19

3.3. ODREĐIVANJE GLUTATIONA U LIZATU HEP G2 STANICA 20

3.4. ODREĐIVANJE SLOBODNIH TIOLNIH SKUPINA U LIZATU HEP G2 STANICA ... 21
3.5. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI GLUTATION-S-TRANSFERAZE U LIZATU HEP G2 STANICA ... 23
3.6. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA ... 25
4. REZULTATI I RASPRAVA ... 26
4.1. REZULTATI ... 26
4.2. RASPRAVA ... 30
5. ZAKLJUČCI ... 33
6. LITERATURA ... 34
7. SAŽETAK/SUMMARY ... 37
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD ... 39

1. UVOD

Šećerna bolest je ozbiljna bolest koja tijekom vremena dovodi do ozbiljnih oštećenja srca, krvnih žila, očiju, bubrega i živaca. U posljednja tri desetljeća prevalencija tipa 2 šećerne bolesti dramatično je porasla u svim državama svijeta. Unatoč dostupnoj terapiji inzulinom opasna je po život za sve oboljele. Globalni je cilj zaustaviti rast oboljelih od šećerne bolesti i pretilosti do 2025. godine. Upravo zato postoji i Program šećerne bolesti od strane Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) kojem je cilj prevenirati tip 2 šećerne bolesti i minimizirati komplikacije te maksimalno povećati kvalitetu života za sve ljude oboljele od šećerne bolesti (www.who.int).

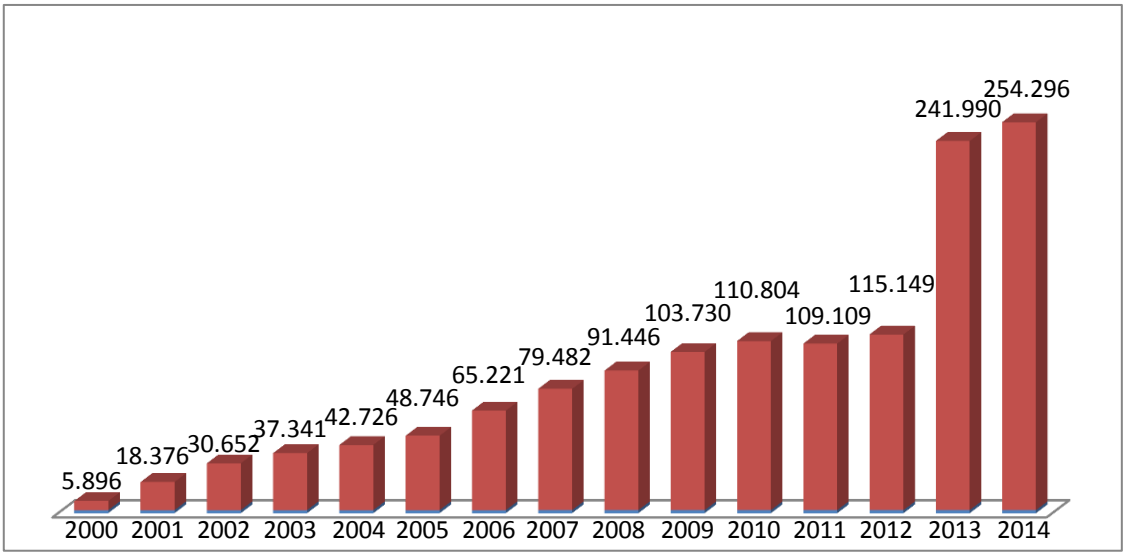
1.1. ŠEĆERNA BOLEST

Šećerna bolest (lat. diabetes mellitus) je kronični metabolički sindrom koji nastaje zbog relativnog i/ili apsolutnog manjka inzulina. Karakterizirana je kroničnom hiperglikemijom koju prate poremećaji u metabolizmu ugljikohidrata, proteina i masti (Štraus i Petlevski, 2009).

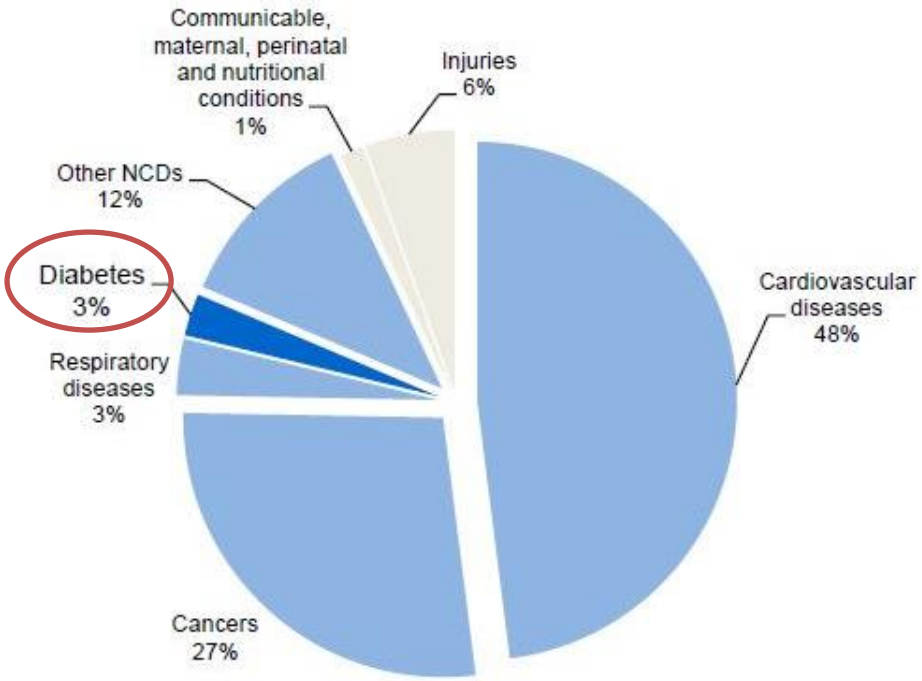
Broj oboljelih od šećerne bolesti alarmantno raste na epidemijsku razinu (Kharroubi i Darwish, 2015).

Prema prvom globalnom izvješću o šećernoj bolesti od strane Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) vidljivo je da se broj oboljelih odraslih osoba učetverostručio od 1980. godine do danas na 422 milijuna. Svake godine 1,5 milijuna smrtnih slučajeva izravno je povezano sa šećernom bolesti. Zabrinjavajući je podatak i da 1 od 3 odraslih osoba starijih od 18 godina ima pretjeranu tjelesnu težinu, a 1 od 10 osoba pati od pretilosti (www.who.int).

U Europi od šećerne bolesti boluje 60 milijuna osoba, a prema podatcima Registra osoba sa šećernom bolešću u Hrvatskoj postavljenu dijagnozu ima 254 296 punoljetnih osoba. Zabrinjavajuća je činjenica da se broj oboljelih povećava iz godine u godinu. Prema ranijim istraživanjima smatra se da preko 40 % oboljelih osoba u Hrvatskoj još uvijek nema postavljenu dijagnozu jer procjene govore o preko 400 000 odraslih osoba sa šećernom bolešću. Svaka deseta osoba u Hrvatskoj ima šećernu bolest (www.hzjz.hr).



Slika 1. Broj osoba sa šećernom bolešću (Izvor: CroDiab, 2014)



Slika 2. Raspodjela smrtnosti u Hrvatskoj na 50 000 umrlih (Izvor: www.who.int)

Šećerna bolest uzrok je 3% smrtnih slučajeva u Hrvatskoj prema izvješću Svjetske zdravstvene organizacije, a ono što je najviše zabrinjavajuće je činjenica da je taj postotak u porastu (www.who.int).

Klasična podjela dijabetesa predložena od strane American Diabetes Association (ADA) još 1997. godine obuhvaća tip 1 šećerne bolesti, tip 2 šećerne bolesti, gestacijski dijabetes i ostale tipove šećerne bolesti (Kharroubi i Darwish, 2015).

1.1.1. TIP 1 ŠEĆERNE BOLESTI

Šećerna bolest tipa 1 najčešće se pojavljuje već u djetinjstvu pa se stoga prije nazivala i juvenilni dijabetes. Karakterizira ju apsolutni manjak inzulina koji nastaje kao posljedica lučenja autoantitijela na pojedine komponente β-stanica Langerhansovih otočića gušterače ili na molekulu inzulina. To su ICA (islet cell antibodies) antitijela protiv stanica gušteračinih otočića, IAA (insulin autoantibodies) antitijela protiv inzulina, GADA (glutamic acid decarboxylase autoantibodies) antitijela protiv dekarboksilaze glutaminske kiseline te IA-2A i IA-2βA (tyrosine phosphatase autoantibodies) antitijela protiv tirozinske fosfataze. Većina oboljelih ima autoantitijela koja se mogu pojaviti u cirkulaciji već nekoliko godina pa i mjeseci prije pojave jasnih simptoma. To je autoimunosni tip 1 šećerne bolesti. Bolesnici u kojih se takva autoantitijela ne mogu dokazati svrstavaju se u idiopatski tip 1 šećerne bolesti. Nastanak tipa 1 šećerne bolesti obično je iznenadan i uključuje simptome poput učestalog mokrenja, prekomjerne žeđi i suhoće usta, izraziti umor odnosno manjak energije, stalnu glad, nagli gubitak mase, smetnje vida te ponavljane infekcije. Osim genetskih biljega za pojavu tipa 1 šećerne bolesti odgovorni su i čimbenici okoline poput virusa i kemikalija. Osobe s tipom 1 šećerne bolesti na terapiji su inzulinom od trenutka postavljanja dijagnoze (Štraus i Petlevski, 2009).

