Određivanje antioksidacijske aktivnosti i ispitivanje sposobnosti inhibicije kolinesteraza nehlapljivih izolata korijena gaveza

Božić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:401623

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI I ISPITIVANJE SPOSOBNOSTI INHIBICIJE KOLINESTERAZA NEHLAPLJIVIH IZOLATA KORIJENA GAVEZA

DIPLOMSKI RAD

IVANA BOŽIĆ

Matični broj: 69

Split, srpanj 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI I ISPITIVANJE SPOSOBNOSTI INHIBICIJE KOLINESTERAZA NEHLAPLJIVIH IZOLATA KORIJENA GAVEZA

DIPLOMSKI RAD

IVANA BOŽIĆ
Matični broj: 69

Split, srpanj 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY

ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT AND CHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITY OF NON-VOLATILE ISOLATES FROM COMFREY ROOT

DIPLOMA THESIS

IVANA BOŽIĆ

Parent number: 69

Split, July 2018

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Diplomski studij Kemija, smjer Organska kemija i biokemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Tema rada je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta
Mentor: Doc. dr. sc. Franko Burčul

ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI I ISPITIVANJE SPOSOBNOSTI INHIBICIJE KOLINESTERAZA NEHLAPLJIVIH IZOLATA KORIJENA GAVEZA

Ivana Božić, 69

Sažetak: Oksidacijski stres definira se kao pomak ravnoteže u staničnim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Riječ je o stanju prekomjernog stvaranja ili nedovoljno učinkovitog uklanjanja reaktivnih kisikovih vrsta. Tada dolazi do neuravnoteženog stvaranja slobodnih radikala i premašivanja mogućnosti neke stanice da ih razgradi, što rezultira oštećenjem stanica. Otkrivanje novih prirodnih antioksidansa i inhibitora enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze moglo bi imati važnu ulogu u prevenciji štetnih oksidacijskih procesa i ublažavanju simptoma kod neurodegenerativnih oboljenja poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. U ovom istraživanju korištena je biljka gavez (*Symphytum officinale* L.*).* Cilj ovog rada bio je odrediti sadržaj ukupnih fenola, ispitati antioksidacijska svojstava i sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE) vodenog, metanolnog i diklormetanskog ekstrakta biljke. Sadržaj ukupnih fenola određen je primjenom Folin-Ciocalteu metode, antioksidacijska aktivnost je ispitana metodama hvatanja slobodnih radikala (DPPH) i mjerenjem redukcijskog potencijala (FRAP), dok je sposobnost inhibicije kolinesterazaodređena metodom po Ellmanu. Vodeni ekstrakt je pokazao relativno dobra antioksidacijska svojstva. Uzorci nisu pokazali inhibicijski potencijal na kolinesteraze

Ključne riječi: vodeni ekstrakt, antioksidacija, gavez, inhibicija kolinesteraza

Rad sadrži: 41 stranica, 17 slika, 9 tablica, 27 literaturnih referenci
Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević,	predsjednik
2. Doc. dr. sc. Mario Nikola Mužek,	član
3. Doc. dr. sc. Franko Burčul	član-mentor

Datum obrane: 6.srpnja 2018.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Graduate study of chemistry

Scientific area: Natural sciences
Scientific field: Chemistry
Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 3
Mentor: Franko Burčul, PhD, Assistant Professor

DETERMINATION OF ANTIOXIDANT AND CHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITY OF NON-VOLATILE ISOLATES FROM COMFREY ROOT

Ivana Božić, 69

Abstract: Oxidation stress is defined as the shift of equilibrium in cellular oxidation-reduction reactions in the direction of oxidation. This is a state of excessive creation or inadequate removal of reactive oxygen species. Then there is an imbalance in the creation of free radicals and overcoming the ability of a cell to disrupt them, resulting in cell damage. Detection of new natural antioxidants and acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzyme inhibitors could play an important role in the prevention of harmful oxidation processes and the alleviation of symptoms in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's disease. In this study, a comfrey plant (*Symphytum officinale* L.) was used. The aim of this paper was to determine the content of total phenols, to examine the antioxidant properties and the ability to inhibit the acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) enzymes of the aqueous, methanolic and dichloromethane extract of the plant. The content of total phenols was determined using the Folin-Ciocalte method, antioxidant activity was tested by free radical capture methods (DPPH) and measurement of reduction potential (FRAP), while the ability of cholinesterase inhibition was determined by Ellman's method. The aqueous extract showed relatively good antioxidant properties. Samples did not show inhibitory potential on cholinesterase.

