

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
MEDICĪNAS FAKULTĀTE
FARMĀCIJAS BAKALaura STUDIJU PROGRAMMA

***Vaccinium* ģints ogu spiedpalieku ekstraktu
efekti uz alfa glikozidāzes aktivitāti**

BAKALaura DARBS

Autore: Olga Karasjova

Studenta apliecības Nr.: ok15020

Darba vadītājs: Dr.habil.biol. Ruta Muceniece

RĪGA 2018

ANOTĀCIJA

Alfa-glikozidāzes inhibitori ir orāli pretdiabēta līdzekļi, ko lieto 2. tipa cukura diabēta ārstēšanai, lai novērstu vai palēninātu ogļhidrātu (piemēram, cietes un cukura) gremošanu. Arī starp dabas vielām tiek meklēti alfa-glikozidāzes inhibitori. Darba mērķis: pētīt melleņu, krūmmelleņu, lielogu dzērveņu, dzērveņu un brūkleņu ogu spiedatlieku ekstraktu ietekmi uz alfa glikozidāzes aktivitāti *in vitro*. Pētījumā ogu sauso ekstraktu aktivitāte ir pētīta ūdens un metanola ekstraktu šķīdumiem.

Rezultāti liecina, ka visiem šo ogu ekstraktiem ir alfa glikozidāzes inhibēšanas spēja, bet ekstraktu šķīdumiem ūdenī tā ir gandrīz 10 reizes vājāka kā metanola. No ekstraktu šķīdumiem metanolā vislielākā alfa glikozidāzes inhibēšanas spēju uzrāda brūkleņu ekstrakts ar IC50 0,00016 mg/ml koncentrācijā. Secinām, ka ogas ir ieteicamas cukura diabēta pacientiem lietošanai uzturā.

Atslēgas vārdi: alfa-glikozidāzes inhibitori, *Vaccinium spp.* ogu ekstrakti, IC50.

ANNOTATION

Alpha-glycosidase inhibitors are oral antidiabetic agents used to treat type 2 diabetes, to prevent or slow down digestion of carbohydrates (such as starch and sugar). Alpha-glucosidase inhibitors are also found among natural substances. The aim of the study: to investigate the effect of extracts of blueberries, highbush blueberries, large cranberries, cranberries and lingonberry on the activity of alpha glycosidase *in vitro*.

In the study, the alpha-glucosidase inhibitory activity of the berry extracts has been studied in the extract solutions in water and methanol. The results show that all of these berry extracts have an inhibitory effect on alpha-glucosidase activity, but in the case of extract solutions in water, it is almost 10 times weaker than that of methanol. From the extract solutions in methanol, the highest alpha glycosidase inhibition ability is found for lingonberry extract with an IC₅₀ of 0.00016 mg / ml. We conclude that berries are recommended for use in diet of diabetic patients.

Keywords: alpha-glucosidase inhibitors, *Vaccinium* spp. berry extract, IC₅₀.

SATURS

IEVADS.....	5
1. LITERATŪRAS APSKATS	6
1.1. Diabēta diagnosticēšana un diabēta tipi	6
1.2. Insulīns	8
1.3. Alfa glikozidāze un tās inhibitori	9
1.4. Flavonoīdu ietekme uz α -glikozidāzes aktivitāti: iespējamie mērķi glikozes homeostāzei	11
1.5. Alfa-amilāzes un α -glikozidāzes aktivitātes inhibēšana ar tējas un vīnogu sēklu ekstraktiem un to sastāvdaļām katehīniem	12
1.6. Bilberry - <i>Vaccinium myrtillus</i> L.	13
1.7. Krūmmellenes – <i>Vaccinium corymbosum</i>	15
1.8. Lielogu dzērvenes - <i>Vaccinium macrocarpon</i>	16
1.9. Purva Dzērvenes – <i>Vaccinium oxycoccos</i>	16
1.10. Brūklenes - <i>Vaccinium vitis-idaea</i>	17
2. MATERIĀLI UN METODEDES.....	18
2.1 Materiāli:	18
2.2. Darba gaita:	19
3. REZULTĀTI.....	22
3.1. Ogu ekstraktu efekti uz alfa glikozidāzes aktivitāti	22
4. DISKUSIJA	30
5. SECINĀJUMI.....	33
6. PATEICĪBA.....	34
7. IZMANTOTĀ LITERATŪRA	35
DOKUMENTĀRĀ LAPA.....	38

IEVADS

Alfa-glikozidāze ir enzīms, kas atrodas zarnu apvalkā un saliktos polisaharīdus pārveido par vienkāršiem cukuriem (monosaharīdiem), kuri no zarnām nonāk asinīs. Alfa-glikozidāzes inhibitori ir orāli pretdiabēta līdzekļi, ko lieto 2. tipa cukura diabēta ārstēšanai, lai novērstu vai palēninātu ogļhidrātu (piemēram, cietes un cukura) gremošanu. Pēc ogļhidrātu uzņemšanas ar pārtiku strauji ceļas cukuru līmenis asinīs un tas nav vēlams diabēta slimniekiem, kuriem ir traucēta glikozes uzņemšana šūnās. Tādējādi alfa-glikozidāzes inhibitori samazina uztura ogļhidrātu ietekmi uz cukura līmeni asinīs un novērš postsprandiālo hiperglikēmiju. Alfa-glikozidāzes inhibitori akarboze (Precose), miglitols (Glyset) un voglibose pēc ķīmiskās struktūras ir saharīdi, kas darbojas kā konkurējoši enzīmu, kas nepieciešami ogļhidrātu sagremošanai, inhibitori: īpaši alfa-glikozidāzes. Lielai daļai dabas produktu, kas satur polifenolus, piemīt alfa glikozidāzes aktivitātes inhibīcijas spēja. Pieļauj, ka ar polifenoliem bagāti augu ekstrakti var darboties sinerģiski ar alfa glikozidāzes inhibitoriem un paši būt lietderīgi cukura līmeņa asinīs kontrolei. Flavonoīdi ir potenciālie pretdiabēta līdzekļi, jo tie izraisa vairākas darbības, kas ir gan hiperglikemizējošas (insulīnomimētiskā darbība), gan antihiperglikēmijas (insulīna sekrēcijas izraisīto blakusparādību) efekti.

Darba mērķis: pētīt melleņu, krūmmelleņu, lielogu dzērveņu, dzērveņu un brūkleņu ogu spiedatlieku ekstraktu ietekmi uz alfa glikozidāzes aktivitāti *in vitro*.

Darba uzdevumi:

1. Iegūt ūdens un metanola šķīdumus no melleņu, krūmmelleņu, lielogu dzērveņu, dzērveņu un brūkleņu sausajiem ekstraktiem.
2. Pētīt ūdens un metanola ekstraktu efektus uz alfa glikozidāzes aktivitāti *in vitro* testā. Atrast piemērotu koncentrāciju diapazonu.
3. Salīdzināt ūdenī un metanolā šķīdināto ogu ekstraktu alfa glikozidāzes aktivitātes inhibēšanas efektus.

Bakalaura darbs izstrādāts Latvijas Universitātes Medicīnas fakultātē Dabaszinātņu akadēmiskā centra zinātniskajā laboratorijā Dr. habil. biol. Rutas Mucenieces vadībā.

Sausie ogu spiedatlieku ekstrakti saņemti no LU Vides zinātņu nodaļas pētniekiem.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Diabēta diagnosticēšana un diabēta tipi

Diabēts ir vielmaiņas slimību grupa, kam raksturīga hiperglikēmija, ko izraisa insulīna sekrēcijas defekti, insulīna darbības traucējumi vai abi iepriekš minētie iemesli. Hroniska cukura diabēta hiperglikēmija ir saistīta ar šūnu ilgtermiņa bojājumiem, disfunkciju un dažādu orgānu, jo īpaši acu, nieru, nervu, sirds un asinsvadu mazspēju. (Kharroubi, Darwish, 2015).

Daži patogēni procesi ir cieši saistīti ar diabēta attīstību. Tie ir no aizkuņģa dziedzerā β -šūnu autoimūnas iznīcināšanas ar sekojošu insulīna deficītu līdz pat novirzēm, kas izraisa rezistenci pret insulīna darbību. Ogļhidrātu, tauku un olbaltumvielu metabolisma bojājumu dēļ ir nepietiekama insulīna iedarbība uz mērķa audiem. Insulīna deficīts ir saistīts ar nepietiekamu insulīna sekrēciju un / vai samazinātu audu atbildes reakciju uz insulīnu vienā vai vairākos hormona darbības sarežģītajos posmos. Insulīna sekrēcijas traucējumi un insulīna darbības traucējumi bieži vien pastāv vienam un tam pašam pacientam, un bieži vien nav skaidrs, kurš no tiem ir viens no galvenajiem hiperglikēmijas cēloņiem. (American Diabetes Association, 2010).

1 tipa cukura diabēts ir insulinējamais diabēts. Tādos gadījumos pacientu diētai jābūt tādai, lai insulīna daudzums asinīs nepalielinātos strauji, taču tai jānodrošina visas vajadzīgās uzturvielas. Diētai jāsamazina arī cukurslimības komplikāciju rašanās iespējas (ateroskleroze dažādās izpausmēs). Insulīna daudzums jāpiemēro diētai. (Zariņš, Neimane, 2009).

2 tipa cukura diabēts ir neinsulinējamais diabēts. Tādos gadījumos diēta var normalizēt glikozes līmeņa izmaiņas un aizstāt medikamentus. Tai jābūt tādai, kas strauji nepalielina vajadzību pēc insulīna un būtu vērsta pret cukurslimības komplikācijām, kuru pamatā ir sīko asinsvadu ateroskleroze. (Zariņš, Neimane, 2009).

Izteiktas hiperglikēmijas simptomi ir poliūrija, polidipsija, svara zudums, dažkārt ar polifāģiju un neskaidru redzi. Hroniskas hiperglikēmijas gadījumā var būt arī šūnu reģenerācijas pasliktināšanās un pacientu jutīgums pret noteiktām infekcijām. Nekontrolēta diabēta akūtas un dzīvībai bīstamas sekas ir hiperglikēmija ar ketoacidozi vai neketotisko hiperosmolāro sindromu. Glikozes homeostāze tiek traucēta, ja insulīns

un glikozes līmenis tukšā dūšā ir attiecīgi lielāks par 20mU/ ml un 110mg/ dL vai kad pacientam jālieto zāles glikozes līmeņa kontrolei. (**Mouri, Bhimji**, 2017).

Hiperglikēmija pacientiem ar 1.tipa cukura diabētu ir ģenētiskā, imunoloģiskā vai vides faktora rezultāts, kas izraisa aizkuņģa dziedzera beta šūnu un insulīna deficīta iznīcināšanu. Pacientiem ar 2.tipa cukura diabētu, insulīna rezistence un patoloģiska insulīna sekrēcija rada šo hiperglikēmiju. (**Mouri, Bhimji**, 2017).