1.1.2. TIP 2 ŠEĆERNE BOLESTI

Šećerna bolest tipa 2 najčešće se pojavljuje u odraslih. Vjerojatno nastaje zbog nedovoljnog lučenja inzulina iz gušterače i/ili njegove nemogućnosti da pravilno djeluje na ulazak glukoze u stanice mišićnog i masnog tkiva što se definira pojmom inzulinska rezistencija. Iako je primarna inzulinska rezistencija moguća i u osoba s normalnom tjelesnom masom najčešći je

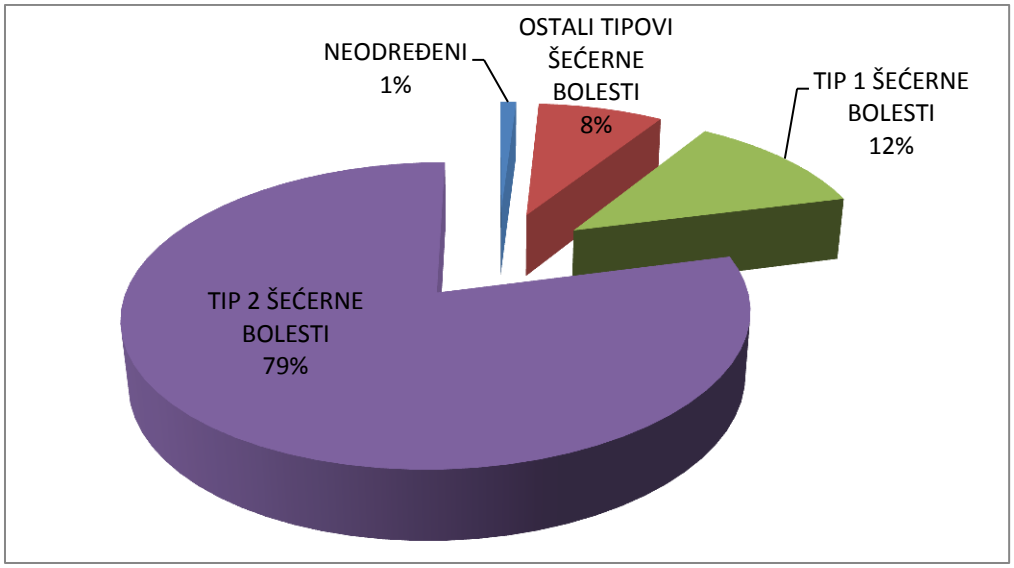
uzrok inzulinske rezistencije visceralna pretilost. Bolest obično počinje postupno i polagano napreduje. Pri uznapredovaloj bolesti pojavljuju se simptomi poput prekomjerne žeđi, pojačanog mokrenja, pospanosti i zamagljenog vida. U žena su česte vaginalne gljivične infekcije, svrbež, trnci i žarenje u stopalima. Tip 2 šećerne bolesti najčešće se otkriva slučajno, sistematskim pregledom, nalazom povećanih vrijednosti glukoze u krvi i mokraći prije pojave simptoma. Osim genetskih biljega za pojavu tipa 2 šećerne bolesti, kao i kod tipa 1 šećerne bolesti, odgovorni su i okolišni čimbenici od kojih su najvažniji smanjena tjelesna aktivnost i povećanje tjelesne mase (Štraus i Petlevski, 2009).

1.1.3. TRUDNIČKA ŠEĆERNA BOLEST

Trudnička šećerna bolest ili gestacijski dijabetes prvi se put pojavljuje u trudnoći, a nestaje nakon poroda. Pojačano lučenje posteljičnih hormona, posebno potkraj drugog i u trećem tromjesečju, uzrokuje inzulinsku rezistenciju, a time i povećanu potrebu za inzulinom. U normalnoj se trudnoći povećava lučenje inzulina i njegova aktivnost, a u trudnica u kojih povećano lučenje i aktivnost inzulina nisu dovoljni razvija se trudnička šećerna bolest. Liječenje se provodi dijetalnom prehranom, a ukoliko se njome ne smanji koncentracija glukoze u krvi pribjegava se inzulinskom liječenju. U tih žena veća je vjerojatnost pojavljivanja tipa 2 šećerne bolesti u kasnijoj životnoj dobi (Štraus i Petlevski, 2009).

1.1.4. OSTALI TIPOVI ŠEĆERNE BOLESTI

Ostali tipovi šećerne bolesti uzrokovani su genetičkim poremećajima β-stanica Langerhansovih otočića gušterače, genetičkim poremećajima djelovanja inzulina, bolestima egzokrinog dijela gušterače, endokrinopatijama, lijekovima i kemikalijama, infekcijama, neuobičajenim oblicima imunosno uzrokovane šećerne bolesti, drugim genetičkim sindromima. Kao novi razred uvedena je i poremećena regulacija glukoze s dva stupnja. To su IGT (impaired glucose tolerance) poremećaj tolerancije glukoze i IFG (impaired fasted glucose) poremećaj glukoze natašte (Štraus i Petlevski, 2009).



Slika 3. Raspodjela oboljelih prema tipu šećerne bolesti (Izvor: CroDiab, 2014)

1.2. KOMPLIKACIJE ŠEĆERNE BOLESTI

Komplikacije šećerne bolesti dijele se na akutne i kronične. Akutne komplikacije nastaju brzo i zahtijevaju hitnu intervenciju. To su hipoglikemija, dijabetička ketoacidoza, laktatna acidoza i hiperosmolalna koma. Hipoglikemija je česta akutna komplikacija u osoba s tipom 1 šećerne bolesti. To je stanje u kojem je koncentracija glukoze u krvi manja od 2,5 mmol/l. Dijabetička ketoacidoza je za život opasna komplikacija u osoba s tipom 1 šećerne bolesti. To je zapravo metabolička acidoza koja nastaje kao posljedica manjka inzulina i relativnog ili apsolutnog viška glukagona. Zbog manjka inzulina i smanjenog iskorištavanje ugllјikohidrata u energijske svrhe dolazi do pojačanog metabolizma masti što rezultira porastom slobodnih masnih kiselina. Jedan dio masnih kiselina dospijeva u jetru gdje dolazi do sinteze ketonskih spojeva koji oštećuju središnji živčani sustav i uzrokuju komu. Laktatna je acidoza najčešća metabolička acidoza koja nastaje zbog povećanog stvaranja i/ili smanjenog iskorištavanja laktata koji je krajnji produkt anaerobnog metabolizma glukoze. Nastaje kao posljedica tkivne hipoksije. Hiperosmolalna koma pojavljuje se u osoba starije životne dobi s tipom 2 šećerne bolesti. Karakterizirana je iznimno visokom koncentracijom glukoze u krvi. Kronične komplikacije šećerne bolesti nastaju polako i mnoge su godinama bez simptoma, ali trajno oštećuju i uništavaju pojedine organe. Posljedica su dugotrajne hiperglikemije zbog slabe metaboličke kontrole bolesti. Dijele se na mikroangiopatije i makroangiopatije. U mikroangiopatije ubrajaju se retinopatija, nefropatija i neuropatija, a u makroangiopatije moždani udar, ishemijske srčane bolesti i periferne vaskularne bolesti (Štraus i Petlevski, 2009).

1.3. OKSIDATIVNI STRES

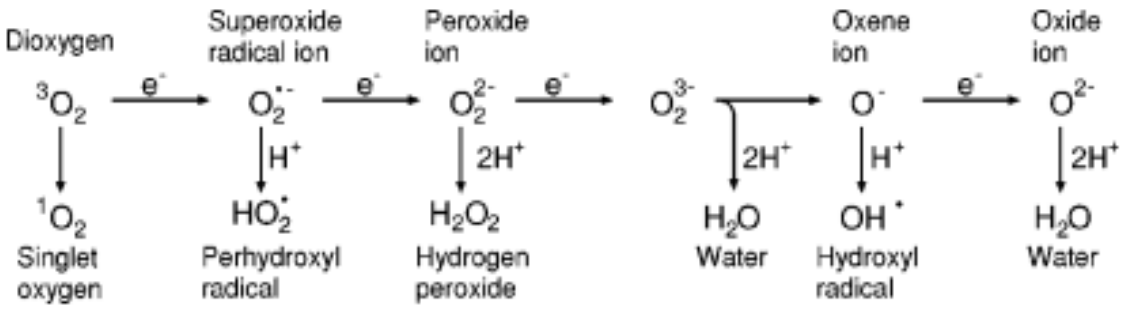
Oksidativni stres je pomak ravnoteže u staničnim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama prema oksidaciji ili prekomjerenom stvaranju radikala. Stanica gubi ravnotežu stvaranja radikala i nije u mogućnosti da ih ukloni antioksidacijskim sustavom. Pri normalnom staničnom metabolizmu sustavi obrane reagiraju s nastalim količinama slobodnih radikala i održava se homeostaza. U nekim kliničkim stanjima stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta je povećano pa kapacitet citoprotektivnih enzima i antioksidansa nije dovoljan i prevladavaju reaktivne kisikove vrste (Čepelak, 2009).

Oksidativni stres dovodi do oštećenja makromolekula uključujući ugljikohidrate, proteine, lipide i DNA što uzrokuje disfunkciju stanica i oštećenje tkiva. Upravo je povećani oksidativni stres faktor koji dovodi do inzulinske rezistencije, dislipidemije, disfunkcije β-stanica Langerhansovih otočića, poremećaja tolerancije glukoze i konačno dovodi do razvoja šećerne bolesti tipa 2 (Tangvarasittichai, 2015).

1.3.1. SLOBODNI RADIKALI

Slobodni radikali su kemijske vrste koje u vanjskoj orbitali imaju jedan nespareni elektron. Zbog tog nesparenog elektrona oni su obično visoko reaktivne elektrofilne vrste. Da bi sparili svoj slobodni elektron i time stvorili stabilan spoj stupaju u reakcije s proteinima, lipidima, ugljikohidratima te nukleinskim kiselinama. Mogu također reagirati i s drugim molekulama reakcijom radikal-radikal dodavanjem ili oduzimanjem elektrona. Reakcije slobodnih radikala s neradikalima obično su lančane reakcije gdje jedan radikal stvara drugi radikal i na taj način pojačava daljnje oštećenje. Izvori slobodnih radikala mogu biti vanjski i unutarnji. Vanjski uzroci obuhvaćaju ionizirajuće zračenje, fotolizu kemijske veze, cigaretni dim s visokim sadržajem slobodnih radikala. Unutarnji uzroci uključuju slučajno i namjerno nastajanje radikala (Čepelak, 2009).

U potencijalno aktivne kisikove vrste (ROS eng. reactive oxygen species) ubrajaju se superoksidni radikal $O_2^{\cdot -}$, hidroksilni radikal $OH^{\cdot}$, alkoksilni radikal $RO^{\cdot}$, hidroperoksilni radikal $HOO^{\cdot}$, peroksil radikal $RO_2^{\cdot}$, peroksinitritni radikal $ONOO^{\cdot}$, singlet kisik O_2, vodikov peroksid H_2O_2, hipoklorna kiselina HOCl i hipobromna kiselina HOBr (Tangvarasittichai, 2015).