Keywords: aqueous extract, antioxidation, comfrey, cholinesterase inhibition

Thesis contains: 41 pages, 17 figures, 9 tables, 27 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Ivica Blažević – PhD, Associate Professor.	**chair person**
2. Mario Nikola Mužek – PhD, Assistant Professor.	**member**
3. Franko Burčul – PhD, Assistant Professor	**supervisor**

Defence date: July 6, 2018

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom doc. dr. sc. Franka Burčula, u razdoblju od ožujka do srpnja 2018. godine.

Rad je financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost projektom: *"Istraživanje bioaktivnih spojeva iz dalmatinskog bilja: njihov antioksidacijski karakter i utjecaj na enzimsku inhibiciju i zdravlje" IP-2014-09-6897.*

Iskreno zahvaljujem doc. dr. sc. Franku Burčulu, koji mi je pomogao da uspješno odradim eksperimentalni rad te mi pomogao svojim stručnim savjetima i sugestijama tijekom pisanja i obrade podataka diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem obitelji i prijateljima na potpori i razumijevanju tijekom studiranja.

A ♥

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. *Priprava vodenog, metanolnog i diklormetanskog ekstrakta biljke gaveza* (*Symphytum officinale* L.)

2. *Određivanje sadržaja ukupnih fenola primjenom Folin-Ciocalteu metode.*

3. *Određivanje antioksidacijske aktivnosti vodenog ekstrakta biljke, DPPH i FRAP metodom.*

4. *Ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) i butilkolinesteraze (BChE) metodom po Ellmanu.*

SAŽETAK

Oksidacijski stres definira se kao pomak ravnoteže u staničnim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Riječ je o stanju prekomjernog stvaranja ili nedovoljno učinkovitog uklanjanja reaktivnih kisikovih vrsta. Tada dolazi do neuravnoteženog stvaranja slobodnih radikala i premašivanja mogućnosti neke stanice da ih razgradi, što rezultira oštećenjem stanica.

Otkrivanje novih prirodnih antioksidansa i inhibitora enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze moglo bi imati važnu ulogu u prevenciji štetnih oksidacijskih procesa i ublažavanju simptoma kod neurodegenerativnih oboljenja poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. U ovom istraživanju korištena je biljka gavez (*Symphytum officinale* L.).

Cilj ovog rada bio je odrediti sadržaj ukupnih fenola, ispitati antioksidacijska svojstava i sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE) vodenog, metanolnog i diklormetanskog ekstrakta biljke.

Sadržaj ukupnih fenola određen je primjenom Folin-Ciocalteu metode, antioksidacijska aktivnost je ispitana metodama hvatanja slobodnih radikala (DPPH) i mjerenjem redukcijskog potencijala (FRAP), dok je sposobnost inhibicije kolinesteraza određena metodom po Ellmanu. Vodeni ekstrakt je pokazao relativno dobra antioksidacijska svojstva. Uzorci nisu pokazali inhibicijski potencijal na kolinesteraze.

Ključne riječi: vodeni ekstrakt, antioksidacija, gavez, inhibicija kolinesteraza

SUMMARY

Oxidation stress is defined as the shift of equilibrium in cellular oxidation-reduction reactions in the direction of oxidation. This is a state of excessive creation or inadequate removal of reactive oxygen species. Then there is an imbalance in the creation of free radicals and overcoming the ability of a cell to disrupt them, resulting in cell damage.

Detection of new natural antioxidants and acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzyme inhibitors could play an important role in the prevention of harmful oxidation processes and the alleviation of symptoms in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's and Parkinson's disease. In this study, a comfrey plant (*Symphytum officinale L.*) was used.