Ilgtermiņa diabēta komplikācijas ir retinopātija ar iespējamu redzes zudumu; nefropātija, kas izraisa nieru mazspēju; perifēra neiropātija ar kāju čūlām, iespējamu amputāciju un Harkota (Charcot) locītavu risku; autonomā neiropātija, kas izraisa kuņģa-zarnu trakta, dzemdes kakla un kardiovaskulārus simptomus, un seksuālo disfunkciju. Pacientiem ar cukura diabētu ir palielināts aterosklerozes, kardiovaskulāro, perifēro un cerebrovaskulāro slimību biežums. Cukura diabēta slimniekiem bieži rodas arī blaknes kā hipertensija un lipoproteīnu metabolisma novirze. (**American Diabetes Association**, 2010).

Diabētu iedala divās plašās etiopatogēnās kategorijās. Vienā kategorijā ir 1. tipa diabēts, kura iemesls ir absolūtais insulīna sekrēcijas trūkums. Personas ar paaugstinātu šī tipa diabēta attīstības risku bieži var identificēt pēc seroloģiskiem pierādījumiem par autoimūnu patoloģisko procesu, kas notiek aizkuņģa dziedzera Langerhansa salās un redzams ģenētiskajos marķeros. Otrā daudz intensīvākā kategorijā ir 2. tipa diabēts, kura cēlonis ir šūnu nereaģēšana uz insulīna iedarbību un nepietiekama kompensējošā insulīna sekrēcijas reakcija. Pēdējā kategorijā ilgstoši pirms diabēta noteikšanas var būt tāda hiperglikēmijas pakāpe, kas ir pietiekama, lai radītu patoloģiskas un funkcionālas izmaiņas dažādos mērķa audos, bet bez klīniskiem simptomiem. Šī asimptomātiskā perioda laikā ir iespējams iegūt ogļhidrātu vielmaiņas traucējumus, mērot glikozes līmeni plazmā tukšā dūšā vai pēc izaicinājuma ar iekšķīgi uzņemtu glikozes slodzi. (**American Diabetes Association**, 2010).

Hiperglikēmijas pakāpe (ja tāda ir) laika gaitā var mainīties atkarībā no slimības procesa. Slimības process var būt klātesošs, bet tas var nebūt progresējis pietiekami tālu, lai izraisītu hiperglikēmiju. Tas pats slimības process var izraisīt glikozes līmeņa pazemināšanos tukšā dūšā (IFG) un / vai traucēt glikozes toleranci (IGT), kas vēl neatbilst diabēta diagnostikas kritērijiem. Dažiem diabēta slimniekiem pietiekamu glikēmijas kontroli var panākt ar ķermeņa masas samazināšanu, fizisko aktivitāti un / vai iekšķīgi

lietojamām glikozes līmeni pazeminošām vielām. Tādēļ šīs personas ārstēšana neprasa insulīnu. Citas personas, kam ir kāda atlikušā insulīna sekrēcija, bet kurām nepieciešams eksogēns insulīns adekvātai glikēmijas kontrolei, bez tā var izdzīvot. Individīdiem ar plašu β -šūnu iznīcināšanos, kas izraisa atlikušā insulīna sekrēciju, izdzīvošanai nepieciešams insulīns. Metabolisma anomālijas smagums var progresēt, regresēt vai palikt nemainīgs. Tādējādi hiperglikēmijas pakāpe pamatā atspoguļo esošā vielmaiņas procesa smagumu un tā ārstēšanu vairāk nekā pašu procesa raksturu. (**American Diabetes Association, 2010**).

1.2. Insulīns

Insulīns ir hormons, kas palīdz ķermenim izmantot enerģētisko glikozi. Aizkuņģa dziedzerā beta šūnās sintezē insulīnu. Ja ķermenis nespēj producēt pietiekami daudz insulīna, insulīnu jāievada injekciju vai citu līdzekļu veidā. (**Wilcox, 2005**).

Insulīnterapija ir būtiska katram, kam ir 1. tipa cukura diabēts, un dažiem cilvēkiem, kuriem ir 2. tipa cukura diabēts. Ir pieejami dažādi insulīna veidi. Tie atšķiras atkarībā no tā, cik ātri un cik ilgi tie ir efektīvi, kā arī ar ķīmisko struktūru.

Daži insulīna veidi darbojas ātri (īslaicīgas darbības insulīns vai ātras darbības insulīns), savukārt citi strādā pēc noteikta laika un strādā ilgāku laiku (ilgstoša darbība vai bazālais insulīns). (**Donner, 2015**).

Insulīnu var iegūt no cūku (cūku insulīna) vai liellopu (liellopu insulīna) aizkuņģa dziedzerā šūnām un sagatavot lietošanai cilvēkiem. Bet mūsdienās lielākā daļa cilvēku lieto ģenētiski modificētu insulīnu diabēta ārstēšanai. Ir divu veidu ģenētiski modificēts insulīns, kas pazīstams kā cilvēka insulīns un insulīna analogi. Cilvēka insulīns ir līdzīgs cilvēka organismā ražotajam insulīnam. Insulīna analogiem ir atšķirīga ķīmiska struktūra, taču tiem ir līdzīga iedarbība. (**NIH - National Cancer Institute.**)

Insulīna analogi tika ieviesti tirgū 90. gados. Salīdzinot ar cilvēka insulīnu, tie pēc cukura līmeņa celšanās asinīs uzreiz sāk samazināt cukura līmeni asinīs. Jau daudzus gadus notiek debates par to, vai cilvēki ar diabētu gūst labumu no konkrēta analoga vairāk nekā no cita. Bet pētījumi nav atraduši nevienu pierādījumu, kas liecinātu, ka cukura līmeņa celšanās bremzēšana ar konkrēti izvēlētu insulīna analogu to dara labāk nekā ar citu. Ja, piemēram, tiktu parādīts konkrēts insulīna tips, kas novērš cukura līmeņa asinīs izraisīto komplikāciju rašanos, tad šāda veida insulīns sniegtu skaidras priekšrocības.

Būtu arī priekšrocība, ja insulīns novērstu spēcīgas cukura līmeņa svārstības, kas izraisa ievērojami zemu vai augstu cukura līmeni asinīs (hipoglikēmiju vai hiperglikēmiju). Vai arī, ja cilvēkiem būtu vieglāk sekot ikdienas ārstēšanas plānam. Bet pētījumi šajā jomā liecina, ka insulīna analogi un cilvēka insulīns ir vienlīdz efektīvi diabēta ārstēšanā. (**NIH - National Cancer Institute.**)

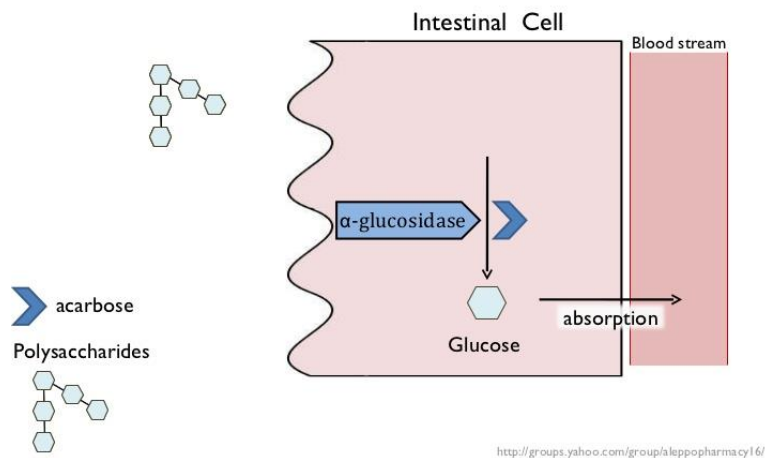
1.3. Alfa glikozidāze un tās inhibitori

Alfa glikozidāze ir enzīms, kas atrodas tievajās zarnās un iedarbojas uz cukuru α (1 \rightarrow 4) saiti, kas ir pretstats beta glikozidāzei. Alfa glikozidāze sadala polisaharīdus, piemēram, cieti un disaharīdus līdz glikozei. (**Wikipedia**, 2018).

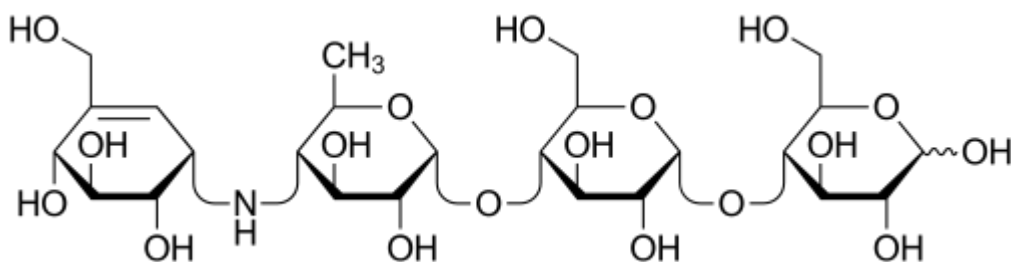
Glikozidāzes grupas enzīmi ir nepieciešami ogļhidrātu sadalījumam pirms monosaharīdu absorbcijas. Alfa glikozidāzes inhibitori aizkavē uzņemto ogļhidrātu absorbciju, samazinot postprandiālo glikēmiju un insulīna maksimumu. Alfa-glikozidāzes inhibitori ir 2. tipa cukura diabēta zāles, kas samazina ogļhidrātu uzsūkšanos zarnās, izraisot lēnāku un zemāku glikozes līmeņa paaugstināšanos visas dienas garumā, īpaši pēc ēdienreizēm. Pirms ogļhidrātu uzsūkšanās no pārtikas, tie jāsadala mazākās cukura daļiņās, piemēram, glikozes veidā, izmantojot enzīmus tievajā zarnā. Vienu no enzīmiem, kas iesaistīti ogļhidrātu sadalīšanā, sauc par alfa glikozidāzi. Šo fermentu inhibējot, ogļhidrāti netiek sadalīti tik efektīvi, un tas aizkavē glikozes uzsūkšanos. Alfa-glikozidāzes inhibitori ir Precose (akarboze) un Glyset (miglitols). (**Kalra**, 2014).

Alfa-glikozidāzes inhibitoru, piemēram, akarbozes ieviešana ārstēšanā nodrošina jaunu pieeju diabēta ārstēšanā. Konkurētspējīgi un atgriezeniski inhibējot zarnu alfa-glikozidāzi, akarboze aizkavē ogļhidrātu gremošanu, paildzina vispārējo ogļhidrātu noārdīšanās laiku un tādējādi samazina glikozes absorbcijas ātrumu. (**DiNicolantonio, et.al.** 2015).

Mechanism of Action of alpha-Glucosidase Inhibitors



1. att. Alfa-glikozidāzes inhibitoru darbības mehānisms



2. att. Akarbozes formula

Pēc iekšķīgas akarbozes ievadīšanas, postprandiālā glikozes līmeņa paaugstināšanās asinīs ir atkarīga no devas, un glikozes izraisītā insulīna sekrēcija ir novājināta. Sakarā ar akarbozes samazinātu postprandiālo hiperglikēmiju un hiperinsulinēmiju, samazinās triglicerīdu uzņemšana taukaudos, aknu lipogēzes aktivitāte un triglicerīdu saturs. Tādēļ akarbozes terapija ne tikai samazina postprandiālo glikēmiju primārās un sekundārās farmakodinamiskās iedarbības dēļ, bet arī regulē vispārējo lipīdu un ogļhidrātu metabolisma stāvokli. (DiNicolantonio, et.al. 2015).