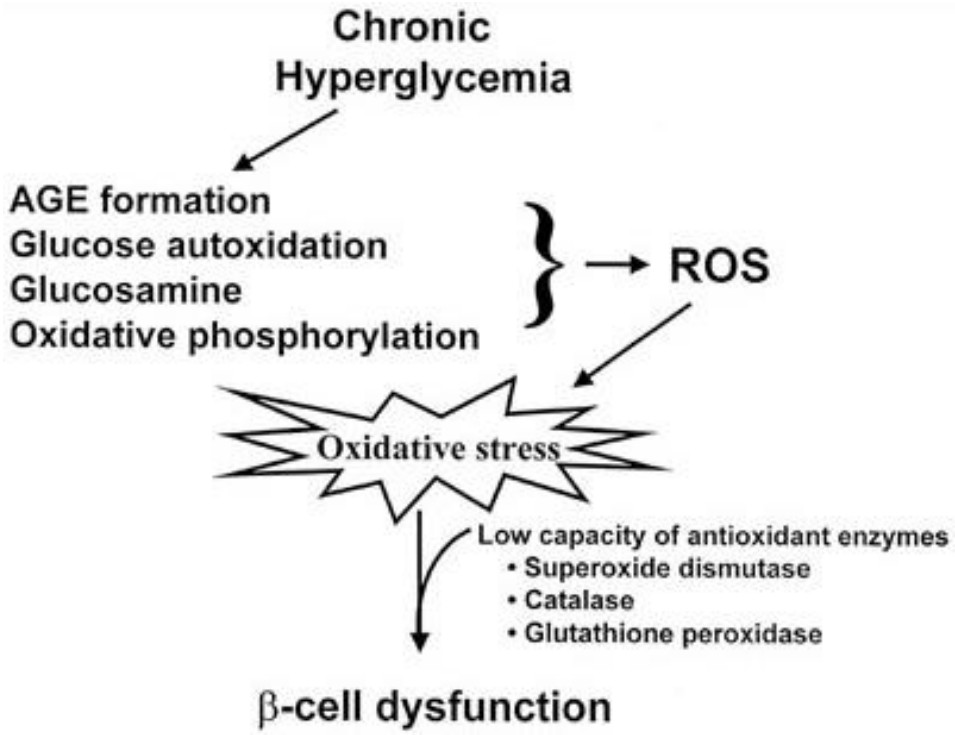


Slika 4. Reakcije nastajanja slobodnih radikala (Izvor: Apel i Hirt, 2004)

1.4. OKSIDATIVNI STRES I ŠEĆERNA BOLEST

Šećerna bolest zahvaća sve organske sustave. U vaskularnom sustavu povišena koncentracija glukoze dovodi do gubitka endotelnih stanica, potiče starenje endotelnih stanica, sprječava angiogenezu, narušava mobilizaciju progenitora endotelnih stanica iz koštane srži što naposlijetku rezultira brojnim vaskularnim bolestima. Akutna i kronična povišenja koncentracije glukoze u krvi mogu rezultirati otpuštanjem reaktivnih kisikovih spojeva (ROS). Neka istraživanja pokazala su da antioksidativni tretman može ublažiti i prevenirati kardiovaskularne komplikacije šećerne bolesti. U staničnim kulturama povišena koncentracija glukoze rezultirala je oksidativnim stresom i oštećenjem kardiomiocita, endotelnih stanica i neurona. Oksidativni stres također rezultira povišenim koncentracijama glutationa i povećanom lipidnom peroksidacijom u životinjskim modelima, jeguljama koje imaju tip 2 šećerne bolesti. Krajnji metaboliti uznapredovale glikacije (advanced glycation end products, AGE) dovode do komplikacija šećerne bolesti i otpuštanja reaktivnih kisikovih spojeva te aktivacije kaspaza. Na staničnoj razini, porodica transportnih proteina (UCP) u unutrašnjoj membrani mitohondrija može značajno utjecati na preživljavanje stanica u šećernoj bolesti. Kod sisavaca postoji nekoliko tipova, UCP1, UCP2, UCP3, UCP4 i UCP5. Ti proteini dovode do raspršenja protonskog elektrokemijskog potencijalnog gradijenta kroz mitohondrijsku unutarnju membranu što rezultira aktivacijom oksidacije supstrata i rasipanjem oksidacijske energije u obliku topline umjesto u obliku ATP-a. Zbog toga se modulira sama sinteza ATP-a, otpuštanje masnih kiselina i oksidacija glukoze. Prekomjerna ekspresija UCP proteina u skeletnim mišićima miša poboljšava odgovor na inzulin, transport glukoze u skeletne mišiće i povećava otpornost na pretilost. UCP3 može stimulirati unos inzulina, olakšati oksidaciju masnih kiselina i limitirati nastanak reaktivnih kisikovih intermedijera. No, nisu svi UCP proteini korisni. Prekomjerna ekspresija UCP2 u izoliranim stanicama gušterače, točnije Langerhansovim otočićima, dovodi do smanjene razine ATP-a i sekrecije inzulina na poticaj glukoze. Tijekom oksidativnog stresa može doći i do mnogobrojnih disfunkcija mitohondrija. Kod osoba koje boluju od tipa 2 šećerne bolesti vidljivi su mitohondriji u mišićnim stanicama koji su manji nego kod kontrolne skupine. Smanjeni mitohondrijski proteini i mitohondrijska DNA u adipocitima također su povezani s razvojem tipa 2 šećerne bolesti. Izlaganje glukolipotoksičnosti β-stanicama Langerhansovih otočića gušterače promovira oksidativni stres i disfunkciju mitohondrija koji dovode do otpuštanja citokroma c, aktivacije kaspaza i u konačnici apoptoze. Disfunkcija mitohondrija dovodi do otvaranja pora i povećane permeabilnosti mitohondrijske membrane, otpuštanja

citokroma c te aktivacije kaspaza. Putevi programirane stanične smrti koji uključuju apoptozu i autofagiju također reguliraju stanično preživljavanje tijekom šećerne bolesti i oksidativnog stresa. Oksidativni stres može značajno negativno utjecati na stanično preživljavanje i dovesti do programirane stanične smrti putem apoptoze ili autofagije. Svjetska zdravstvena organizacija predviđa da će dijabetes mellitus biti sedmi na listi vodećih uzroka smrti do 2030. godine. Rana dijagnoza i odgovarajuća briga za osobe oboljele od dijabetesa važna je za produljenje ljudskog života (Maiese, 2015).



Slika 5. Biokemijski putevi koji su osjetljivi na koncentraciju glukoze u krvi i nastaju ROS (Izvor: Robertson i sur., 2015)

1.5. ANTIOKSIDANSI

Antioksidansi su spojevi koji su prisutni u maloj koncentraciji u odnosu na spoj koji se oksidira, ali usprkos tome znatno odgađaju ili sprječavaju oksidaciju tog spoja. Različiti antioksidansi djeluju zajednički i međusobno surađuju. Njihova glavna uloga je prevencija oksidativnih oštećenja biološkog sustava bez utjecaja na fiziološke funkcije (Čepelak, 2009).

1.5.1. VITAMIN C

Vitamin C ili askorbinska kiselina hidrofilni je antioksidans s važnom ulogom u biološkim oksido-redukcijskim procesima i staničnom disanju. Reducira α-tokoferolni radikal, perokside, superoksidni radikal, hidroksilni radikal te hipoklorit (Čepelak, 2009).

1.5.2. VITAMIN E

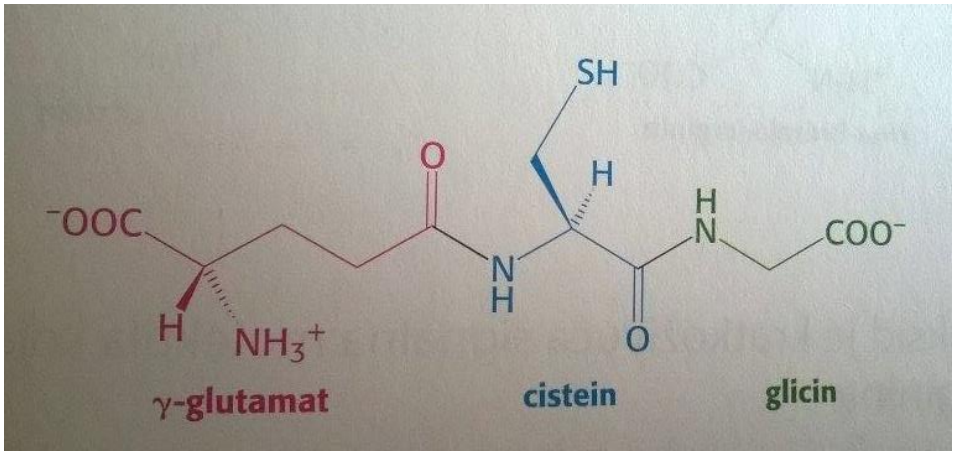
Vitamin E je lipofilni antioksidans kojeg čine α, β, γ i λ-tokoferoli. Sastavni je dio bioloških membrana i lipoproteina u krvi koje štiti od lipidne peroksidacije prekidanjem lančane reakcije nastajanja radikala (Čepelak, 2009).

1.5.3. KAROTENI

Karoteni su također antioksidansi. β-karoten i likopen učinkoviti su hvatači alkoksilnog i peroksilnog radikala (Čepelak, 2009).

1.5.4. REDUCIRANI GLUTATION

Reducirani glutation (γ-glutamilcisteinglicin, GSH) mala je molekula koja također štiti stanice od oksidacijskog oštećenja. To je tripeptid topljiv u vodi sa slobodnom sulfhidrilnom grupom.



Slika 6. Reducirani glutation (Izvor: Berg i sur., 2013)

Kruži između reduciranog tiolnog oblika (GSH) i oksidiranog oblika (GSSG).

$$2\ GSH + RO\text{-}OH \rightleftharpoons GSSG + H_2O + ROH$$

GSSG se reducira u GSH djelovanjem glutation reduktaze. To je flavoprotein koji se kao izvorom elektrona koristi molekulom NADPH.