The aim of this paper was to determine the content of total phenols, to examine the antioxidant properties and the ability to inhibit the acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) enzymes of the aqueous, methanolic and dichloromethane extract of the plant.

The content of total phenols was determined using the Folin-Ciocalte method, antioxidant activity was tested by free radical capture methods (DPPH) and measurement of reduction potential (FRAP), while the ability of cholinesterase inhibition was determined by Ellman's method. The aqueous extract showed relatively good antioxidant properties. Samples did not show inhibitory potential on cholinesterase.

Keywords: aqueous extract, antioxidation, comfrey, cholinesterase inhibition

SADRŽAJ

1. UVOD **1**

2. OPĆI DIO **2**

2.1. Gavez **2**

2.2. Oksidacijski stres **5**

2.2.1. Slobodni radikali **6**

2.2.2. Antioksidansi **7**

2.3. Alzheimerova bolest **9**

2.4. Acetilkolin **11**

2.5. Acetilkolinesteraza **13**

2.6. Butirilkolinesteraza **15**

3. PREGLED KORIŠTENIH TEHNIKA I METODA **17**

3.1. Metode izolacije biološki aktivnih spojeva **17**

3.1.1. Ekstrakcija **17**

3.1.2. Ultrazvučna ekstrakcija **18**

3.2. Spektrofotometrijske metode **20**

3.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola primjenom Folin-Ciocalteu metode **21**

3.2.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka metodom vezivanja DPPH radikala **22**

3.2.3. Metoda mjerenja redukcijskog potencijala **23**

3.2.4. Ispitivanje sposobnosti inhibicije kolinesteraza metodom po Ellmanu **24**

4. EKSPERIMENTALNI DIO **26**

4.1. Biljni materijal **26**

4.2. Aparatura i pribor **27**

4.3. Priprava otopina s biljnim materijalom **27**

4.4. Priprava otopina potrebnih koncentracija **28**

4.5. Određivanje ukupnih fenola po Folin-Ciocalteu **29**

4.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti vezivanjem slobodnog radikala DPPH metodom **30**

4.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom **30**

4.8. Ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima AChE i BChE metodom po Ellmanu **32**

5. REZULTATI **34**

5.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola primjenom Folin-Ciocalteu metode **34**

5.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka DPPH metodom **35**

5.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka FRAP metodom **36**

5.4. Sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE mjerena metodom po Ellmanu **37**

6. RASPRAVA **38**

7. ZAKLJUČAK **39**

8. LITERATURA **40**

1. UVOD

Antioksidansi su molekule sposobne za inhibiciju oksidacije drugih molekula. Antioksidansi mogu započeti lančanu reakciju, a kada dođe do lančane reakcije u stanici, može doći do oštećenja stanice ili može doći do njenog uništenja. Iako su reakcije oksidacije neophodne za život, jednako tako mogu biti i štetne. U biljnom i životinjskom svijetu može se naći čitav niz različitih vrsta antioksidanta. Neki od njih su vitamin C, vitamin E, polifenoli i flavonoidi.

Današnji način života, koji podrazumijeva velika mentalna opterećenja, nedovoljne količine sna, jednoličnu prehranu i uživanje prekomjernih količina alkohola, kave i cigareta, uvelike doprinosi povećanju oksidacijskog stresa u našem organizmu.

Alzheimerova bolest (AB) je progresivna neurodegenerativna bolest središnjeg živčanog sustava koja se očituje gubitkom živčanih stanica u moždanoj kori s posljedičnom atrofijom mozga i progresivnom demencijom. Smatra se da dolazi do poremećaja metabolizma neurotransmitera acetilkolina koji utječe na učenje i pamćenje te se povećanjem njegove koncentracije može utjecati na ublažavanje simptoma AB.

Brojne biljne vrste su izvrstan izvor prirodnih antioksidanta koji su neophodni za očuvanje ukupnog zdravlja organizma jer su sposobni stabilizirati i inaktivirati slobodne radikale prije nego što napadnu i oštete stanice. Ovaj rad je usmjeren ka pronalasku potencijalno biološki aktivnih spojeva iz prirode i potencijalni inhibitora kolinesteraza.