Dzīvniekiem diabēta modelī akarboze samazināja glikozes koncentrāciju urīnā, glikozes koncentrāciju asinīs zem koncentrācijas laika līknes (AUC) un muskuļos kavēja GLUT4 glikozes transportproteīna līmeņa samazināšanos. Tā rezultātā samazinājās vidējais glikozes līmenis asinīs, olbaltumvielu daudzums, kā arī samazinājās glikozes metabolisma galaprodukti (AGE). Šūnu bāzes membrānas sabiezēšanas novēršana dažādos audos parādīja, ka diabēta dzīvnieku ārstēšana ar akarbozi izraisīja labvēlīgu

ietekmi novēršot nefropātijas, neiropātijas un retinopātijas attīstību. Tādējādi alfa-glikozidāzes inhibitori akarboze var kavēt vai, iespējams, novērst diabētisko komplikāciju attīstību, novēršot skeleta muskuļu GLUT4 glikozes transportētāju samazināšanos, kā arī glicerācijas galaproduktu (AGE) veidošanos. (Bischoff, 1995).

Alfa glikozidāzes inhibitori (AGI) ir unikāla antidiabētisko līdzekļu klase. Atvasināti no baktērijām, šie perorālie preparāti ir fermentu inhibitori, kuriem nav pankreato centrēta iedarbības mehānisms. Aizkavējot ogļhidrātu uzsūkšanos kuņģa-zarnu traktā, viņi kontrolē postprandiālu hiperglikēmiju un nodrošina neapšaubāmu kardiovaskulāro sistēmas uzlabojumu. (Kalra, et.al. 2013).

Glikozidāzes inhibitori parasti tiek izrakstīti cukura diabēta pacientiem, lai mazinātu postprandiālo hiperglikēmiju, ko izraisa cietes sašķelšana līdz glikozei un straujš glikozes līmeņa kāpums. Šie inhibitori ir paredzēti, lai pārsvarā mērķētu uz alfa amilāzi un alfa glikozidāzi. Inhibēšanas kopējais vēlamais efekts ir samazināt glikozes plūsmu no ogļhidrātiem asinsritē ar diētas palīdzību, samazinot cietes patēriņa postprandiālo ietekmi uz glikozes līmeni asinīs. Tomēr bieži tiek ziņots par vadošo glikozidāzes inhibitoru, piemēram, akarbozes un miglitola blakus efektiem. Tie rada caureju un citus zarnu darbību traucējumus, ar atbilstošām zarnu sāpēm un pietūkumu. Kontrolētos klīniskajos pētījumos iegūtie dati, liecina, ka glikozidāzes inhibitori izraisa daudzus blakus efektus, tai skaitā nevēlamas kuņģa – zarnu trakta blakusparādības, un tad notiek priekšlaicīga zāļu atsaukšana pacientam. Tāpēc tiek meklēti jauni līdzekļi, kuriem nebūtu nevēlamo blakus efektu. (Derosa, Maffioli, 2012).

1.4. Flavonoīdu ietekme uz α -glikozidāzes aktivitāti: iespējamie mērķi glikozes homeostāzei

Arī dabas vielas tiek pētītas kā diabēta risku mazināšanas līdzekļi. Cukura diabēts ir sarežģīts vielmaiņas traucējums endokrīnajā sistēmā, kas raksturojas ar novirzi insulīna sekrēcijā un/ vai darbībā ar insulīnu, kas izraisa pakāpenisku glikozes tolerances pasliktināšanos un izraisa hiperglikēmiju. Cukura diabēts paliek arvien izplatītāks visā pasaulē. Viena no terapeitiskajām pieejām postprandiālās hiperglikēmijas samazināšanai ir glikozes absorbcijas palēnināšanās, inhibējot ogļhidrātu hidrolizējošos enzīmus, piemēram, glikozidāzi zarnās, ko var veikt arī ar diētu, izvēloties polifenoliem bagātu pārtiku. (Sarian, et.al. 2017).

Flavonoīdi ir potenciālie pret diabēta līdzekļi, jo tie izraisa vairākas darbības, kuri izraisa gan hiperglikemizējošus (insulīnomimētiskā darbība), gan antihiperglikēmijas (insulīna sekrēcija izraisīto blakusparādību) efektus. Tiek pētīta dažādu flavonoīdu grupu ietekme uz glikozes kontroli hiperglikēmijas žurkām (glikozes pārslodze) un ķīmiski inducēta cukura diabēta žurkām. (Sarian, et.al. 2017).

Flavonoīdu antioksidatīvo un pret diabētisko potenciālu ietekmē dažādas funkcijas attiecībā uz kodolstruktūru, piemēram, hidroksilgrupas, metilgrupas un acetātgrupas. (Sarian, et.al. 2017).

Tiek pierādīts, ka flavonoīdi var iedarboties uz vairākiem audiem, lai regulētu glikozes homeostāzi asins serumā. Pierādīja, ka luteolīns, amentoflavons, luteolīns 7-O-glikozīds un daidzeīns ir spēcīgi alfa-glikozidāzes inhibitori. Dažādi meksikāņu ar flavonoīdiem bagātu augu ekstrakti efektīvi inhibē alfa-glikozidāzes aktivitāti un ievērojami samazina glikozes līmeni. (De Sousa, et.al. 2011).

1.5. Alfa-amilāzes un α -glikozidāzes aktivitātes inhibēšana ar tējas un vīnogu sēklu ekstraktiem un to sastāvdaļām katehīniem

Alfa-amilāze ir enzīms, kas arī šķeļ ogļhidrātus, un dabas vielas bieži darbojas kā alfa-amilāzes un alfa-glikozidāzes inhibitori. Vīnogu sēklu ekstrakts spēcīgi inhibēja gan α -amilāzes, gan α -glikozidāzes aktivitāti ar vienādu un daudz lielāku efektivitāti, salīdzinot ar akarbozi. Lai gan tējas ekstrakti un atsevišķi katehīna 3-gallāti bija mazāk efektīvi α -amilāzes inhibitori, tie bija spēcīgi α -glikozidāzes inhibitori. Dati liecina, ka augu ekstrakti, kas satur katehīna 3-gallātus, ir spēcīgi α -glikozidāzes inhibitori, un pierāda, ka vīnogu sēklu ekstraktos atrastie procianidīni spēcīgi inhibē α -amilāzes aktivitāti. (Scalbert, Williamson, 2017).

Ir pierādīts, ka augu polifenola frakcijas kavē α -amilāzes un α -glikozidāzes aktivitāti un ļauj stingrāk kontrolēt glikozes līmeni asinīs. Polifenoli atrodas augu izcelsmes produktos, piemēram, ābolos, ogās, citrusaugļos, plūmēs, brokoļos, kakao, tējā, kafijā u.c produktos, un pastāv būtiski epidemioloģiski pierādījumi tam, ka lietojot šos augus uzturā, tajos esošie polifenoli pasargā no sirds un asinsvadu slimībām un 2.tipa cukura diabēta attīstības. (Scalbert, Williamson, 2017).

Zaļās un baltās tējas ir īpaši bagātas ar katehīniem un katehīna 3-gallātiem. Visizplatītākais katehīna 3-gallātu pārstāvis zaļajā un baltajā tējā ir epigallokatehīna gallāts (EGCG), un tā daudzums tiek saistīts ar daudzu labu tēju pozitīvajām pret diabēta līdzekļa īpašībām. Savukārt vīnogu sēklu ekstraktā ir ne tikai katehīni un katehīna 3-gallāti, bet arī oligomēri flavan-3-ols, ko sauc par procianidīniem. Gan monomēriskie, gan oligomēri flavan-3-oli mijiedarbojas ar glikozidāzes enzīmiem un var darboties kā efektīvi α -glikozidāzes inhibitori. (Yilmazer-Musa, et.al. 2012).

Dati liecina, ka vīnogu sēklu, tējas un 3-gallātu katehīnu ekstrakti ir spēcīgi glikozidāzes inhibitori, kas var ierobežot uztura cietes gremošanu. Vīnogu sēklas un tējas ekstrakti ir viegli pieejami flavonoīdu avoti, no kuriem daudziem ir pierādīta efektivitāte diabēta simptomu kontrolei. Attiecībā uz α -glikozidāzes inhibēšanu tika ieteikts, ka flavāna-3-olu mijiedarbībai ar fermentu izšķiroša nozīme ir molekulas gala grupas klātbūtnei, kas esterificēta C-gredzena 3. stāvoklī.

Dati liecina par augu ekstraktu, jo īpaši vīnogu sēklu un zaļās tējas ekstraktu izmantošanu kā dzīvotspējīgas alternatīvas enzīmu - glikozīdu hidrolāzes, α -amilāzes un α -glikozidāzes farmaceutiskajiem inhibitoriem. Tā kā šie augu ekstrakti ir labi panesami, salīdzinoši lēti un viegli pieejami, tiem ir liels lietošanas potenciāls daudzos glikēmijas kontroles gadījumos. (Yilmazer-Musa, et.al. 2012).

1.6. Bilberry - Vaccinium myrtillus L.

Mellenes ogas satur cukurus, organiskās skābes, pektīnvielas, miecvielas, gļotvielas, askorbīnskābi, karotīnus, B grupas vitamīnus, antociānus un citus flavonoīdus ar P vitamīna aktivitāti, minerālvielas (dzelzs, mangāns, selēns, hroms u.c.). Lapās ir līdz 20% miecvielu, glikozīdu, triterpēnskābju, flavonoīdu, askorbīnskābes un citas vielas. (Rubine, Eniņa, 2004).

Mellenes ir viens no visbagātākajiem antociānu dabīgajiem avotiem. Antociāni ir polifenoli, kas dod zilo un melno krāsojumu, un nodrošina ogās augsto antioksidantu saturu. (Lila, 2004).

Tiek uzskatīts, ka tās ir galvenās bioaktīvās vielas, kas atbild par ietekmi uz veselības stāvokli. Mellenes tiek uzskatītas par redzes uzlabotāju, taču tās samazina arī glikozes līmeni asinīs, tām piemīt pretiekaisuma un lipīdu līmeni pazeminoša iedarbība,

tās arī darbojas kā antioksidanti un samazina oksidatīvo stresu. Melleņu potenciālās vērtības ir izmantojamas slimību profilaksē vai ārstēšanā, piemēram, kad ir konstatēts iekaisums, dislipidēmija, hiperglikēmija vai paaugstināts oksidatīvais stress, sirds un asinsvadu slimības, vēzis, diabēts, demence vai citas ar vecumu saistītas saslimšanas. (Stull et.al., 2016).