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{\text{GLUTATION REDUKTAZA}} 2\ GSH + NADP^+$$

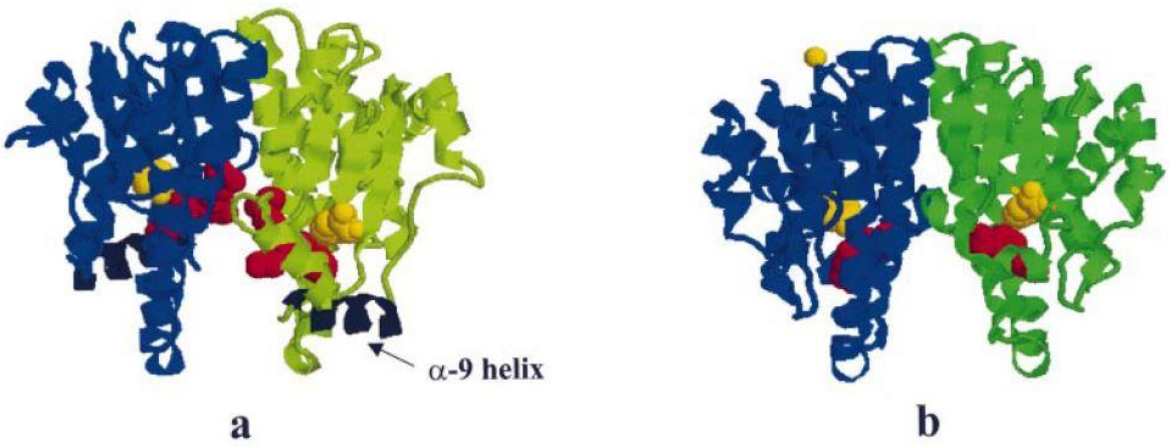
Glutation ima ključnu ulogu u detoksifikaciji jer reagira s vodikovim peroksidom i organskim peroksidima koji su vrlo štetni metaboliti aerobnog života.

$$2\ GSH + H_2O_2 \xrightarrow{\text{GLUTATION PEROKSIDAZA}} 2\ H_2O + GSSG$$

Osim u detoksifikaciji glutation ima važnu ulogu i u ostalim staničnim procesima poput redukcije ribonukleotida u deoksiribonukleotide, regulacije ekspresije proteina i genske ekspresije. Sudjeluje i u transportu aminokiselina kroz staničnu membranu, kofaktor je nekih enzimskih reakcija, sudjeluje u reakcijama konjugacije nekih lijekova. Glutation se de novo sintetizira iz aminokiselina glicina, cisteina i glutaminske kiseline. Sinteza zahtjeva prisutstvo dva enzima, γ-glutamilcistein sintetaze i GSH sintetaze. Biodostupnost cisteina određuje sintezu GSH. Manjak reduciranog oblika glutationa izlaže stanicu opasnosti od oksidativnog stresa. Disbalans GSH proučava se u sklopu mnogih patoloških stanja uključujući tumore, neurodegenerativne bolesti, astmu, bolesti srca, cističnu fibrozu, HIV, bolesti jetre, starenje i drugo (Berg i sur., 2013 i Townsend i sur., 2003).

1.6. GLUTATION-S-TRANSFERAZA

Glutation-S-transferaze (GST) su široko rasprostranjeni enzimi koji se nalaze u bakterijama, gljivicama, biljkama, pticama, ribama i sisavcima. To je vrlo kompleksna porodica enzima uključenih u metabolizam mnogih supstrata. Kataliziraju konjugaciju glutationa (GSH) s velikim brojem hidrofobnih elektrofila stvarajući tioesterske veze. Sudjeluju u prvom koraku nastajanja merkapturne kiseline. Glutation-S-transferaze su dimeri i sastoje se od dvije podjedinice koje neovisno ostvaruju svoju enzimsku aktivnost. Svaka podjedinica ima dvije funkcionalne regije. Hidrofilna regija G veže fiziološki supstrat glutation, a regija H osigurava hidrofobno okruženje za vezanje različitih elektrofilnih supstrata. Regija G vrlo je slična kod svih glutation-S-transferaza dok je regija H vrlo različita kod pojedinih glutation-S-transferaza i pokazuje specifičnost i raznolikost pri vezanju supstrata. Glutation-S-transferaze dijele se na membranski vezane proteine (mikrosomalne) i topljive proteine (citosolne i mitohondrijske). Topljive glutation-S-transferaze kod sisavaca dijele se u 6 razreda: α (alfa), μ (mu), π (pi), θ (theta), ζ (zeta), ω (omega) (Beckett i Hayes, 1993 i Townsed i sur., 2003).



Slika 7. Struktura ljudske α-GST (a) i π-GST (b) (Izvor: Sheehan i sur., 2001)

1.7. SLOBODNE TIOLNE SKUPINE

Slobodne tiolne skupine plazmatskih proteina potječu od cisteinskih aminokiselinskih ostataka i podložne su oksidacijskim promjenama. Nazivaju se još i merkaptani ili sulfhidrili. Slobodne SH-skupine cisteina reverzibilno se oksidiraju pri čemu nastaje cistin (disulfid). Disulfidi se u prisutnosti glutationa reduciraju te se na taj način regeneriraju slobodne SH-skupine. Daljnja oksidacija disulfida dovodi do ireverzibilnih promjena i nastanka cisteinske kiseline.

1.8. *BETULA PENDULA* ROTH (BETULACEAE)

Obična breza (lat. *Betula pendula*) je bjelogorično drvo iz porodice Betulaceae. Raste diljem Europe i Azije. Česta je u našim mezofilnim šumama te nasadima i parkovima. Naraste do visine od 30 m, a u debljinu do 60 cm. Stablo je vitko, a kora bijela i glatka. Na starijim stablima kora ima tamnije pukotine. Lišće je trokutasto ili rombično, 3-7 cm dugo i dvostruko nazubljeno. Jedan od razloga zašto je breza tako rasprostranjena je taj što obilno proizvodi sjeme koje se lako prenosi vjetrom. Čak i danas botaničari ju nazivaju pionirskom vrstom koja među prvima naseljava plodno tlo. Cvijeće se formira u rese i oprašuje vjetrom. Muški izdanci su dugi, opušteni i vise prema dolje, a ženski su kraći, kruti i idu prema gore. Ženski izdanci tijekom faze zorenja otpuštaju sjeme koje se prenosi vjetrom.



Slika 8. Muški i ženski izdanci (Izvor: www.kew.org Wolfgang Stuppy, 2016)

Koristi se za izradu metli i ograda pa sve do proizvodnje ljekovitih preparata. Vino od biljnog soka uzimalo se kao lijek u Velikoj Britaniji, dok se kora koristila u Irskoj za liječenje kožnih bolesti. Danas se lišće i kora najviše koriste zbog svojih diuretskih svojstava. Jedan od glavnih sastojaka kore je betulinska kiselina koja je pokazala aktivnost protiv kancerogenih stanica i HIV-a (www.kew.org).

Ljekovita svojstva kore i ekstrakti iz kore već se godinama koriste u tradicionalnoj medicini u različitim dijelovima svijeta. Nekoliko vrsta iz te porodice tradicionalno se koriste za liječenje raznih upalnih bolesti uključujući i artritis. Može se naći preko 100 vrsta te biljke u svijetu, ali samo 7 vrsta poznato je u tradicionalnoj upotrebi. Sirovi ekstrakti, dijelovi i fitokemijski konstituenti izolirani iz te biljke pokazuju široki spektar in vitro i in vivo farmakološke aktivnosti poput imunomodulacijskih, antiupalnih, antimikrobnih, antivirusnih, antioksidativnih, antidijabetskih, dermatoloških, gastroprotektivnih i hepatoprotektivnih učinaka. Antiartritisni i antikancerogeni učinci su dva najistraživanija područja. Najviše se istražuju kora te spojevi betulin i betulinska kiselina i njihov antikancerogeni učinak (Rastogi i sur., 2014).

1.8.1. KEMIJSKE SASTAVNICE

Vodeni ekstrakt lista biljke *Betula pendula* sadrži flavonoide, fenole i fenolne kiseline (Bljajić i sur., 2016).

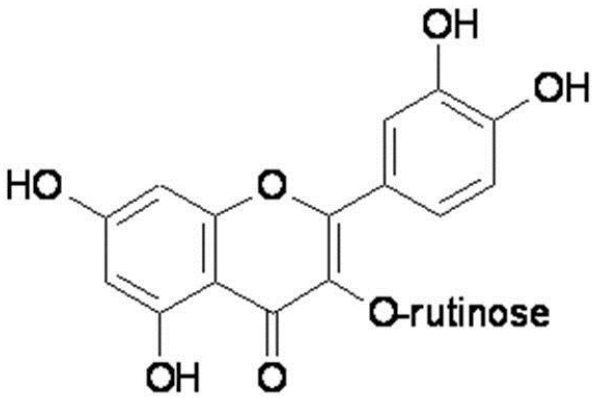
Flavonoidi su skupina prirodnih spojeva fenolne strukture koji se nalaze u voću, povrću, žitaricama, kori, korijenu, stabljikama, cvijeću, čaju i vinu. Identificirano je više od 4000 flavonoida od kojih su mnogi odgovorni za raznolike boje cvijeća, voća i lišća. Još 1930. godine iz naranči je izoliran novi spoj za kojeg se vjerovalo da je član nove skupine vitamina i nazvan je vitamin P. Tek je kasnije postalo jasno da je to flavonoid rutin. Flavonoidi mogu, na različite načine, spriječiti ozljedu nastalu djelovanjem slobodnih radikala (Nijveldt i sur., 2001).

HPLC fitokemijska analiza potvrdila je da je glavna sastavnica u vodenom ekstraktu lista biljke *Betula pendula* flavonoid rutin dok su ostale komponente prisutne u nižim koncentracijama. U prijašnjim studijama otkriveno je da su flavonoidi u listu biljke *Betula pendula* derivati miricetina, quercetina, kaempferola, apigenina i luteolina. Postoje 3 glavna pretpostavljena mehanizma antioksidativnog djelovanja. To su prijenos atoma vodika,

prijenos jednog elektrona i kelacija metala. Udio pojedinog mehanizma u ukupnom antioksidativnom učinku ekstrakta biljke ovisi o brojnim utjecajima pa je zbog toga potrebno koristiti više metoda za analizu antioksidativne učinkovitosti prirodnih ekstrakata (Bljajić i sur., 2016).