2. OPĆI DIO

2.1. Gavez

Gavez (lat. *Symphytum officinale* L.) je višegodišnja biljka s ljubičastim ili ružičastim cvjetovima. Pripada porodici boražinovki (porečnice, oštrolisti, lat. *Boraginaceae*). Neki od narodnih naziva ove biljke su: crni gavez, konsul veli, jezik volovni, kilnjak te opašica.[1] U tablici 1. prikazana je taksonomija biljke.

Tablica 1. Taksonomija biljke gavez

TAKSONOMIJA	NAZIV
Carstvo	*Plantae*
Koljeno	*Magnoliophyta*
Razred	*Magnoliopsida*
Red	Nije pridružen
Porodica	*Boraginaceae*
Rod	*Symphytum*
Vrsta	*S.officinale* L.

Gavez ima sočnu, grubo dlakavu stabljiku, visine 20-100 cm. Višegodišnji korijen gaveza raste vrlo duboko u zemlji, debeo je i razgranat, vretenast i sočan. Izvana je tamno smeđe do crne boje, a iznutra bijele do svijetlo žute boje. Donji listovi su veliki s peteljkom, duguljasti i grubo dlakavi. Listovi na stabljici su naizmjenično poredani i grubo dlakavi po cijeloj površini. Cvjetovi izbijaju tijekom ljeta iz pazuha gornjih listova, a okrenuti su prema dolje u jednostrano povijenim cvatovima. Imaju oblik uskog zvona, a boja im je prljavo bijela, ružičasta ili ljubičasta.

Gavez cvate od svibnja do srpnja. Nalazi se na vlažnim mjestima, jarcima, uz vode i na vlažnim livadama. Za poljoprivrednike predstavlja korov što se teško iskorjenjuje (zbog dužine korijena). Za lijek se sakupljaju listovi i korijen.



Slika 1. Gavez (*Symphytum officinale* L.)[2]

Od domaćih ljekovitih biljaka gavez sadrži alantoin, tvar što ponajviše djeluje u stvaranju novih stanica, zbog čega se gavez koristi u liječenju rana, čak i zapuštenih gnojnih rana. Njime se liječe sve vrste ozljeda: ispucalost, posjekline, lom kostiju, izljev krvi i sl. Korijen gaveza djelotvoran je u liječenju raznih poteškoća probavnih organa, bolesti bubrega i kod menstrualnih bolova.

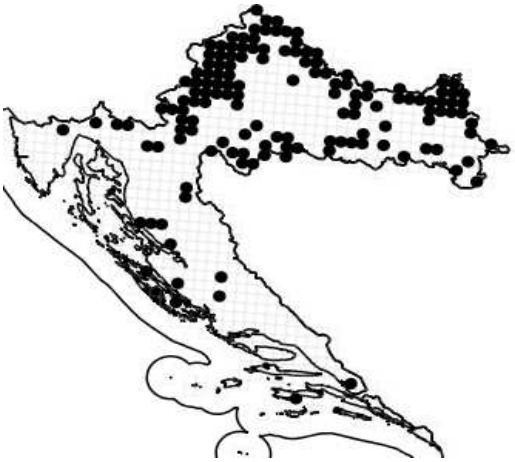
Svježu biljku najbolje je brati tijekom cvjetanja. Korijen i listovi se sakupljaju u proljeće ili jesen, a koriste se svježi ili osušeni. Prije sušenja na toplom i prozračnom mjestu ili u sušionici, korijen je potrebno razrezati na komade veličine oko 15 centimetara, a sušenje obaviti u što kraćem vremenskom razdoblju kako bi se spriječio proces fermentacije djelatnih tvari. Osušeno korijenje i listovi čuvaju se na suhom mjestu.