Mellene ir pazīstama kā pretdiabēta augs un tās ogas un lapas, kā arī citas Vaccinium ogu sugas ir izmantotas jau gadsimtiem ilgi, lai mazinātu cukura diabēta simptomus. Melleņu hipoglikēmisko efektu daļēji skaidro ar ietekmi uz fermentu darbības traucējumiem, it īpaši alfa glikozidāzes aktivitāti, kā arī ietekmi uz insulīna sekrēciju un glikozes transportēšanu. Lai gan trūkst cilvēku klīnisko pētījumu dati par melleņu pretdiabēta izraisītajām sekām, daudzi pētījumi *in vitro* liecina par to, ka mellenes ārstē vai novērš 2.tipa cukura diabēta simptomus. (L.Bao, et.al., 2008).

Aptaukošanās ir spēcīgs predispozīcijas faktors 2.tipa diabēta slimniekiem. Ogu polifenoli var palīdzēt novērst aptaukošanos, inhibējot gremošanas enzīmus, piemēram, lipāzi, tādējādi samazinot tauku uzsūkšanos. Aptaukošanās ir saistīta ar makrofāgu infiltrāciju uz taukaudiem un iekaisuma ceļu aktivizēšanu, kas izraisa insulīna rezistences veidošanos. Adipocītos makrofāgu uzkrāšanās izraisa pirms iekaisuma citokīnu producēšanos. (Stull et.al., 2016).

Mellenēm ir pierādīts pretiekaisuma efekts, kura mehānismu skaidro ar aknu un vēdera tauku audos samazinātu kodola faktora NFκB, interleikīna-6 (IL-6) un audzēja nekrozes faktora alfa (TNFα) koncentrāciju. IL-6, TNFα un c-reaktīvais proteīna līmenis ir paaugstināts Zucker žurkām ar aptaukošanos. Jūtības pret insulīnu pastiprināšanās netika novērota. Mellenes aizsargā adipocītus no nāves un regulē muskuļu grupas makrofāgu un iekaisīgo citokīnu (TNFα un IL-10) gēnu ekspresijas indeksus pelēs ar aptaukošanos. Secina, ka šīs izmaiņas iekaisuma citokīnu gēnu ekspresijā var veicināt paaugstinātu jutību pret insulīnu. Cilvēki, kuriem ir hipergolisterinēmija, melleņu un upeņu ekstraktu anticianīni ievērojami samazināja iekaisuma bioloģiskā marķiera asinsvadu epitēlija šķīstošā asinsvadu šūnu adhēzijas molekulas-1 (sVCAM-1) līmeni, salīdzinot ar placebo lietošanu. (Stull et.al., 2016)

1.7. Krūmmellenes – *Vaccinium corymbosum*

Vaccinium corymbosum ir krūmmellenes ir daudzgadīgs ogulājs, kas iegūts krustojot Amerikā un Kanādā savvaļā augošās zīleņu sugas. Ziedu fitoķīmiskās pārbaudes laikā tika iegūts 21 fenolīns. Savienojumi tika identificēti pēc kodolmagnētiskās rezonances un masas spektrālajām analīzēm. Atklāja piecas kofeīna skābes, trīs kumārionskābes un divus cinnamilspirta atvasinājumus, astoņus flavonglikozīdus un trīs feilproanoīda aizstājējus katehīnus. Izolātiem novērtēja antioksidantu un alfa glikozidāzes inhibējošās aktivitātes. Pētījums parādīja, ka no izolētās fenola apakšgrupas ir spēcīgākas alfa glikozidāzes inhibitori nekā akarboze. (Wan, et.al., 2012).

Vaccinium corymbosum ogas ir populārs auglis, kas ir plaši pētīts, ņemot vērā potenciālos ieguvumus cilvēkiem. Pētījumi neirozinātnēs, vēža profilaksē un sirds un asinsvadu slimībās ir noteikuši melleņu augļus kā funkcionējošu veselību veicinošu pārtiku. Turklāt melleņu augļiem piemīt stipras antioksidanta īpašības, kas veicina tā kā veselīga uztura labvēlīgas sastāvdaļas lomu, jo īpaši, lai apkarotu oksidatīvas ar stresu saistītas neinfekcijas slimības (NCD). Melleņu augļos ir augsts fenola saturs, ieskaitot flavonoīdus un fenola skābes. Melleņu augļi ir labs antociānu un proantociānidīnu avots, kas var veicināt sirds un asinsvadu slimību profilaksi un veselības uzlabošanu. (Chu, et.al., 2011).

Fenolu skābēm ir pretmikrobu un pretiekaisuma īpašības, kas var potenciāli veicināt resnās zarnas veselību. Fenolskābēm arī citu *Vaccinium* sugu augļos, ieskaitot dzērveņu un melleņu augļus, ir pretmikrobu aktivitāte pret zarnu patogēniem. Uztura bagātināji, kuros ir augļu izcelsmes pārtikas produktu sastāvdaļas, var kļūt par, piemēram, 2.tipa cukura diabēta un hipertensijas profilakses neatņemamu sastāvdaļu. Alfa glikozidāzes inhibēšana var samazināt cietes sagremošanu un vienlaicīgu glikozes absorbciju zarnās. Daudzām augu izcelsmes pārtikas vielām piemīt alfa glikozidāzes inhibējoša aktivitāte *in vitro*. Nākotnē augu produkti varētu kalpot kā laba 2.tipa cukura diabēta ārstēšanas stratēģija bez iespējamām kaitīgajām blakusparādībām. Pārtikas produkti, kas bagāti ar polifenoliem, var piedāvāt vienkāršas diētas stratēģijas, lai regulētu hiperglikēmiju agrīnajā stadijā.

Indivīdi ar 2.tipa cukura diabētu ir ar paaugstinātu sirds un asinsvadu slimību risku. Polifenoli šos riskus mazina. (Cheplick, et.al., 2015).

1.8. Lielogu dzērvenes - *Vaccinium macrocarpon*

Lielogu dzērvenes tiek augsti vērtētas pārtikas un farmācijas rūpniecībā, tāpēc, ka ogas satur minerālvielas, cukurus, skābes, pektīnvielas, fenolu savienojumus un citas bioloģiski aktīvas vielas. Ir pierādīts, ka dzērveņu sula var saturēt resveratrolu koncentrācijā, kas līdzīga vīnogu sulai. Resveratrolam piemīt vairāki bioloģiski efekti, kas saistīti ar sirds – asinsvadu slimībām, tostarp trombocītu agregācijas nomākšana un iekaisuma mazināšana. (Berman, et.al., 2017).

Dzērveņu polifenoli ir dažādi bioloģiski iedarbīgi, tostarp arī antibakteriāli, antikancerogēni, pretiekaisuma un vēl tiem piemīt arī antioksidantu efekti. (Thimóteo, Scavuzzi, 2017).

1.9. Purva Dzērvenes – *Vaccinium oxycoccos*

Purva dzērvenes ir iekļautas ziedaugu sugu grupā, kurai bioaktīvās vielas ir ar izteiktu ietekmi uz veselību. Tās ir izplatītas visā vēsajā mērenajā ziemeļu puslodē, tostarp Ziemeļeiropā, Ziemeļāzijā, Ziemeļamerikā. Šīm dzērvenēm ir mazs, izliekts krūms ar vīnogulāju kātiem, kas sakņojas mezglos. Amerikas Savienoto Valstu Zemkopības departaments pierādīja, ka divas dzērveņu sulas glāzes dienā var samazināt 2. tipa cukura diabēta un sirds slimību risku. Tas ir saistīts ar polifenoliem, kurus satur dzērvenes. Dzērveņu polifenoli aizsargā šūnas no bojājumiem un slimībām.

Dzērveņu ekstrakts novērš asinsspiediena paaugstināšanos. Diabēts ir potenciāli manāms riska faktors sirds un asinsvadu slimībām, un arī diabētu var ietekmēt dzērveņu bioaktīvie komponenti. Pētījumos ir pierādīts, ka dzērvenes un dzērveņu ekstraktu flavonoīdi samazina glikozes līmeni asinīs un uzlabo cukura diabēta pacientu jutību pret insulīnu. (Blumberg, et.al., 2013).

1.10. Brūklenes - *Vaccinium vitis-idaea*

Brūklene ir mūžzaļš, līdz 25 cm augsts ēriku (*Ericaceae*) dzimtas puskrūms. Zied maijā, jūnijā. Auglis ir sarkana, sulīga oga. Brūklene Latvijā bieži sastopama skujkoku un jauktajos mežos, krūmājos, purvos uz ciņiem, izcirtumos. Vietām tā veido samērā plašas audzes. Medicīnā izmanto brūklenes lapas un vasas. Drogas vāc pavasarī līdz augu ziedēšanai, kamēr ziedpumpuri vēl zaļi vai rudenī pēc augļu nogatavināšanās. (**McKay, Blumberg**, 2007).

Brūklenes lapās un vasās ir fenolglikozīdi, no kuriem svarīgākais ir arbutīns. Tā saturs var būt 6-9%. Vēl drogās atrastas miecvielas, flavonglikozīdi un hiperozīds, ursolskābe, vīnskābe. Tautas medicīnā bieži lieto brūklenes augļus (ogas). Tajos ir cukuri, citronskābe, vīnskābe, benzoskābe, kurai raksturīga antiseptiska iedarbība, miecvielas, askorbīnskābe, skābeņskābe. Ogu sēklās atrasta eļļa, kuras sastāvā ir nepiesātinātās taukskābes – linolskābe un linolēnskābe. (**Rubine, Eniņa**, 2004).

2.MATERIĀLI UN METODEDES

2.1 Materiāli:

- 96 lauciņu plate (Sarstedt, Vācija)
- Analītiskie svāri (Precisa XB 120 A, SERIES 320 XB D99 – D9 – 030)
- Termostats
- Ependorfa mēģenes (Sarstedt, Vācija)
- Automātiskās pipetes (Sarstedt, Vācija)
- Mikroplates nolasītājs (BioTek Elx808 BioTek Instruments, VT, USA)
- Sausie ogu ekstrakti (LU Vides zinātņu nodaļa)
- Alfa glikozidāze (Sigma-Aldrich, ASV)
- Alfa – D – glucopyranoside (Sigma-Aldrich, ASV)
- Fosfātbufferis (Sigma-Aldrich, ASV)
- PNPG (P-nitro-fenil-alfa-D-glikopiranozīds) - (Sigma-Aldrich, ASV)
- Metanols (Sigma-Aldrich, ASV)

Ekstraktu šķīdumu ūdenī koncentrācijas:

- 2mg/ml
- 1mg/ml
- 0,5mg/ml
- 0,25mg/ml
- 0,125mg/ml

Ekstraktu šķīdumu metanolā koncentrācijas:

- 2mg/ml
- 0.2mg/ml
- 0.02mg/ml
- 0.002mg/ml
- 0.0002mg/ml

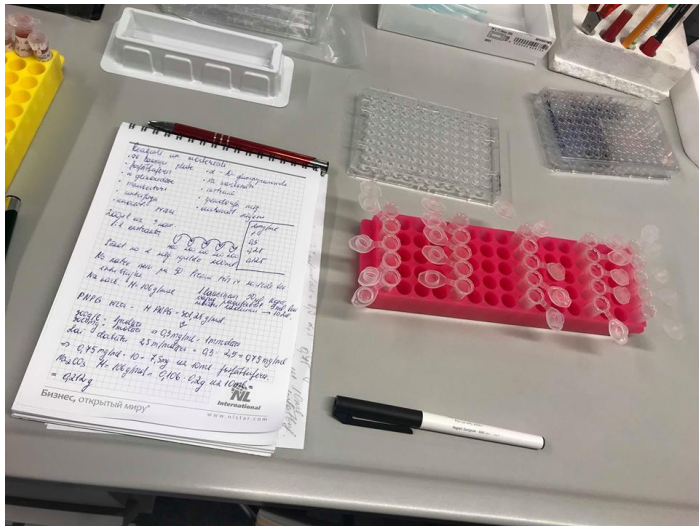
Ekstrakti:

- Mellene
- Krūmmellene
- Lielogu dzērvēne

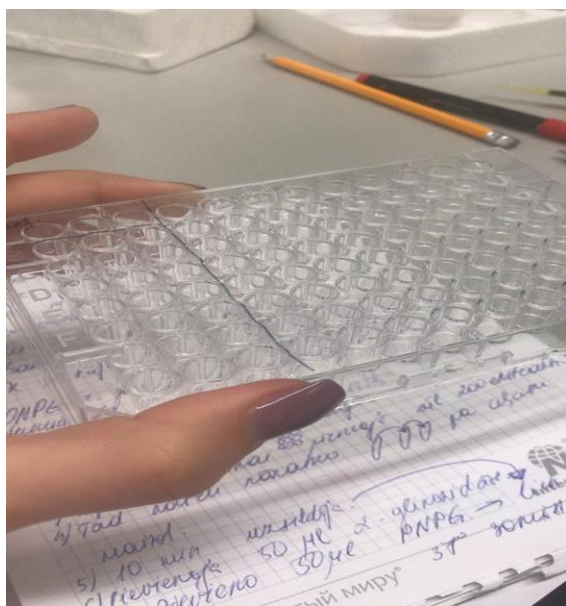
- Purva dzērvene
- Brūklene

2.2. Darba gaita:

1. Nosver sauso ekstraktu ar analītiskajiem svāriem un pagatavo ūdens vai metanola šķīdumu ar sākotnējo koncentrāciju 2 mg/ml. Visi ogu ekstrakti ūdenī nešķīst, tāpēc iegūst ūdenī izšķīdušo frakciju, to atsūc, atlikušās nogulsnes izzāvē un nosver. Šo svaru atņem no kopējā šķīdinātā ekstrakta svara un tā iegūst sākotnējo ekstraktu šķīdumu ūdenī koncentrāciju. Ūdenī šķīst melleņu ekstrakti.
2. Ar automātisko pipeti Ependorfu mēģenēs iemēra vajadzīgo 0,1M fosfātbufera, pH 6,8, tilpumu ar aprēķinu, lai pietiktu paraugu triplikātiem un tālākai atšķaidīšanai.
3. Šajās Ependorfa mēģenēs atšķaida ekstraktus attiecībā 1:10, sākot ar koncentrāciju 0,2mg/ml.
4. 96 lauciņu mikroplatē pirmajos 3 lauciņos iemēra 50 μl 0,1M fosfātbuferi, bet pārējos lauciņos secībā no vājākās uz stiprāko koncentrāciju iemēra 50 μl ekstrakta.
5. Visiem lauciņiem pievieno 50 μl alfa glikozidāzi (1 U/ml).
6. Platīti inkubē termostatā 10 minūtes 37 grādu temperatūrā.
7. Katrā lauciņā pievieno 50 μl PNPG (P-nitro-fenil-alfa-D-glikopiranozīds) 5mM šķīdumu.
8. Platīti inkubē termostatā 30 minūtes 37 grādu temperatūrā.
9. Absorbciiju mēra pie 405nm. Mēra ar ELISA mikroplatīšu lasītāju BioTek.
10. Rezultātu izsaka procentos, alfa glikozidāzes inhibitorā spēja = $(1 - As/Ac) \times 100$.
As – sample / Ac – control.
 - a. As ir ekstraktu paraugu absorbciija.
 - b. Ac ir buferis ar alfa glikozidāzi bez ekstraktiem.
11. IC50 aprēķina pēc lineārās regresijas vienādojuma ar GraphPad Prism 6.00 un vidējos lielumus un standartnovirzi aprēķina ar MS Excel.
 - a. Izsaka – vidējais ± standarnovirze.
12. Eksperimentu atkārto vairākas reizes.
13. Eksperimentos ar ekstraktu šķīdumiem metanolā, kā reaģentu kontroli izmanto metanolu.



2.1. un 2.2. att. Eksperimenta norise

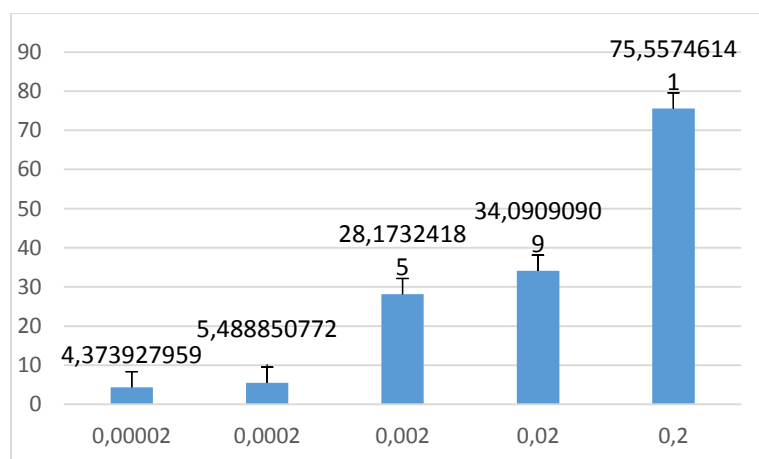


2.3.att. 96 lauciņu plate (Sarstedt, Vācija)

3.REZULTĀTI

3.1. Ogu ekstraktu efekti uz alfa glikozidāzes aktivitāti

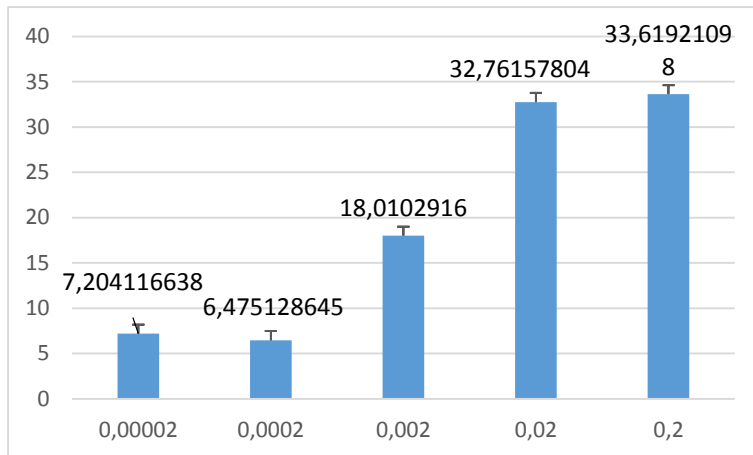
Alfa glikozidāzes un PNPG (P-nitro-fenil-alfa-D-glikopiranozīds) reakcijas rezultātā rodas dzeltenas krāsas savienojums, kura koncentrācija ir proporcionāla alfa glikozidāzes aktivitātei. Reakcijā veidojas α -D-glikoze un p-nitrofenols, kas ir dzeltenas krāsas viela. Jo reakcijā redzama dzeltenāka krāsa, jo mazāk traucēta ir alfa glikozidāzes darbība. Sākumā pētījām ekstraktu efektus, sākot ar 1 mg/ml koncentrāciju un atšķaidot līdz 0,0625 mg/ml. Bet tad secinājām, ka šajās koncentrācijās ekstrakti pilnībā vai gandrīz 100% nobloķē alfa glikozidāzes aktivitāti un dzeltenas krāsas savienojuma rašanos nenovērojam. Ņemot vērā šo eksperimentu pieredzi un pašu ekstraktu krāsu, kas varētu traucēt absorbcijas mērījumus, kā augstāko koncentrāciju ūdens ekstraktiem izvēlējāmies 0,2mg/ml, bet metanola ekstraktiem 0,02 mg/ml. Attēlā 3.1. ir redzama melleņu ekstraktu alfa-glikozidāzes inhibīcijas spēja iepriekš atrastajā koncentrāciju diapazonā.



3.1.att.. Melleņu ūdens ekstrakta alfa glikozidāzes inhibīcija (%).

Rezultāti parādīti kā vidējais \pm SD (standartnovirze).

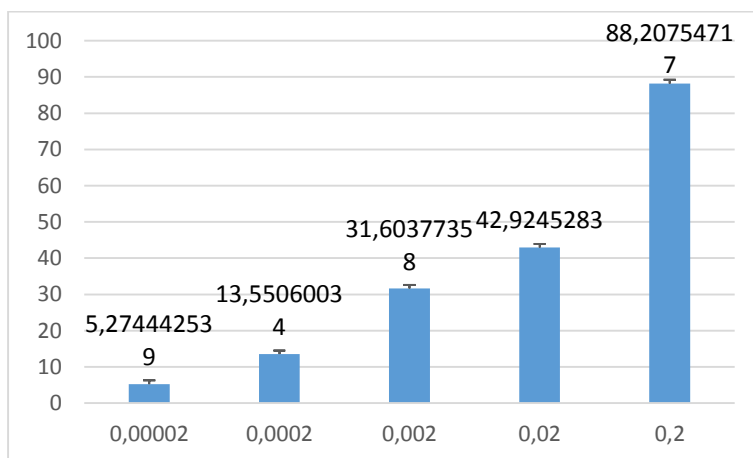
Uz Y ass ir %, uz X ass ir koncentrācijas.



3.2.att. Krūmmelleņu ūdens ekstrakta alfa glikozidāzes inhibīcija (%).

Rezultāti parādīti kā vidējais ± SD (standartnovirze). Uz Y ass ir %, uz X ass ir koncentrācijas.

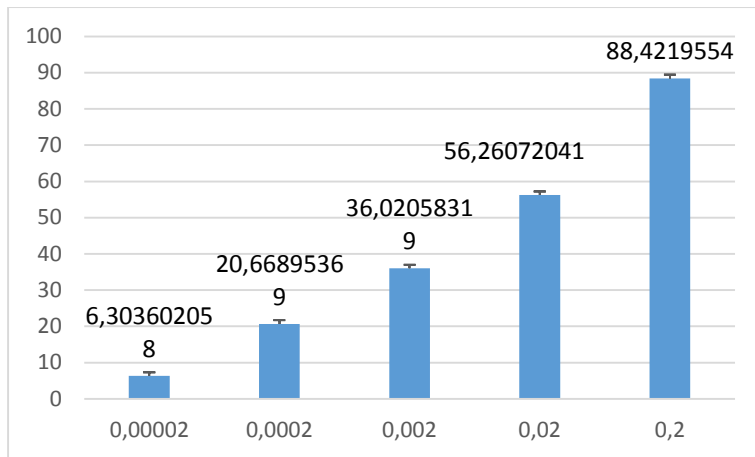
Krūmmelleņu ekstrakti uzrādīja vājāku alfa glikozidāzes inhibīcijas spēju par melleņu ekstraktiem. Koncentrācija 0,2mg/ml inhibīcija bija apmēram 34% un salīdzinot ar 0,02mg/ml koncentrāciju, procenti ir diezgan līdzīgi, gandrīz 33%.