1.8.2. RUTIN

Rutin je flavonoid nađen u mnogim biljkama. Ima antioksidativnu i metal kelirajuću aktivnost. U streptozotocin-induciranim modelima dijabetesa pokazuje neuroprotektivne i kardioprotektivne učinke (Bljajić i sur., 2016).



Slika 9. Kemijska struktura rutina (Izvor: Al-Dhabi i sur., 2015)

Rutin ima široki farmakološki učinak istraživan u području medicine i nutricionizma. Koristi se kao antimikrobni, antifungalni i antialergijski spoj. Nedavna istraživanja pokazala su njegov širok spektar djelovanja u tretmanu brojnih kroničnih bolesti kao što su karcinom, dijabetes, hipertenzija i hiperkolesterolemija. Rutin pokazuje značajni antidijabetski učinak. Inhibira upalne citokine i poboljšava antioksidativni i lipidni profil u modelima kod kojih je dijabetes tipa 2 izazvan dijetom s visokim unosom masnoća i streptozotocinom. Zbog toga se smatra da bi rutin mogao biti koristan kao modulator dijabetesa u kombinaciji sa standardnim antidijabeticima. Rutin je i potencijalni spoj za kontrolu glikemije jer poboljšava aktivnost inzulin-ovisne receptorske kinaze i na taj način inducira inzulinski signalni put koji dovodi do povećane translokacije transportera glukoze (GLUC 4) i povećanog ulaska glukoze u stanice (Al-Dhabi i sur., 2015).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Oksidativni stres povezan je s patogenezom dijabetesa i njegovim komplikacijama. U oba tipa dijabetesa snižene su koncentracije tiolnih skupina kao i kod pacijenata s komplikacijama dijabetesa tipa 2 (Prakash i sur., 2009).

Glikacija antioksidativnih enzima uzrokuje smanjenje njihove aktivnosti što dovodi do smanjene eliminacije superoksidnih radikala i još veće podložnosti tkiva oksidativnom stresu.

Cilj ovog istraživanja je ispitivanje antioksidativnog učinka vodenog ekstrakta lista biljke *Betula pendula* u različitim koncentracijama (0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml i 0,5 mg/ml) u Hep G2 stanicama u hiperglikemijskim uvjetima. U znanstvenoj litaraturi nema podataka o antioksidativnom učinku vodenog ekstrakta lista biljke *Betula pendula* pa je upravo zbog toga postala predmetom ovog istraživanja.

Oksidativni stres u Hep G2 stanicama izazvan je tretiranjem stanica s 30 mM otopinom glukoze.

Spektrofotometrijskim metodama određivane su koncentracije glutationa i slobodnih tiolnih skupina te aktivnost enzima glutation-S-transferaze u staničnom lizatu Hep G2 stanica.

Koncentracije glutationa i slobodnih tiolnih skupina izražene su u μM, a aktivnost enzima glutation-S-transferaze u U/L.

Rezultati su statistički obrađeni u statističkom programu MedCalc 14.8. i Microsoft Office Excel-u 2010.

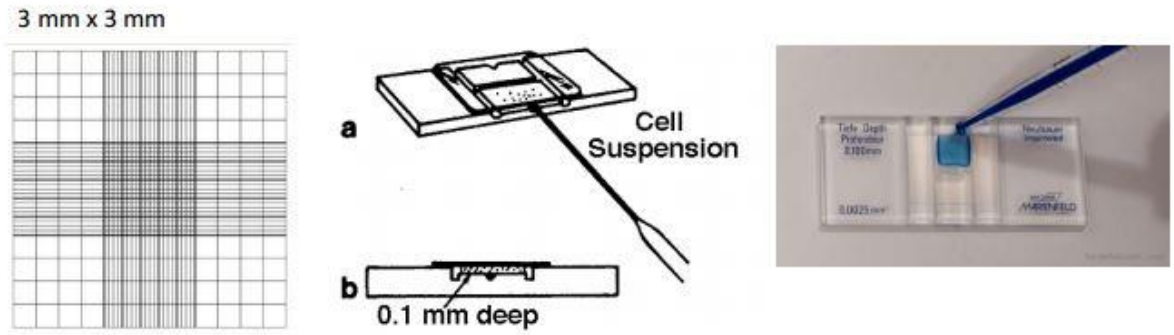
3. MATERIJALI I METODE

3.1. HEP G2 KULTURA STANICA

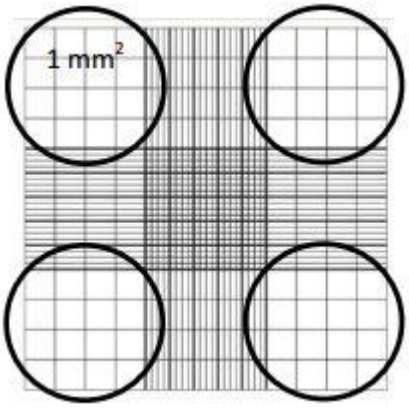
Hep G2 stanice su humane, epitelne stanice hepatocelularnog karcinoma. Morfološki, to su stanice zalijepljenje za podlogu. Kultiviraju se u kompletnom, hranjivom MEM mediju (eng. Minimum Essential Medium) uz dodatak 10%-tnog FBS (eng. Fetal Bovine Serum), 1%-tnog antibiotika-antimikotika, 1%-tnog natrijeva piruvata i 1%-tnih neesencijalnih aminokiselina. Stanice rastu u inkubatoru na 37°C s 5%-tnim CO2 i relativnom vlažnosti od 95%. Prilikom zamrzavanja stanica medij čine 95% kompletni medij bez antibiotika-antimikotika te 5% DMSO (dimetil sulfoksid).

Prilikom početka rada stanice se odmrzavaju naglo u vodenoj kupelji na 37°C. Sadržaj netom odmrznute ampulice prebaci se u 10 ml kompletnog medija i centrifugira 10 minuta na 1100 okretaja u minuti. Supernatant bacimo, a stanice resuspendiramo u 10 ml kompletnog medija i brojimo. Za brojanje stanica u epruveti pomiješamo 50 µl suspenzije stanica i 50 µl 0,04%-tne otopine boje triptan plavo te ostavimo da stoji 10 minuta na sobnoj temperaturi. Stanice se broje u Bürker-Turkovoj komori pod svjetlosnim mikroskopom. Žive stanice ostaju neobojene, dok se one mrtve oboje plavo. Vijabilnost se izražava kao postotak živih stanica u ukupnom broju stanica.

(UKUPAN BROJ STANICA U 4 VELIKA KVADRANTA/4) X 10000 X 2 = BROJ STANICA/ML



Slika 10. Shematski prikaz i fotografija Bürker-Türkove komorice



Slika 11. Princip brojanja stanica

U prvom sađenju stanice sadimo malo gušće. Prema broju stanica računamo koji nam je volumen potreban da bi nasadili 4 x 10^6 stanica. Stanice stavljamo u inkubator pod prethodno navedenim uvjetima i promatramo sljedeći dan.

Pri rasađivanju stanica prvo ih ispiremo s 5 ml otopine EDTA. Nakon toga dodajemo 2-3 ml tripsina i inkubiramo koliko je potrebno da se stanice odlijepe. Obično je to vrijeme od 5-10 minuta što promatramo pod svjetlosnim mikroskopom. Tikvici dodamo 6-8 ml medija s 10%-tnim FBS, lagano propipetiramo i prebacimo u 10 ml falkonicu. Centrifugiramo 10 minuta na 1100 okretaja u minuti. Talog stanica resuspendiramo u mediju i brojimo ih na prethodno opisani način. Prema protokolu od ATCC (eng. American Type Culture Collection) stanice se rasađuju u omjeru 1:4 do 1:6.

3.2. TRETIRANJE STANICA GLUKOZOM I VODENIM EKSTRAKTOM LISTA BILJKE *BETULA PENDULA*

Prilikom eksperimenta promatrano je 5 skupina uzoraka. Prva je bila kontrolna skupina s netretiranim Hep G2 stanicama. Druga je bila skupina Hep G2 stanica tretiranih glukozom kako bi bile u hiperglikemijskim uvjetima poput osoba oboljelih od dijabetesa. Sljedeće tri skupine uzoraka bile su Hep G2 stanice u hiperglikemijskim uvjetima i tretirane vodenim ekstraktom lista biljke *Betula pendula* u tri različite koncentracije od 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml i 0,5 mg/ml koji je napravljen u Zavodu za farmakognoziju.

3.3. ODREĐIVANJE GLUTATIONA U LIZATU HEP G2 STANICA

Pri određivanju glutationa koristi se Ellmanov reagens. Proteini iz uzorka prvo se talože s 5%-tnom trikloroctenom kiselinom. 300 µl seruma pomiješa se s 100 µl 5%-tne trikloroctene kiseline te se centrifurira na 3000 okretaja u minuti tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. U daljnji postupak uzima se nadsloj.

POSTUPAK:

	PROBA	**SLIJEPA PROBA**
NADSLOJ	100 µl	-
Na-FOSFATNI PUFER	600 µl	600 µl
DTNB	50 µl	50 µl
VODA	-	100 µl

Sadržaj epruveta dobro se promiješa i apsorbancija mjeri na 412 nm prema slijepoj probi.

RAČUN:

GLUTATION (µM) = A x $\frac{V\ x\ 10^6}{v\ x\ \varepsilon\ x\ b}$

GLUTATION (µM) = A x $\frac{0{,}75\ ml\ x\ 10^6}{0{,}1\ ml\ x\ 14150\ cm^{-1}M^{-1} x\ 1\ cm}$

GLUTATION (µM) = A x 530 µM

ε-molarni koeficijent apsorbancije (14 150 $cm^{-1}M^{-1}$)

b-debljina kivete (1 cm)

V-ukupni volumen reakcijske smjese (0,75 ml)

v-volumen ispitivanog uzorka (0,1 ml)

10^6-faktor za preračunavanje M u µM

A-apsorbancija probe na 412 nm

3.4. ODREĐIVANJE SLOBODNIH TIOLNIH SKUPINA U LIZATU HEP G2 STANICA

Za određivanje slobodnih tiolnih skupina koristi se također Ellmanov reagens (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina ili DTNB). U reakciji DTNB s tiolnim skupinama oslobađa se 2-nitro-5-merkaptobenzojeva kiselina (TNB) i nastaju miješani disulfidi. TNB u vodenoj sredini pri alkalnom i neutralnom pH ionizira u žuto obojeni anion TNB^-. Reakcija se odvija brzo i jedan mol tiola oslobađa jedan mol TNB. Oslobođeni TNB^- određuje se spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 412 nm.