Listovi ljekovitog gaveza sadrže karotin, alkaloide, kalij i vitamin C. Korijen sadrži tanine, sluz, škrob, alantoin, inulin, kolin, triterpene i alkaloide. Ljekovito djelovanje alantoina postiže se u kombinaciji s biljnim hormonom auksinom. Ljekoviti gavez sadrži i tanine, glikozide, smolu, eterično ulje i asparagin.[3]



Slika 2. Biljka gavez[2]

Ljekoviti gavez se koristi samo za vanjsku primjenu. Ne uzima se oralnim putem jer može djelovati toksično na organizam. Glavni ljekoviti spoj je alantoin koji ima sposobnost regeneracije tkiva, stimulira stanični rast i pomaže u epitelizaciji kože. Korijen gaveza zacjeljuje zglobove, liječi reumatske bolove, iščašenja, uganuća, kontuzije, modrice, tvrde otekline, hemoroide, proširene vene i grčeve u želucu. Listovi gaveza imaju pozitivan učinak na liječenje iščašenja, uganuća te za ublažavanje reumatskih bolova. U kozmetici se koristi za zatezanje kože i uklanjanje bora, no nije za dugu primjenu jer jako isušuje kožu.

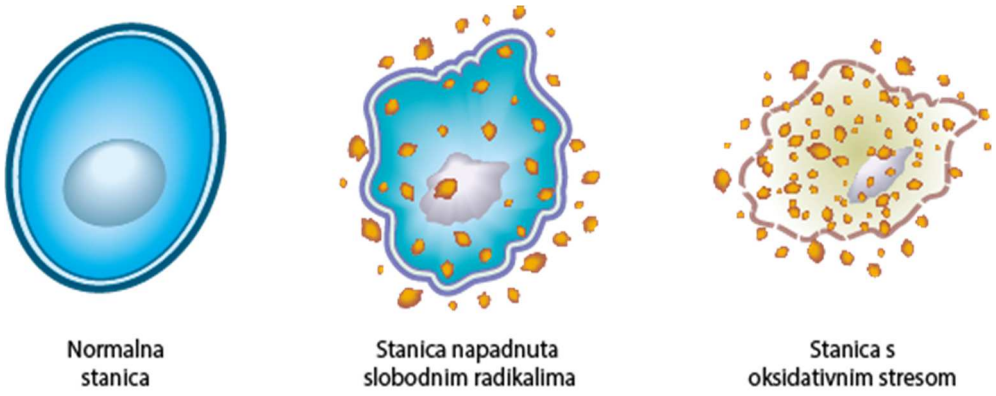


Slika 3. Rasprostranjenost gaveza po Republici Hrvatskoj[4]

2.2. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres definira se kao pomak ravnoteže u staničnim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Riječ je o stanju prekomjernog stvaranja ili nedovoljno učinkovitog uklanjanja reaktivnih kisikovih vrsta. Tada dolazi do neuravnoteženog stvaranja slobodnih radikala i premašivanja mogućnosti neke stanice da ih razgradi, što rezultira oštećenjem stanica.[5]

Oksidacijsko oštećenje može utjecati na strukturu i funkciju brojnih biomolekula (polinezasićenih lipida, ugljikohidrata, proteina i nukleinskih kiselina), što konačno rezultira promjenama u strukturi i funkciji stanica, tkiva i organa. Tako nastala oštećenja mogu narušiti homeostazu iona, prijenos signala u stanici, gensku transkripciju i dovesti do drugih poremećaja. Oksidacijski stres povezuje se sa starenjem i raznim kardiovaskularnim i infektivnim bolestima, uključujući rak, multiplu sklerozu, Parkinsovu i Alzheimerovu bolest, kao i autoimune bolesti.



Slika 4. Oksidacijsko oštećenje stanice[6]

2.2.1. Slobodni radikali

Slobodni radikali su atomi, ioni ili molekule s jednim ili više nesparenih elektrona u vanjskoj ljusci. Nastaju homolitičkim cijepanjem kovalentne veze, pri čemu svaki elektron ostaje vezan u susjednom atomu. Zbog nesparenog elektrona, slobodni radikali su kemijski jako reaktivni pa imaju nisku specifičnost za reaktante. Kao posljedica toga u kemijskoj reakciji oksidacije, brzo se i nepredvidivo spajaju s bilo kojom prostorno bliskom molekulom proteina, lipida, ugljikohidrata ili nukleinske kiseline. Vezivanjem slobodnih radikala na spomenute organske molekule mogu nastati novi radikali s mogućnošću pokretanja novog niza ne-enzimskih lančanih reakcija.