3.3.att. Lielogu dzērveņu ūdens ekstrakta alfa glikozidāzes inhibīcija (%).

Rezultāti parādīti kā vidējais ± SD (standartnovirze). Uz Y ass ir %, uz X ass ir koncentrācijas.

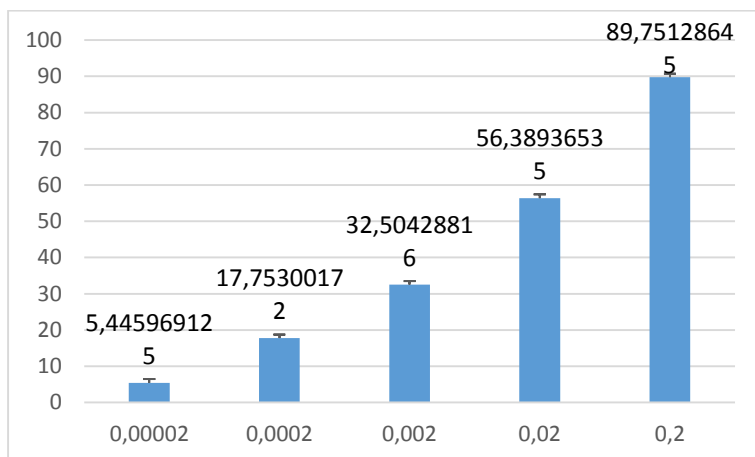
Lielogu dzērveņu ekstraktiem ir izteikta inhibīcijas procentu atšķirība starp koncentrācijām. Augstākajā koncentrācijā sasniegta 88% enzīma inhibīcija.



3.4.att. Purva dzērveņu ūdens ekstrakta alfa glikozidāzes inhibīcija (%).

Rezultāti parādīti kā vidējais \pm SD (standartnovirze). Uz Y ass ir %, uz X ass ir koncentrācijas.

Purva dzērveņu ekstrakta alfa glikozidāzes inhibīcijas efekti ir ļoti līdzīgi lielogu dzērveņu enzīma inhibīcijas efektiem. Augstākā koncentrācijā sasniedz 88,4%. Tomēr koncentrācijās 0,02mg/ml un 0,002mg/ml purva dzērvene ir aktīvāka par lielogu dzērveni.



3.5.att. Brūkleņu ūdens ekstrakta alfa glikozidāzes inhibīcija (%).

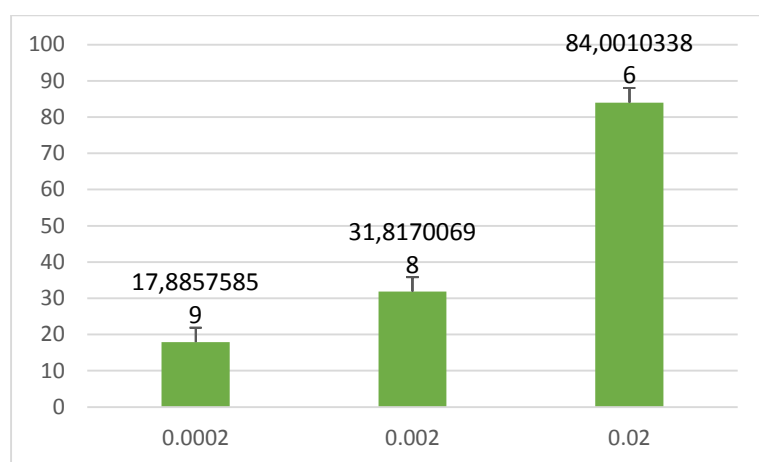
Rezultāti parādīti kā vidējais \pm SD (standartnovirze).

Uz Y ass ir %, uz X ass ir koncentrācijas.

Brūkleņu enzīmu ekstraktu inhibīcijas aktivitāte ir līdzīga kā dzērvenēm. Brūkleņu ekstraktu enzīma inhibīcijas aktivitāte ir līdzīga kā dzērvenēm. Kā iemesls varētu būt ogu krāsa, jo brūklenes un dzērvenes ir sārtās ogas, bet mellenes ir zili violetas,

kas norāda uz atšķirīgu pigmentu sastāvu, kas arī varētu būt viens no faktoriem inhibīcijas efektu atšķirībām.

Ne visas ogu ekstraktu sastāvdaļas šķīst ūdenī, tāpēc turpinot eksperimentu, ogu ekstraktus izšķīdinājām arī metanolā. Novērojām, ka metanola ekstraktiem ir augstāka alfa glikozidāzes aktivitāte, maksimumu sasniedzot jau koncentrācijā 0,02mg/ml. Vismazākā un vislielākā ekstraktu koncentrācija, kas tika izmantota ūdens ekstraktu pārbaudei, netika izmantota, jo vislielākā inhibīcija, kā iepriekš minēts, tika sasniegta pie 0,02mg/ml. IC50 tika saskatīta starp 0,0002mg/ml; 0,002mg/ml un 0,02mg/ml koncentrācijām.

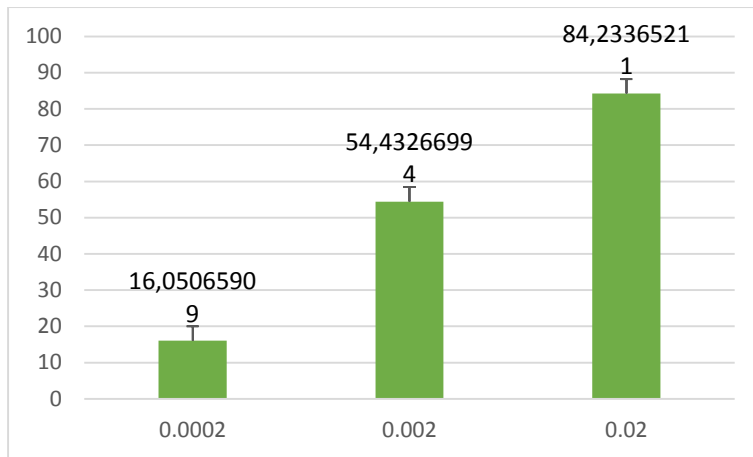


3.6.att. Melleņu metanola ekstrakta alfa glikozidāzes inhibīcija (%).

Rezultāti parādīti kā vidējais \pm SD (standartnovirze).

Uz Y ass ir %, uz X ass ir koncentrācijas.

Melleņu ekstraktam metanolā ir gandrīz trīsreiz lielāka inhibīcijas spēja nekā ūdens ekstraktam.

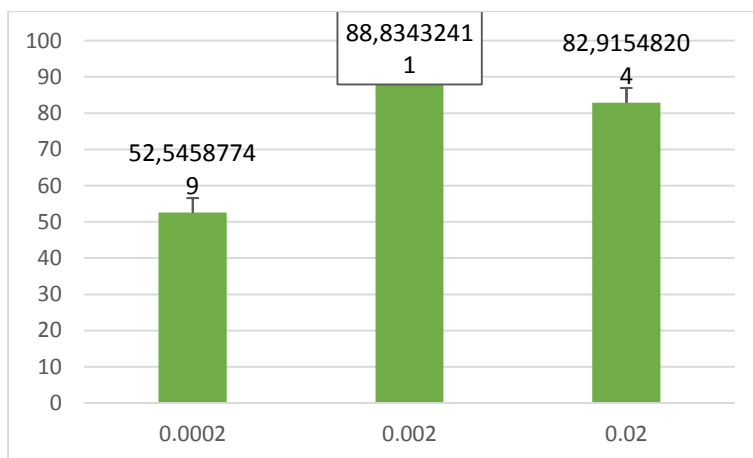


3.7.att. Krūmmelleņu metanola ekstrakta alfa glikozidāzes inhibīcija (%).

Rezultāti parādīti kā vidējais ± SD (standartnovirze).

Uz Y ass ir %, uz X ass ir koncentrācijas.

Krūmmelleņu ūdens ekstraktiem 10 reiz lielākā koncentrācijā inhibīcija bija tikai nepilni 34%, bet metanola ekstraktiem 0,02mg/ml koncentrācijā bija veseli 84,2mg/ml. Krūmmelleņu IC50 ir 0,002mg/ml.

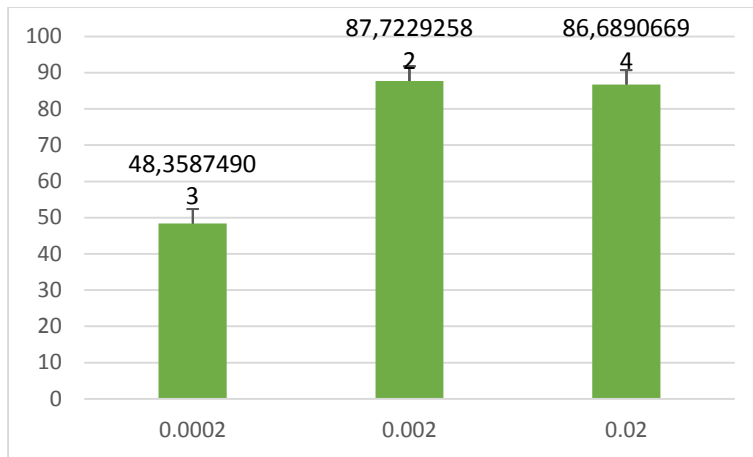


3.8.att. Lielogu dzērveņu metanola ekstrakta alfa glikozidāzes inhibīcija (%).

Rezultāti parādīti kā vidējais ± SD (standartnovirze).

Uz Y ass ir %, uz X ass ir koncentrācijas.

Lielogu dzērveņu ekstrakti uzrādīja ļoti augstu alfa glikozidāzes inhibīcijas spēju jau 0,0002mg/ml, sasniedzot IC50.

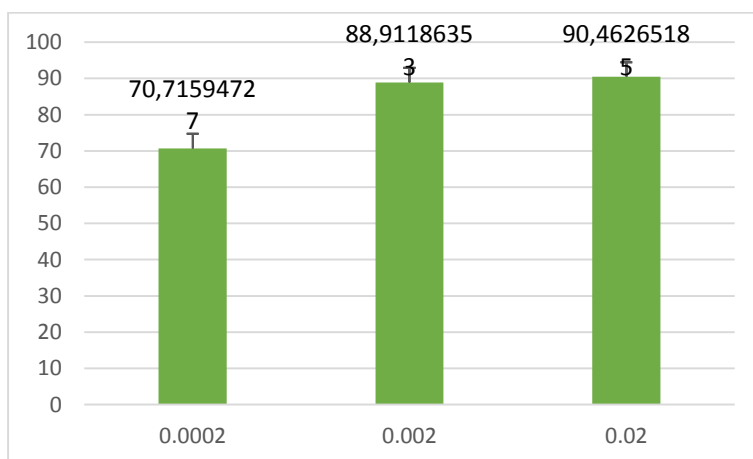


3.9.att. Purva dzērveņu metanola ekstrakta alfa glikozidāzes inhibīcija (%).