POSTUPAK:

	PROBA (A)	**SLIJEPA PROBA REAGENSA (B)**	**SLIJEPA PROBA UZORKA (C)**
SERUM	50 µl	-	50 µl
VODA	-	50 µl	10 µl
TRIS-EDTA PUFER	150 µl	150 µl	150 µl
DTNB	10 µl	10 µl	-
APSOLUTNI METANOL	790 µl	790 µl	790 µl

Sadržaj epruveta dobro se promiješa i inkubira 20 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim se centrifugira na 3000 g tijekom 10 minuta također na sobnoj temperaturi.

Apsorbancija nadsloja mjeri se na 412 nm prema destiliranoj vodi.

RAČUN:

SH SKUPINE (mM) = (A-B-C) x $\frac{V\ x\ 10^3}{v\ x\ \varepsilon\ x\ b}$

SH SKUPINE (mM) = (A-B-C) x $\frac{1\ ml\ x\ 10^3}{0{,}05\ ml\ x\ 13600\ cm^{-1}M^{-1} x\ 1\ cm}$

SH SKUPINE (mM) = (A-B-C) x 1,47 mM

ε-molarni koeficijent apsorbancije (13 600 $cm^{-1}M^{-1}$)

b-debljina kivete (1 cm)

V-ukupni volumen reakcijske smjese (1 ml)

v-volumen ispitivanog uzorka (0,05 ml)

10^3-faktor za preračunavanje M u mM

A-apsorbancija probe na 412 nm

B-apsorbancija slijepe probe reagensa na 412 nm

C-apsorbancija slijepe probe uzorka na 412 nm

3.5. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI GLUTATION-S-TRANSFERAZE U LIZATU HEP G2 STANICA

Katalitička koncentracija GST u serumu određuje se spektrofotometrijskom metodom. Mjerenje se temelji na konjugaciji reduciranog glutationa s CDNB (1-klor-2,4-dinitrobenzen). Prvi je korak ionizacija reduciranog glutationa u proton i tiolni anion. Drugi je korak nukleofilni napad tiolnog aniona na C-1 atom aromatskog prstena CDNB. Treći je korak nastajanje Meseneimerovog kompleksa iz kojeg nastaje 1-(S-glutationil)-2,4-dinitrobenzen (GS-DNB) koji ima maksimum apsorpcije pri valnoj duljini od 340 nm. Rast apsorbancije proporcionalan je katalitičkoj koncentraciji GST u uzorku. Mjerenje apsorbancije vrši se pri temperaturi od 37°C na 340 nm, a katalitička koncentracija GST izražava se u IU/L što odgovara transformaciji 1 μmola supstrata u produkt u 1 minuti pri 37°C.

CDNB se priprema tako da se 0,0506 g otopi u 5 ml apsolutnog etanola. Kad se otopi doda se 5 ml destilirane vode i drži se na sobnoj temperaturi. Ako se pojave kristali stavi se na 30 minuta u kupelj na 50°C da se otope. Čuva se u tamnoj bočici zaštićeno od svjetla.

GSH se priprema otapanjem 0,1536 g reduciranog GSH u 10 ml destilirane vode. Drži se na +4°C, a prije analize vadi na sobnu temperaturu da se istemperira. Čuva se također u tamnoj bočici zaštićeno od svjetla.

POSTUPAK:

	SLIJEPA PROBA	**UZORAK**
PUFER	800 µl	700 µl
CDNB	100 µl	100 µl
GSH	100 µl	100 µl
SERUM	-	100 µl

Mjerenje se vrši spektrofotometrijski na instrumentu Trace 300 na 340 nm i 37°C.

Porast apsorbancije mjeri se tijekom 75 sekundi u pet intervala po 15 sekundi i izračuna ΔA/min.

RAČUN:

IU/L = $\frac{\Delta A/min}{\varepsilon \, x \, b}$ x 10^{6} x $\frac{V}{v}$

ε-molarni koeficijent apsorbancije CDNB (9 600 l/mol cm)

b-debljina kivete (1 cm)

V-ukupni volumen reakcijske smjese (1 ml)

v-volumen ispitivanog uzorka (0,1 ml)

10^{6}-faktor koji prevodi odgovor u µmol/min/l (IU/l)

KONAČNA FORMULA:

IU/L = $\frac{\Delta A/min}{0{,}0096}$ x 10

3.6. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

Iz dobivenih rezultata izračunate su srednje vrijednosti i standardne devijacije za određivane parametre. Podatci su statistički obrađeni u statističkom programu MedCalc 14.8. i Microsoft Office Excel-u 2010. Tražila se statistički značajna razlika između skupina C i D, D/0,05 BP i D, D/0,1 BP i D te D/0,5 BP i D. Za to je primijenjen Studentov t-test za nezavisne uzorke. P vrijednost < 0,05 smatra se statistički značajnom vrijednošću jer se tada s 95%-tnom sigurnošću može reći da je razlika u rezultatima između dvije skupine signifikantna.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. REZULTATI

Sva mjerenja vršena su u triplikatu. Izračunate vrijednosti koncentracije glutationa i slobodnih tiolnih skupina te aktivnosti enzima glutation-S-transferaze prikazane su tabelarno. Statističkom obradom dobivene su srednje vrijednosti i standardne devijacije (S.D.).

Tablica 1. Koncentracija glutationa (μM) u Hep G2 stanicama

	C	**D**	**D/0,05 BP**	**D/0,1 BP**	**D/0,5 BP**
1	44,52	39,22	43,99	39,22	37,63
2	43,99	36,57	46,64	41,87	37,63
3	41,87	34,98	40,28	41,34	36,57
SREDNJA VRIJEDNOST	43,46	36,92	43,64	40,81	37,28
S.D.	1,40	2,14	3,19	1,40	0,61
P-VRIJEDNOST D U USPOREDBI S C	**0,0115**				
P-VRIJEDNOST D/0,05 BP, D/0,1 BP, D/0,5 BP U USPOREDBI S D			**0,0390**	0,0582	0,7971

C- kontrolni uzorak s netretiranim Hep G2 stanicama

D-Hep G2 stanice tretirane glukozom

D/0,05 BP- Hep G2 stanice tretirane glukozom i 0,05 mg/ml vodenim ekstraktom lista biljke *Betula pendula*

D/0,1 BP- Hep G2 stanice tretirane glukozom i 0,1 mg/ml vodenim ekstraktom lista biljke *Betula pendula*

D/0,5 BP- Hep G2 stanice tretirane glukozom i 0,5 mg/ml vodenim ekstraktom lista biljke *Betula pendula*

Tablica 2. Koncentracija slobodnih tiolnih skupina (μM) u Hep G2 stanicama

	C	D	D/0,05 BP	D/0,1 BP	D/0,5 BP
1	58,66	43,81	43,81	38,16	39,57
2	59,36	43,81	43,81	38,87	38,87
3	58,66	43,81	41,69	40,28	39,57
SREDNJA VRIJEDNOST	58,89	43,81	43,1	39,1	39,34
S.D.	0,40	0,00	1,22	1,08	0,40
P-VRIJEDNOST D U USPOREDBI S C	**0,0001**				
P-VRIJEDNOST D/0,05 BP, D/0,1 BP, D/0,5 BP U USPOREDBI S D			0,3739	**0,0016**	**0,0001**

C- kontrolni uzorak s netretiranim Hep G2 stanicama

D-Hep G2 stanice tretirane glukozom

D/0,05 BP- Hep G2 stanice tretirane glukozom i 0,05 mg/ml vodenim ekstraktom lista biljke *Betula pendula*

D/0,1 BP- Hep G2 stanice tretirane glukozom i 0,1 mg/ml vodenim ekstraktom lista biljke *Betula pendula*

D/0,5 BP- Hep G2 stanice tretirane glukozom i 0,5 mg/ml vodenim ekstraktom lista biljke *Betula pendula*

Tablica 3. Aktivnost glutation-S-transferaze (U/L) u Hep G2 stanicama

	C	**D**	**D/0,05 BP**	**D/0,1 BP**	**D/0,5 BP**
1	35,42	35,42	36,46	40,62	38,54
2	34,37	35,42	36,46	33,33	35,42
3	38,54	35,42	38,54	33,33	37,5
SREDNJA VRIJEDNOST	36,11	35,42	37,15	35,76	37,15
S.D.	2,17	0,00	1,20	4,21	1,59
P-VRIJEDNOST D U USPOREDBI S C	0,6110				
P-VRIJEDNOST D/0,05 BP, D/0,1 BP, D/0,5 BP U USPOREDBI S D			0,0668	0,8955	0,1318

C- kontrolni uzorak s netretiranim Hep G2 stanicama

D-Hep G2 stanice tretirane glukozom

D/0,05 BP- Hep G2 stanice tretirane glukozom i 0,05 mg/ml vodenim ekstraktom lista biljke *Betula pendula*

D/0,1 BP- Hep G2 stanice tretirane glukozom i 0,1 mg/ml vodenim ekstraktom lista biljke *Betula pendula*

D/0,5 BP- Hep G2 stanice tretirane glukozom i 0,5 mg/ml vodenim ekstraktom lista biljke *Betula pendula*

4.2. RASPRAVA

Ljekovita svojstva biljke *Betula pendula* Roth (Betulaceae) poznata su već dugo vremena diljem svijeta, a ovo je prvo istraživanje koje se bavi ispitivanjem njenog antioksidativnog učinka.

Oksidativni stres i stvaranje slobodnih radikala imaju važnu ulogu u šećernoj bolesti i razvoju njenih komplikacija. Perzistentna hiperglikemija dovodi do povećanog stvaranja slobodnih radikala i drugih reaktivnih kisikovih vrsta, a time i do razvoja kasnih komplikacija šećerne bolesti. Količina antioksidativnih enzima kao što je glutation-S-transferaza, ali i samog glutationa i slobodnih tiolnih skupina utječe na podložnost pojedinih tkiva oksidativnom stresu. Produkcija reaktivnih kisikovih spojeva povećana je općenito kod osoba koje boluju od šećerne bolesti, a posebice kod onih s lošom kontrolom bolesti. U posljednjem desetljeću značajno je poraslo razumijevanje mehanizama oksidativnog stresa kao i njegovog štetnog učinka na tkiva. Prva linija obrane tkiva od oksidativnog stresa su upravo antioksidativni enzimi pa su zbog toga postali predmet sve više istraživanja. U hiperglikemijskim uvjetima dolazi do glikacije proteina pa tako i antioksidativnih enzima što smanjuje njihovu katalitičku aktivnost, a time i antioksidativni učinak (Tangvarasittichai, 2015).