Biološki najznačajniji radikali su ***reaktivne kisikove vrste*** (engl. *reactive oxygen species*, **ROS**) što je zajednički naziv za radikale kisika kao i njegove reaktivne neradikalne derivate, a koje su prikazane u tablici 2. Reaktivne kisikove vrste mogu uzrokovati lipidnu peroksidaciju, oštećenje DNA i proteina te oksidirati gotovo svaku organsku molekulu.

Tablica 2. Reaktivne kisikove vrste (**ROS**)

RADIKALI	NERADIKALI
- superoksid radikal anion, $O_2^{\bullet -}$	- vodikov peroksid, H_2O_2
- hidroksilni radikal, $OH^{\bullet}$	- hipokloritna kiselina, HOCl
- peroksilni radikal, $RO_2^{\bullet}$	- ozon, O_3
- alkoksilni radikal, $RO^{\bullet}$	
- hidroperoksilni radikal, $HO_2^{\bullet}$	

Uz reaktivne kisikove spojeve, veliku važnost imaju i ***reaktivne dušikove vrste*** (engl. *reactive nitrogen species*, **RNS**) koje su prikazane u tablici 3.

Tablica 3. Reaktivne dušikove vrste (**RNS**)

RADIKALI	NERADIKALI
-dušikov(II) oksid, NO -dušikov(IV) oksid, NO_2	-nitrozil, NO^+ -nitritna kiselina, HNO_2 -peroksinitrit, $ONOO^-$ -alkilperoksinitrit, ROONO

Izvori slobodnih radikala mogu biti endogeni i egzogeni. Endogeni slobodni radikali u organizmu mogu nastati tijekom metabolizma kisika, fagocitoze, kemotaksije, apoptoze, koagulacije, hipoksije ili hiperoksije. Egzogeni izvori slobodnih radikala su dim cigareta, lijekovi, prehrana, pesticidi, te radioaktivno ili UV-zračenje.

2.2.2. Antioksidansi

U obrani protiv slobodnih radikala pomažu nam antioksidansi. Kao normalni sastojci prehrane spominju se svakodnevno, ali se gotovo nikad ne razmišlja o tome kako oni djeluju na staničnoj razini. Antioksidansi su molekule sposobne za inhibiciju reakcije oksidacije drugih molekula, prilikom koje mogu nastati slobodni radikali.[7] Djeluju na dva načina, izravnom enzimskom katalizom ili reagiraju sa slobodnim radikalima dajući im elektron i neutralizirajući ih.

Mogu biti endogeni (nastaju u metaboličkim procesima) i egzogeni koji se u organizam najčešće unose putem prehrane.

- endogeni antioksidansi
    a) enzimi: citokrom oksidaza, superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GSH), katalaza
    b) neenzimski antioksidansi: glutation, transferin, koenzim Q, bilirubin
- egzogeni antioksidansi
    a) topljivi u vodi: vitamin C, selen, cink
    b) topljivi u lipidima: α-tokoferol, karotenoidi (β-karoten, lutein, likopen)

Ovisno o vrsti mehanizma kojim se opisuje njihovo djelovanje, dijele se na:

- antioksidanse prvog reda (hvatači slobodnih radikala)
    - djeluju tako da predaju radikal vodika (H·) peroksil− i alkoksil− radikalima nastalim u fazi propagacije lančane reakcije autooksidacije,
- antioksidanse drugog reda (preventivni)
    - ovaj mehanizam uključuje vezivanje slobodnih radikala koji iniciraju lančanu reakciju (na primjer: keliranjem iona metala koji djeluju kao katalizatori ili uklanjanjem kisika iz sustava regeneracijom primarnog antioksidansa).