Rezultāti parādīti kā vidējais \pm SD (standartnovirze).

Uz Y ass ir %, uz X ass ir koncentrācijas.

Purva dzērvenes uzrāda ļoti līdzīgu efektu lielo dzērvenēm.



3.10.att. Brūkleņu metanola ekstrakta alfa glikozidāzes inhibīcija (%).

Rezultāti parādīti kā vidējais \pm SD (standartnovirze).

Uz Y ass ir %, uz X ass ir koncentrācijas.

Šajā testā atklājām, ka brūklenes ir ļoti spēcīgi alfa glikozidāzes inhibētāji un jau 0,0002mg/ml sasniedzot 70% inhibīcijas.

Tabula 3.1

Ūdens un metanola ekstraktu alfa glikozidāzes inhibīcijas efektu salīdzinājums

Ekstrakts	0,0002mg/ml		0,002mg/ml		0,02mg/ml	
	Ūdens ekstrakti	Metanola ekstrakti	Ūdens ekstrakti	Metanola ekstrakti	Ūdens ekstrakti	Metanola ekstrakti
Mellenes	5.5%	17.9%	28.2%	31.9%	34.1%	84%
Krūmmellenes	6.5%	16%	18%	54.4%	32.8%	84.2%
Lielogu dzērvenes	13.6%	52.6%	31.6%	88.8%	42.9%	82.9%
Purva dzērvenes	22.7%	48.4%	36%	87.7%	56.3%	86.7%
Brūklenes	17.8%	70.7%	32.5%	88.9%	56.4%	90.5%

Koncentrācijā 0,0002mg/ml mellenes ekstrakts ūdenī glikozidāzi inhibē 5,5%, bet mellenes ekstrakts metanolā 17,9%. Krūmmellenes ekstrakts ūdenī glikozidāzi inhibē 6,5% apmērā, bet krūmmellenes ekstrakts metanolā inhibē 16%. Lielogu dzērvenes ekstrakts ūdenī glikozidāzi inhibē 13,6%, bet metanolā 52,6%.

Purva dzērvenes ekstrakts ūdenī glikozidāzi inhibē 22,7%, bet metanolā 48,4%.

Brūklenes ekstrakts ūdenī glikozidāzi inhibē 17,8%, bet metanolā inhibē 70,7%.

Ņemot vērā rezultātus, kas apkopoti tabulā, visspēcīgāko inhibīciju 0,0002mg/ml koncentrācijā ūdens ekstraktos parādīja purva dzērvene, bet metanola ekstraktos brūklene. Salīdzinoši ūdens un metanola ekstrakti purva dzērvene, ūdenī bija 22,7%, bet metanolam 48,4%, bet brūklene ūdenī 17,8%, bet metanolā 70,7%, kas ir gandrīz 4 reizes vairāk.

Desmit reizes lielākā koncentrācijā 0,002mg/ml mellenes ekstrakts ūdenī glikozidāzi inhibē 28,2%, bet mellenes ekstrakts metanolā 31,9%.

Krūmmellenes ekstrakts ūdenī glikozidāzi inhibē 18%, bet metanolā inhibē 54,4%.

Lielogu dzērvenes ekstrakts ūdenī glikozidāzi inhibē 31,6%, bet metanolā 88,8%.

Purva dzērvenes ekstrakts ūdenī glikozidāzi inhibē 36%, bet metanolā 87,7%.

Brūklenes ekstrakts ūdenī glikozidāzi inhibē 32,5%, bet metanolā 88,9%.

Apkopojot rezultātus, visspēcīgāko inhibīciju 0,002mg/ml koncentrācijā ūdens ekstraktos parādīja purva dzērvene, bet metanolā brūklene. Salīdzinoši, ūdens un metanola ekstraktie purva dzērveneī ūdenī bija 36%, bet metanolam 87,7%. Brūkleneī ūdenī 32,5%, bet metanolā 88,9%. Ļoti interesanti, ka gandrīz tāds pats rezultāts metanola šķīdumam bija arī lielogu dzērveneī – inhibīcija 88,8%.

Vēl desmit reizes augstākā koncentrācijā 0.02mg/ml mellenes ekstrakts ūdenī glikozidāzi inhibē 34,1%, bet metanolā 84%.

Krūmmellenes ekstrakts ūdenī glikozidāzi inhibē 32,8%, bet metanolā 84,2%.

Lielogu dzērvenes ekstrakts ūdenī glikozidāzi inhibē 42,9%, bet metanolā 82,9%.

Purva dzērvenes ekstrakts ūdenī glikozidāzi inhibē 56,3%, bet metanolā 86,7%.

Brūklenes ekstrakts ūdenī glikozidāzi inhibē 56,4%, bet metanolā 90,5%.

Koncentrācijā 0,02mg/ml, visspēcīgākais efekts ūdens ekstraktam ir brūklenēm 56,4%, taču interesanti, ka ļoti līdzīgs rezultāts ir purva dzērvenēm, kas procentos ir 56,3.

Metanolā visspēcīgākais efekts ir brūklenēm.

Kopskatā, ņemot vērā visu pētījumu, visspēcīgāko inhibīcijas spēju izrādīja brūklenes, tās dominē visvairāk, taču efektīvi alfa glikozidāzes inhibitori ir gan purva, gan lielogu dzērvenes.

4. DISKUSIJA

Ņemot vērā apkopotos datus, visiem ekstraktiem piemīt alfa glikozidāzes aktivitāti inhibējošas īpašības. Tas nozīmē, ka, ja ekstraktiem būtu pietiekoši laba biopieejamība, tad tie varētu būt pret diabēta līdzekļi arī *in vivo*. Visas ogas var lietot gan svaigas, gan ekstraktu veidā. Visspēcīgāko inhibīciju konstatējam brūkleņu ekstraktam gan ūdens, gan metanola šķīdumos. Tomēr kopumā visi ekstraktu šķīdumi metanolā uzrādīja apmēram trīs reizes augstāku alfa glikozidāzes inhibīcijas efektu nekā atbilstošie ūdens šķīdumi. No šķīdinātāja ir atkarīgs kādas bioloģiski aktīvo vielu grupas nonāk šķīdumā. Mēs kā šķīdinātājus izmantojam ūdeni un metanolu, bet literatūrā ir aprakstīti pētījumi par iespēju izmantot arī kādu citu šķīdinātāju, piemēram, metilēnchlorīdu (**Lee, et.al.**, 2017). Vēl kā šķīdinātāju var izmantot etanolu, un atrasts, ka alfa glikozidāzes inhibēšana etanola ekstraktos ir augstāka nekā ūdens ekstraktos.

2.tipa diabēts parasti ir saistīts ar kardiovaskulārām komplikācijām, piemēram, hipertensiju, kā arī ar oksidatīvo stresu, kas saistīts ar mikrovaskulāro stāvokli, piemēram, nieru mazspēju, taču daudzi pētījumi, tostarp mūsu, pierāda, ka mellenes, brūklenes un dzērvenes ir ogas ar augstu antioksidantu saturu un spēj inhibēt alfa glikozidāzi, kas var novērst oksidatīvo stresu un šūnu bojājumus, neizraisot bīstamas sekas (**Cheplick, et.al.**, 2015).

Liela problēma mūsdienās ir tajā, ka cilvēki bieži neēd svaigas ogas un neuzņem ar pārtiku produktus, kas satur fenolus, antociānīdus un flavonoīdus, kas varētu samazināt glikēmijas līmeni. Pētījumā, kurā dalībnieki ēda svaigas ogas tukšā dūšā, noskaidroja, ka jau pēc 4 nedēļām ir acīmredzami samazināts glikozes līmenis plazmā (**Abidov, et.al.**, 2006).

Mūsu eksperimentos visspēcīgākās alfa glikozidāzes inhibīcijas īpašības uzrādīja brūklenes. Tāpēc iesakām diabēta pacientiem lietot uzturā pēc iespējas vairāk šīs ogas, gan svaigas, gan ekstraktus, gan žāvētas tēju veidā, jo brūklenes satur arī šķiedrvielas un polifenolus, kas uzrāda glikēmisko efektu (**Linderborg, et.al.**, 2012).

Protams, nevar nepiebildt, ka alfa glikozidāzes aktivitātes inhibīcija ir atkarīga no katras unikālās ogas ekstrakta sastāva un sinerģiskās kombinācijas, kas spēj labvēlīgi uzlabot organisma funkcionēšanu (**Apostolidis, et.al.**, 2006).

Pamatojoties uz daudzām šūnu kultūrām, dzīvnieku un cilvēku pētījumiem, ir labi zināms, ka vislielākā problēma polifenolu kā ķīmijterapijas vai pret diabēta līdzekļu ārstēšanā ir zemā perorālā biopieejamība, kas arī var būt galvenais iemesls saistībā ar

neskaidrajiem terapeitiskajiem efektiem. Lai pilnībā izprastu, kā molekulas mijiedarbojas ar cilvēka fizioloģiskajiem un patoloģiskajiem procesiem, ir vajadzīgi jauni *in vivo* un *in vitro* mehānismu pētījumi. (Teng, Chen, 2018).

Polifenoli, visbiežāk sastopamie fitoķīmiskie savienojumi, ir saistīti ar pretiekaisuma, antioksidantu, imūnmodulātorām un apoptiskām īpašībām. Vietēji samazinot oksidatīvo stresu, tie var turpināt darboties uz šūnu mērķiem κ B, Nrf-2, Jak / STAT un MAPK, kas inhibē pakārtoto citokīnu veidošanos (piemēram, IL-8, IL-1 β un TNF- α), kas inhibē pakārtoto citokīnu veidošanos (piemēram, IL-8, IL-1 β un TNF- α), kā arī palielina organisma paša antioksidanta stāvokli (HO-1, SOD , un GPx). (Kaulmann, Bohn, 2016).

Polifenoli ir antioksidanti un kopā ar citiem „*dietary reducing agents*”, piemēram, C vitamīnu, E vitamīnu un karotinoīdiem. Tie pasargā ķermeņa audus no oksidatīvā stresa. Tos sauc par antioksidantiem, jo tie var novērst dažādas ar oksidatīvo stresu saistītas slimības, piemēram, vēža, sirds un asinsvadu slimības, iekaisumu un citas slimības. Polifenolu ķīmiskā struktūra ietekmē to bioloģiskās īpašības, piemēram, biopieejamību, antioksidantu aktivitāti, specifisku mijiedarbību ar šūnu receptoriem un citas īpašības.

Galvenie polifenolu avoti uzturā ir augļi un dzērieni, piemēram, augļu sula, vīns, tēja, kafija, šokolāde un alus. Dārzeņi, pākšaugi un graudaugi nelielā mērā arī ir bagātīgi ar polifenoliem.