Betula pendula dokazano je korisna u tretmanu degenerativnih bolesti zglobova, a postoje i eksperimentalni dokazi na životinjama koji pokazuju njene antikarcinogene učinke. Antioksidativni učinci nisu do sada eksperimentalno dokazani pa je to sve više predmet budućih istraživanja (Rastogi i sur., 2014).

U tradicionalnoj upotrebi koriste se gotovo svi dijelovi biljke. Listovi i pupoljci sadrže saponin, tanine, eterična ulja, saharozu, betulin, smole i vitamin C. Listovi biljke smanjuju koncentraciju kolesterola u krvi, liječe srčane edeme uzrokovane oslabljenom cirkulacijom, arterijskom hipertenzijom i aterosklerozom. Preporučuje se i u liječenju gripe, prehlade i kroničnih upala sinusa. Snizuje povišenu tjelesnu temperaturu, ublažava glavobolje i jača imunosni sustav (alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/breza).

U službenoj fitoterapiji danas se koriste listovi koji djeluju kao snažan diuretik i antiseptik. Potiču mokrenje 5-6 puta više od prosjeka, djeluju kao dezinficijens mokraćnih puteva te tako pomažu kod bolesti bubrega, mjehura, pojave mokraćnih kamenaca te drugih bolesti poput gihta gdje poticanje mokrenja ima povoljan učinak (www.plantea.com.hr/breza/).

U ovom istraživanju ispitan je antioksidativni učinak vodenog ekstrakta lista biljke *Betula pendula* u širokom rasponu koncentracija na Hep G2 stanice u hiperglikemijskim uvjetima. Koncentracije vodenog ekstrakta lista biljke *Betula pendula* iznosile su 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml i 0,5 mg/ml. Promatrano je 5 skupina stanica. Prva skupina bila je kontrolna skupina koju su činile netretirane Hep G2 stanice. Druga skupina bile su Hep G2 stanice tretirane 30 mM otopinom glukoze kako bi se izazvali hiperglikemijski uvjeti i oksidativni stres u stanicama. Sljedeće tri skupine bile su skupine tretirane različitim koncentracijama vodenog ekstrakta lista biljke *Betula Pendula*. Koncentracije glutationa i slobodnih tiolnih skupina kao i aktivnost enzima glutation-S-transferaze određene su spektrofotometrijskim metodama.

Kod stanica tretiranih samo 30 mM otopinom glukoze uočen je statistički značajan pad koncentracija glutationa (P=0,0115) i slobodnih tiolnih skupina (P=0,0001) dok za glutation-S-transferazu nije uočen statistički značajan pad aktivnosti (P=0,6110) u odnosu na kontrolnu skupinu stanica. U stanicama tretiranim 30 mM otopinom glukoze i 0,05 mg/ml vodenim ekstraktom lista biljke *Betula pendula* uočen je statistički značajan rast koncentracije glutationa (P=0,0390), ali ne i slobodnih tiolnih skupina (P=0,3739) u odnosu na skupinu stanica tretiranih samo 30 mM otopinom glukoze. Rast aktivnosti glutation-S-transferaze u stanicama tretiranim 30 mM otopinom glukoze i 0,05 mg/ml vodenim ekstraktom lista biljke *Betula pendula* nije statistički značajan (P=0,0668) u odnosu na skupinu stanica tretiranim samo 30 mM otopinom glukoze. U stanicama tretiranim 30 mM otopinom glukoze i 0,1 mg/ml vodenim ekstraktom lista biljke *Betula pendula* nije uočen statistički značajan rast koncentracija glutationa (P=0,0582), ali je uočen statistički značajan pad koncentracije slobodnih tiolnih skupina (P=0,0016) u odnosu na skupinu stanica tretiranih samo 30 mM otopinom glukoze. Rast aktivnosti glutation-S-transferaze u stanicama tretiranim 30 mM otopinom glukoze i 0,1 mg/ml vodenim ekstraktom lista biljke *Betula pendula* nije statistički značajan (P=0,8955) u odnosu na skupinu stanica tretiranim samo 30 mM otopinom glukoze. U stanicama tretiranim 30 mM otopinom glukoze i 0,5 mg/ml vodenim ekstraktom lista biljke *Betula pendula* nije uočen statistički značajan rast koncentracija glutationa (P=0,7971), ali je opet uočen statistički značajan pad slobodnih tiolnih skupina (P=0,0001) u odnosu na skupinu stanica tretiranim samo 30 mM otopinom glukoze. Rast aktivnosti glutation-S-transferaze u stanicama tretiranim 30 mM otopinom glukoze i 0,5 mg/ml vodenim ekstraktom lista biljke *Betula pendula* nije statistički značajan (P=0,1318) u odnosu na skupinu stanica tretiranim samo 30 mM otopinom glukoze.

Antioksidativni učinak vidljiv je kod 0,05 mg/ml vodenog ekstrakta lista biljke *Betula pendula* gdje je uočen statistički značajan porast koncentracije glutationa. Gledajući statistički značajne rezultate pojedinih koncentracija vodenog ekstrakta lista biljke *Betula pendula* nije povećana aktivnost glutation-S-transferaze niti u jednoj od ispitivanih koncentracija.

5. ZAKLJUČCI

1) U ovome radu ispitan je antioksidativni učinak vodenog ekstrakta lista biljke *Betula pendula* u različitim koncentracijama (0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml i 0,5 mg/ml) određivanjem nekoliko parametara na kulturi Hep G2 stanica u hiperglikemijskim uvjetima. To su koncentracije glutationa i slobodnih tiolnih skupina te aktivnost glutation-S-transferaze.
2) Antioksidativni učinak u Hep G2 stanicama, u kojima je oksidativni stres izazvan tretiranjem stanica s 30 mM otopinom glukoze procijenjen je mjerenjem koncentracije glutationa i slobodnih tiolnih skupina te aktivnosti glutation-S-transferaze i usporedbom dobivenih rezultata između skupine stanica koje su tretirane samo 30 mM otopinom glukoze i skupina stanica koje su tretirane 30 mM otopinom glukoze i različitim koncentracijama vodenog ekstrakta lista biljke *Betula pendula*.
3) Uočen je statistički značajan pad koncentracija glutationa (P=0,0115) i slobodnih tiolnih skupina (P=0,0001) kod stanica tretiranih samo 30 mM otopinom glukoze (D) u odnosu na kontrolni uzorak stanica (C).
4) Nije uočen statistički značajan pad aktivnosti glutation-S-transferaze (P=0,6110) kod stanica tretiranih samo 30 mM otopinom glukoze (D) u odnosu na kontrolni uzorak stanica (C).
5) Uočen je statistički značajan porast koncentracije glutationa u stanicama tretiranim 30 mM otopinom glukoze i 0,05 mM vodenim ekstraktom lista biljke *Betula pendula* (D/0,05 BP) u odnosu na skupinu stanica tretiranim samo 30 mM otopinom glukoze (D).
6) Uočen je statistički značajan pad slobodnih tiolnih skupina u stanicama tretiranim 30 mM otopinom glukoze i 0,1 mM vodenim ekstraktom lista biljke *Betula pendula* (D/0,1 BP) te 0,5 mM vodenim ekstraktom lista biljke *Betula pendula* (D/0,5 BP) u odnosu na skupinu stanica tretiranim samo 30 mM otopinom glukoze (D).
7) Niti u jednoj od ispitivanih koncentracija vodenog ekstrakta lista biljke *Betula pendula* nije uočen statistički značajan porast aktivnosti glutation-S-transferaze u odnosu na skupinu stanica tretiranim samo 30 mM otopinom glukoze (D).
8) U ovome radu pokazan je antioksidativni učinak vodenog ekstrakta lista biljke *Betula pendula* samo u niskoj koncentraciji (0,05 mg/ml) dok visoke koncentracije mogu imati prooksidativno djelovanje.

6. LITERATURA

Abdullah Al-Dhabi N, Valan Arasu M, Ha Park C, Un Park S. An up-to-date review of rutin and its biological and pharmacological activities. *EXCLI J*, 2015, 14: 59-63.

Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 373-99.

Betula pendula (silver birch), 2016., http://www.kew.org/science-conservation/plants-fungi/betula-pendula-silver-birch, pristupljeno 16.05.2016.

Bljajić K, Šoštarić N, Petlevski R, Vujić L, Brajković A, Fumić B, Saraiva de Carvalho I, Zovko Končić M. Effect of Betula pendula leaf extract on α-glucosidase and glutathione level in glucose-induced oxidative stress. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.

Breza, www.plantea.com.hr/breza/, pristupljeno 10.11.2016.

Breza-drvo koje liječi, alternativa-za-vas.com/index.php/clanak/article/breza, pristupljeno 10.11.2016.

CroDiab izvještaj za 2014. godinu, 2016., http://www.idb.hr/CroDiab_2014.pdf, pristupljeno 16.05.2016.

Čepelak I. Slobodni radikali i antioksidansi. U: Štrausova Medicinska biokemija. Štraus B, urednik, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 638-648.

Diabetes Programme. Diabetes country profiles, 2016., http://www.who.int/diabetes/en/, pristupljeno 16.05.2016.

J Beckett G, D Hayes J. Glutathione S-transferases: biomedical applications. U: Advances in clinical chemistry. Scotland, University of Dundee, 1993, str. 282-289.

J Nijveldt R, van Nood E, EC van Hoorn D, G Boelens P, van Norren K, AM van Leeuwen P. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr,* 2001, 74: 418-25.

M Berg J, L Tymoczko J, Stryer L. Biokemija. Zagreb, Školska knjiga, 2013, str. 586. i 701.

M Townsend D, D Tew K, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Elsevier Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2003, 57: 145-155.

Maiese K. New insights for oxidative stress and diabetes mellitus. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.

Odsjek za dijabetes s registrom osoba sa šećernom bolesti, http://www.hzjz.hr/sluzbe/sluzba-za-epidemiologiju/odjel-za-nadzor-i-istrazivanje-ne-zaraznih-bolesti/odsjek-za-dijabetes-s-registrom-osoba-sa-secernom-bolesti/, pristupljeno 02.06.2016.