Danas su antioksidansi široko rasprostranjeni u prehrambenoj industriji, industriji kozmetičkih preparata, farmaceutskoj industriji te medicini.[8]

2.3. Alzheimerova bolest

Demencija (lat. *de* – bez, *mens* – um) obuhvaća opće, uznapredovalo propadanje intelektualnih funkcija. Najčešći uzrok demencije jest upravo Alzheimerova bolest (AB).

Alois Alzheimer je 1906. godine prvi puta opisao sindrom demencije kao psihički poremećaj koji je po njemu dobio ime Alzheimerova bolest (demencija, engl. *Alzheimer's disease,* AD). Spominjanje ove bolesti je ranije bilo rijetko, postavljanje dijagnoze još rjeđe, a sada je vodeća bolest današnjice, prisutna od 1-3% do čak 11% svjetske populacije u dobi iznad 70 godina.[9]

Prema podatcima Međunarodnog udruženja za Alzheimerovu bolest (ADI – *Alzheimer's Disease International*) i Europskog udruženja za AB (*Alzheimer Europe*) za 2012. godinu, koji su uzeli u obzir podatke popisa stanovništva u Republici Hrvatskoj 2011. godine, procjena je da je tada od demencije bolovalo 80.864 osoba (1,89 % stanovništva).[10]

Epidemiološke studije su pokazale da je starenje najveći čimbenik u nastanku ove bolesti, uz pozitivnu obiteljsku anamnezu. Postoje brojne studije koje su pokušale povezati Alzheimerovu bolest s negenskim čimbenicima rizika, a najveća se važnost pridaje starijoj životnoj dobi, utjecaju nižeg obrazovanja, traumi glave, ženskom spolu i izloženosti emocionalnom stresu, ali ni jedna studija nije dokazala uzročno-posljedičnu vezu, već samo eventualnu supojavnost. Alzheimerova bolest je bolest stanica moždane kore i okolnih struktura, a karakterizira je brza progresivnost i ireverzibilnost, te oštećenja živčanih stanica. AB se karakterizira gubitkom neurona te nastankom senilnih plakova i neurofibrilarnih petlji.

Kolinergička hipoteza se temelji na pretpostavci da je AB uzrokovana poremećajem metabolizma neuroprijenosnika acetilkolina koji utječe na učenje i pamćenje. Smatra se da dolazi do deficita kolin acetiltransferaze, enzima odgovornog za sintezu acetilkolina, te da se povećanjem njegove koncentracije može utjecati na ublažavanje simptoma AB. Većina današnjih lijekova su rezultat ove hipoteze. Takrin, donepezil, rivastigmin i galantamin su inhibitori AChE odobreni za kliničku uporabu kod tretiranja bolesti.

Amiloidna hipoteza postavljena je početkom devedesetih godina 20. stoljeća i odnosi se na slijed događaja u kojem je beta-amiloid (βA), peptid koji nastaje kao produkt

patološke razgradnje amiloidnog prekursornog peptida (APP) beta sekretazom i gama sekretazom glavni „krivac“ za nastanak ove bolesti.[11, 12]

Ova bolest se manifestira kao zaboravljivost, izgubljenost u vremenu i prostoru, nemogućnost samostalnog življenja, što dovodi do potpune ovisnosti o stalnoj skrbi i njezi druge osobe.

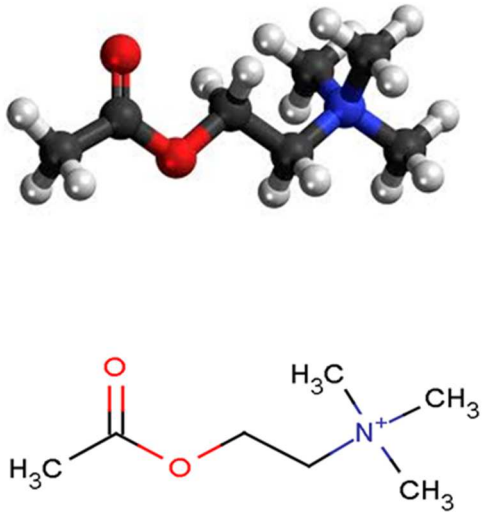
Liječenje je ograničeno samo na ublažavanje pojedinih popratnih simptoma (nesanica, akutna i kronična psihička i motorička uznemirenost, depresivnost i sl.), dok su svi pokušaji da se pronađu tvari koje bi mogle izliječiti bolest za sada bez rezultata. Prosječno razdoblje njezina razvoja jest osam do dvanaest godina. Razvoj bolesti dijeli se u tri osnovna stadija: rani, srednji i kasni. Granice između pojedinih stadija nisu oštre, kao što su i simptomi individualno vrlo različiti.