Vairāk tiešu pierādījumu par dažu fenolu savienojumu bioloģisko pieejamību iegūst, mērot to koncentrāciju plazmā un urīnā pēc tīru savienojumu vai pārtikas produktu uzņemšanas. Lielākā daļa uzņemto polifenolu (75-99%) nav atrodama urīnā. Tas nozīmē, ka tie vai nu nav absorbēti caur zarnu barjeru, vai tiek absorbēti un izdalīti ar žulti, vai metabolizējas ar resnās zarnas mikrofloru vai arī caur organisma audiem.

Attiecībā uz glikolizētajiem polifenoliem, lai notiktu pasīvā difūzija starp bioloģiskajām membrānām, parasti ir nepieciešama hidrofīlās daļas atdalīšana. Pasīvā difūzija notiek pāri tievās zarnas membrānām, tāpēc pirmajā metabolisma posmā vajadzētu nošķelt cukuru ar fermentiem (glikozidāzi). Polifenolu uzsūkšanās zarnās var būt efektīva, tomēr katra atsevišķa savienojuma plazmas koncentrācija reti pārsniedz 1 μ M pēc 10-100 mg viena veida savienojuma patēriņa. (Williamson, 2000).

Polifenoli, kas netiek absorbēti tievajā zarnā, nonāk atpakaļ resnajā zarnā, kur tiem tiek veiktas būtiskas strukturālas izmaiņas. Patiesībā, resnās zarnas mikroflora hidrolizē glikozīdus aglikonos un sadala tos par vienkāršām fenola skābēm. Šī aktivitāte

ir ļoti nozīmīga polifenolu bioloģiskajai darbībai, jo aktīvos metabolītus iegūst no resnās zarnas mikrofloras. Svarīgs aspekts, kas jāņem vērā *in vivo* pētījumos, ir deva, kuru parasti izmanto, lai pētītu bioloģisko pieejamību, jo " *in vivo* " eksperimentos, kurus galvenokārt izmanto, ir "vienas devas" dizains. (**Archivio, et.al.**, 2010).

5.SECINĀJUMI

1. No sausajiem melleņu, krūmmelleņu, lielogu dzērveņu un brūkleņu ogu izspiedatlieku ekstraktiem ūdenī šķīst melleņu ekstrakts. Pārējiem ekstraktiem var iegūt ūdenī šķīstošo frakciju. Metanolā izšķīst visi pieci ekstrakti.
2. Ekstraktu ūdens šķīdumiem alfa glikozidāzes aktivitātes inhibēšanas spēja ir gandrīz 10 reizes vājāka par ekstraktu šķīdumiem metanolā.
 3. No ūdenī šķīstošajām frakcijām lielogu dzērvenēm, purva dzērvenēm un brūklenēm IC50 tika sasniegta apmēram 0,02 mg/ml koncentrācijā. Melleņu un krūmmelleņu ekstraktiem aprēķinātā IC50 ir 0,06 mg/ml.
4. Lielogu dzērveņu un purva dzērveņu ekstraktu šķīdumiem metanolā IC50 tika atrasta 0,0002 mg/ml koncentrācijā.
5. Brūkleņu ekstraktu šķīdumiem metanolā ir vislielākā alfa glikozidāzes inhibēšanas spēja. IC50 aprēķināta kā 0,00016 mg/ml koncentrācija.

6. PATEICĪBA

Izsaku pateicību bakalaura darba vadītājai Rutai Muceniecei par palīdzību un atsaucību bakalaura darba izstrādē, pareizo ceļu ievirzīšanā, par sniegtajiem norādījumiem un sniegto informāciju darba izpildes laikā.

7. IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. **M. Abidov, A. Ramazanov, M. Jimenez Del Rio, et.al.** "Effect of Blueberin on fasting glucose, C-reactive protein and plasma aminotransferases, in female volunteers with diabetes type 2: double-blind, placebo controlled clinical study." *Georgian medical news* 141 (2006): 66-72.
2. **American Diabetes Association.** "Diagnosis and classification of diabetes mellitus." *Diabetes care* 33.Suppl 1 (2010): S62.
3. **E. Apostolidis, YI. Kwon, K. Shetty.** Potential of cranberry-based herbal synergies for diabetes and hypertension management." *Asia Pacific journal of clinical nutrition* 15.3 (2006): 433=441.
4. **L. Bao, H. Nagai, H. Kurihara, et al.** "Protective effects of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract on restraint stress-induced liver damage in mice." *Journal of agricultural and food chemistry* 56.17 (2008): 7803-7807.
5. **A. Y. Berman, R. A. Motechin, M. Y. Wiesenfeld, et.al.** "The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials." *NPJ precision oncology* 1.1 (2017): 35.
6. **H. Bischoff.** "The mechanism of alpha-glucosidase inhibition in the management of diabetes." *Clinical and investigative medicine. Médecine clinique et expérimentale* 18.4 (1995): 303-311.
7. **J. B. Blumberg, T. A. Camesano, A. Cassidy, et al.** "Cranberries and their bioactive constituents in human health." *Advances in Nutrition* 4.6 (2013): 618-632.
8. **S. Cheplick, D. Sarkar, P. Bhowmik, et.al.** "Phenolic bioactives from developmental stages of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) for hyperglycemia management using in vitro models." *Canadian journal of plant science* 95.4 (2015): 653-662.
9. **W. Chu, S. C. M. Cheung, R. A. W. Lau, et al.** "Chapter 4. Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.)." (2011).
10. **M. D'Archivio, C. Filesi, R. Vari, et.al.** "Bioavailability of the polyphenols: status and controversies." *International journal of molecular sciences* 11.4 (2010): 1321-1342.
11. **G. Derosa, P. Maffioli.** " α -Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice." *Archives of medical science: AMS* 8.5 (2012): 899.

12. **E. de Sousa, L. Zanatta, I. Seifriz, et al.** "Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: potential targets for glucose homeostasis." *Nutrition* 27.11 (2011): 1161-1167.
13. **J. J DiNicolantonio, J. Bhutani, J. H O'Keefe.** "Acarbose: safe and effective for lowering postprandial hyperglycaemia and improving cardiovascular outcomes." *Open heart* 2.1 (2015): e000327.
14. **T. Donner.** "Insulin—pharmacology, therapeutic regimens and principles of intensive insulin therapy." (2015).
15. **S. Kalra.** "Alpha glucosidase inhibitors." *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association* 64.4 (2014): 474-476.
16. **S. Kalra, R. K. Sahay, O. Schnell, et al.** "Alpha-glucosidase inhibitor, acarbose, improves glycemic control and reduces body weight in type 2 diabetes: Findings on indian patients from the pooled data analysis." *Indian journal of endocrinology and metabolism* 17.Suppl1 (2013): S307.
17. **A. Kaulmann, T. Bohn.** "Bioactivity of polyphenols: Preventive and adjuvant strategies toward reducing inflammatory bowel diseases—promises, perspectives, and pitfalls." *Oxidative medicine and cellular longevity* (2016).
18. **A. T. Kharroubi, H. M Darwish.** "Diabetes mellitus: The epidemic of the century." *World journal of diabetes* 6.6 (2015): 850.
19. **Y. H. Lee, B. Kim, S. R. Hwang, et.al.** Rapid characterization of metabolites in soybean using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS) and screening for α -glucosidase inhibitory and antioxidant properties through different solvent systems." *journal of food and drug analysis*(2017).
20. **M. A. Lila.** "Anthocyanins and human health: an in vitro investigative approach." *BioMed Research International* 2004.5 (2004): 306-313.
21. **K. M. Linderborg, R. Järvinen, H. M. Lehtonen, et.al.** "The fiber and/or polyphenols present in lingonberries null the glycemic effect of the sugars present in the berries when consumed together with added glucose in healthy human volunteers." *Nutrition research* 32.7 (2012): 471-478.
22. **D. L. McKay, J. B. Blumberg.** "Cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) and cardiovascular disease risk factors." *Nutrition reviews* 65.11 (2007): 490-502.
23. **M. Mouri, S. Bhimji.** "Hyperglycemia." (2017).
24. **NIH - National Cancer Institute.** „Diabetes Mellitus. (Diabetes)”.

25. **H. Rubine, V. Eņiņa.** „Ārstniecības augi”. Apgāds Zvaigzne, 2004. ISBN 978-9984-36-218-2. Lpp 193-194.
26. **M. N. Sarian, Q. U. Ahmed, S. Z. Mat So'ad, et.al.** "Antioxidant and Antidiabetic Effects of Flavonoids: A Structure-Activity Relationship Based Study." *BioMed research international* 2017 (2017).
27. **A. Scalbert, G. Williamson.** "Dietary intake and bioavailability of polyphenols." *The Journal of nutrition* 130.8 (2000): 2073S-2085S.
28. **A. J. Stull, K. C. Cash, C. M. Champagne, et.al.** "Blueberries' impact on insulin resistance and glucose intolerance." *Antioxidants* 5.4 (2016): 44.
29. **H. Teng, L. Chen.** "Polyphenols and Bioavailability: an update." *Critical reviews in food science and nutrition* just-accepted (2018): 00-00.
30. **N. S. B. Thimóteo, B. M. Scavuzzi, et.al.** "The impact of cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) and cranberry products on each component of the metabolic syndrome: a review." *Nutrire* 42.1 (2017): 25.
31. **C. Wan, T.Yuan, A. L. Cirello, et.al.** "Antioxidant and α -glucosidase inhibitory phenolics isolated from highbush blueberry flowers." *Food chemistry* 135.3 (2012): 1929-1937.
32. **Wikipedia (The Free Encyclopedia)** „Alpha- glucosidase”. Pieejams: <https://en.wikipedia.org/wiki/Alpha-glucosidase>. [Skatīts 04.04.2018]
33. **G. Wilcox.** "Insulin and insulin resistance." *Clinical biochemist reviews* 26.2 (2005): 19.
34. **G. Williamson.** "The role of polyphenols in modern nutrition." *Nutrition bulletin* 42.3 (2017): 226-235.
35. **M. Yilmazer-Musa, A. M. Griffith, A. J. Michels, et al.** "Inhibition of α -amylase and α -glucosidase activity by tea and grape seed extracts and their constituent catechins." *Journal of agricultural and food chemistry* 60.36 (2012): 8924.
36. **Z. Zariņš, L. Neimane.** „Uztura mācība” piektais pārstrādātais un papildinātais izdevums. 2009. ISBN 978-9984-45-04-2. 146-148.lpp

DOKUMENTĀRĀ LAPA

Bakalaura darbs “*Vaccinium* ģints ogu spiedpalieku ekstraktu efekti uz alfa glikozidāzes aktivitāti” izstrādāts LU Medicīnas fakultātē.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Olga Karasjova _____

(paraksts) (datums)

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītāja: Profesore Dr. hab. biol. Ruta Muceniece _____

Recenzents: _____

(amats, vārds, uzvārds, grāds)

(paraksts)

(datums)

Darbs iesniegts LU Medicīnas fakultātē _____

(datums)

Vecākā lietvede Juta Bārtule _____

(paraksts)

Bakalaura darbs aizstāvēts bakalaura studiju programmas gala pārbaudījuma komisijas sēdē _____ 2018., prot. Nr. _____.

Komisijas sekretāre: _____.