Prakash M, S Shetty M, Tilak P, Anwar N. Total thiols: Biomedical importance and their alteration in various disorders. *Ojhas*, 2009, 8 (2): 2.

Rastogi S, Pandey MM, Kumar Singh Rawat A. Medical plants of the genus Betula-traditional uses and a phytochemical-pharmacological review. *Elsevier Ireland,* 2014.

R Robertson P, Harmon J, Oanh Tran P, Tanaka Y, Takahashi H. Glucose toxicity in β-cells: Type 2 diabetes, good radicals gone bad and the glutathione connection. *Diabetes,* 2003, 52 (3): 581-587.

Sheehan D, Meade G, M Foley V, A Dowd C. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J*, 2001, 360: 1-16.

Štraus B, Petlevski R. Ugljikohidrati. U: Štrausova Medicinska biokemija. Štraus B, urednik, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 112-118.

T Kharroubi A, M Darwish H. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes*, 2015, 6 (6): 850-867.

Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*, 2015, 6 (3): 456-480.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Šećerna bolest je kronični metabolički sindrom karakteriziran kroničnom hiperglikemijom koji nastaje zbog relativnog i/ili apsolutnog manjka inzulina. Oksidativni stres dovodi do oštećenja makromolekula i DNA što uzrokuje disfunkciju stanica i oštećenje tkiva. Povećani oksidativni stres faktor je koji u konačnici dovodi do razvoja šećerne bolesti tipa 2. Neka istraživanja pokazala su da antioksidativni tretman može prevenirati, ali i ublažiti kardiovaskularne komplikacije šećerne bolesti. Obična breza (lat. *Betula pendula*) je bjelogorično drvo koje raste diljem Europe i Azije. U tradicionaloj medicini diljem svijeta već se godinama koriste ekstrakti iz kore i ljekovita svojstva kore. U znanstvenoj literaturi nema podataka o antioksidativnom učinku vodenog ekstrakta lista biljke *Betula pendula* pa je cilj ovog istraživanja bilo ispitivanje tog učinka. Vodeni ekstrakt lista biljke *Betula pendula* sadrži flavonoide, fenole i fenolne kiseline. HPLC fitokemijska analiza potvrdila je da je glavna sastavnica u vodenom ekstraktu lista biljke *Betula pendula* flavonoid rutin dok su ostale komponente prisutne u nižim koncentracijama. U eksperimentu je korištena Hep G2 kultura stanica. To su humane, epitelne stanice hepatocelularnog karcinoma. Oksidativni stres izazvan je tretiranjem stanica s 30 mM otopinom glukoze. Koncentracije vodenog ekstrakta lista biljke *Betula pendula* iznosile su 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml i 0,5 mg/ml. Spektrofotometrijskim metodama određivane su koncentracije glutationa, slobodnih tiolnih skupina i aktivnost enzima glutation-S-transferaze. Rezultati su statistički obrađeni u statističkom programu MedCalc 14.8. i Microsoft Office Excel-u 2010. Antioksidativni učinak vodenog ekstrakta lista biljke *Betula pendula* pokazan je samo u niskoj koncentraciji (0,05 mg/ml) dok visoke koncentracije mogu čak imati prooksidativno djelovanje.

SUMMARY

Diabetes mellitus is a chronic metabolic syndrome characterized by chronic hyperglycemia that occurs due to the relative and / or absolute deficiency of insulin. Oxidative stress can damage macromolecules and DNA causing dysfunction of cells and tissue damage. Increased oxidative stress is a factor that ultimately leads to the development of type 2 diabetes. Some studies have shown that antioxidant treatment can prevent or lessen the cardiovascular complications of diabetes. Silver Birch (lat. *Betula pendula*) is a deciduous tree that grows throughout Europe and Asia. In traditional medicine throughout the world for many years people have been used extracts from the bark. In the literature there are no data on antioxidant effect of aqueous extract of the leaf of *Betula pendula*. The aim of this study was the examination of such effect. Water extract of the leaf of *Betula pendula* contains flavonoids, phenols and phenolic acids. HPLC phytochemical analysis confirmed that the main component in the aqueous extract of the leaf of *Betula pendula* is flavonoid rutin while the other components are present in lower concentrations. The experiment was using Hep G2 cell culture. These are human, epithelial cells of hepatocellular carcinoma. Oxidative stress was induced by treating the cells with 30 mM glucose solution. The concentrations of aqueous extract of the leaf of *Betula pendula* amounted to 0.05 mg / mL, 0.1 mg / ml and 0.5 mg / ml.The concentration of glutathione, free thiol groups and the enzyme activity of glutathione-S-transferase were measured by spectrophotometric methods. The results were statistically analyzed in the statistical program MedCalc 14.8. and Microsoft Office Excel 2010. Antioxidant activity of an aqueous extract of the leaf of *Betula pendula* is shown only at a low concentration (0,05 mg / ml) while high concentrations may even have prooxidant effect.

8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ANTIOKSIDATIVNI UČINAK VODENOG EKSTRAKTA LISTA BILJKE *BETULA PENDULA* ROTH (BETULACEAE) U HIPERGLIKEMIJSKIM UVJETIMA *IN VITRO*

Antonija Petrunić

SAŽETAK

Šećerna bolest je kronični metabolički sindrom karakteriziran kroničnom hiperglikemijom koji nastaje zbog relativnog i/ili apsolutnog manjka inzulina. Oksidativni stres dovodi do oštećenja makromolekula i DNA što uzrokuje disfunkciju stanica i oštećenje tkiva. Povećani oksidativni stres faktor je koji u konačnici dovodi do razvoja šećerne bolesti tipa 2. Neka istraživanja pokazala su da antioksidativni tretman može prevenirati, ali i ublažiti kardiovaskularne komplikacije šećerne bolesti. Obična breza (lat. *Betula pendula*) je bjelogorično drvo koje raste diljem Europe i Azije. U tradicionaloj medicini diljem svijeta već se godinama koriste ekstrakti iz kore i ljekovita svojstva kore. U znanstvenoj literaturi nema podataka o antioksidativnom učinku vodenog ekstrakta lista biljke *Betula pendula* pa je cilj ovog istraživanja bilo ispitivanje tog učinka. Vodeni ekstrakt lista biljke *Betula pendula* sadrži flavonoide, fenole i fenolne kiseline. HPLC fitokemijska analiza potvrdila je da je glavna sastavnica u vodenom ekstraktu lista biljke *Betula pendula* flavonoid rutin dok su ostale komponente prisutne u nižim koncentracijama. U eksperimentu je korištena Hep G2 kultura stanica. To su humane, epitelne stanice hepatocelularnog karcinoma. Oksidativni stres izazvan je tretiranjem stanica s 30 mM otopinom glukoze. Koncentracije vodenog ekstrakta lista biljke *Betula pendula* iznosile su 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml i 0,5 mg/ml. Spektrofotometrijskim metodama određivane su koncentracije glutationa, slobodnih tiolnih skupina i aktivnost enzima glutation-S-transferaze. Rezultati su statistički obrađeni u statističkom programu MedCalc 14.8. i Microsoft Office Excel-u 2010. Antioksidativni učinak vodenog ekstrakta lista biljke *Betula pendula* pokazan je samo u niskoj koncentraciji (0,05 mg/ml) dok visoke koncentracije mogu čak imati prooksidativno djelovanje.

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

Rad sadrži: 41 stranicu, 11 grafičkih prikaza, 3 tablice i 22 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Šećerna bolest, oksidativni stres, antioksidansi, Hep G2, *Betula pendula*, glutation, slobodne tiolne skupine, glutation-S-transferaza

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Roberta Petlevski**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Ime i Prezime, *viši asistent/ docent/ izvanredni profesor/ redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Ime i Prezime, *viši asistent/ docent/ izvanredni profesor/ redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: studeni 2016.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of medical biochemistry and hematology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

ANTIOXIDANT EFFECT OF AQUEOUS EXTRACT OF THE LEAF OF *BETULA PENDULA* ROTH (BETULACEAE) IN HIPERGLYCEMIC CONDITIONS *IN VITRO*

Antonija Petrunić

SUMMARY

Diabetes mellitus is a chronic metabolic syndrome characterized by chronic hyperglycemia that occurs due to the relative and / or absolute deficiency of insulin. Oxidative stress can damage macromolecules and DNA causing dysfunction of cells and tissue damage. Increased oxidative stress is a factor that ultimately leads to the development of type 2 diabetes. Some studies have shown that antioxidant treatment can prevent or lessen the cardiovascular complications of diabetes. Silver Birch (lat. *Betula pendula*) is a deciduous tree that grows throughout Europe and Asia. In traditional medicine throughout the world for many years people have been used extracts from the bark. In the literature there are no data on antioxidant effect of aqueous extract of the leaf of *Betula pendula*. The aim of this study was the examination of such effect. Water extract of the leaf of *Betula pendula* contains flavonoids, phenols and phenolic acids. HPLC phytochemical analysis confirmed that the main component in the aqueous extract of the leaf of *Betula pendula* is flavonoid rutin while the other components are present in lower concentrations. The experiment was using Hep G2 cell culture. These are human, epithelial cells of hepatocellular carcinoma. Oxidative stress was induced by treating the cells with 30 mM glucose solution. The concentrations of aqueous extract of the leaf of *Betula pendula* amounted to 0.05 mg / mL, 0.1 mg / ml and 0.5 mg / ml.The concentration of glutathione, free thiol groups and the enzyme activity of glutathione-S-transferase were measured by spectrophotometric methods. The results were statistically analyzed in the statistical program MedCalc 14.8. and Microsoft Office Excel 2010. Antioxidant activity of an aqueous extract of the leaf of *Betula pendula* is shown only at a low concentration (0,05 mg / ml) while high concentrations may even have prooxidant effect.

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

Thesis includes: 41 pages, 11 figures, 3 tables and 22 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Diabetes mellitus, oxidative stress, antioxidant, Hep G2, *Betula pendula*, glutathione, free thiol groups, glutathione-S-transferase

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
Ime i Prezime, **Ph.D.** */Assistant Professor/ Associate Professor/ Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ime i Prezime, **Ph.D.** */Assistant Professor/ Associate Professor/ Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: november 2016.