Na postojanje demencije upućuje pojava kognitivnih smetnji i otežanog obavljanja svakodnevnih obveza, a budući da bolesnik često nije svjestan svojih smetnji, podatci se trebaju prikupljati od članova obitelji ili skrbnika. Simptomi koji upućuju na bolest jesu: gubitak pamćenja, posebice za nedavne događaje (kratkotrajna memorija), zapuštanje vanjskog izgleda, poteškoće u učenju i zapamćivanju novih informacija, poteškoće u vremenskoj i prostornoj orijentaciji, u izvršavanju složenijih zadataka, poteškoće u računanju, poremećaj sposobnosti prosuđivanja, poremećaj govora i ponašanja.

2.4. Acetilkolin

Acetilkolin (engl. *acetylcholine,* ACh), prikazan na slici 5., je prvi otkriveni neuroprijenosnik. Izlučuje se u autonomnom živčanom sustavu, u neuromišićnoj spojnici i brojnim sinapsama središnjeg živčanog sustava. ACh se sintetizira iz kolina i acetil-koenzima A (acetil-CoA) uz prisustvo enzima kolin-acetil transferaze.

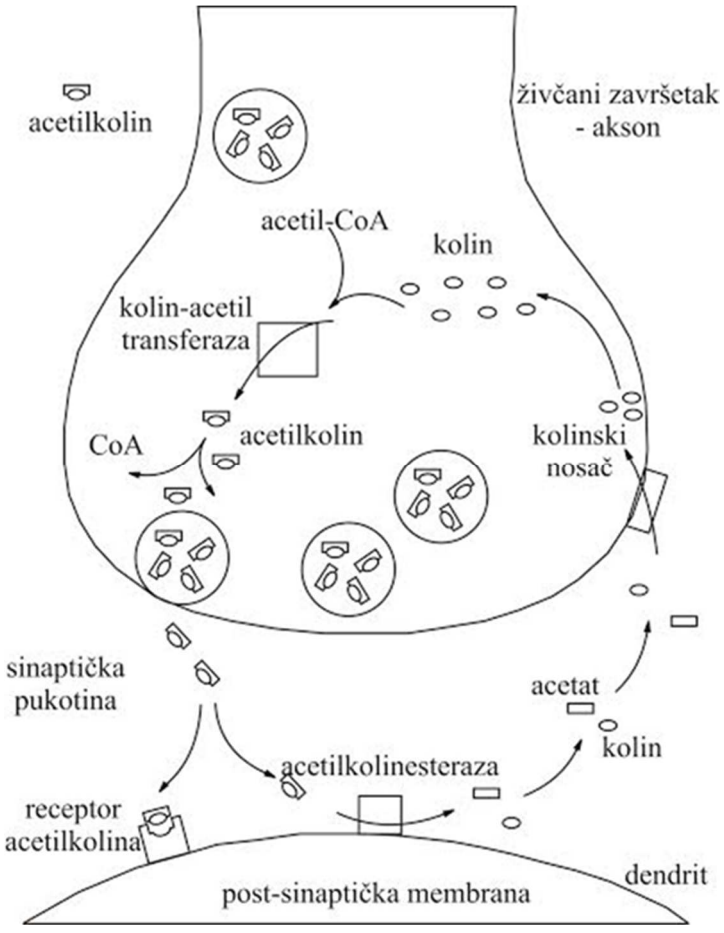
Dva su tipa receptora za acetilkolin, nikotinski i muskarinski. Kako se acetilkolin uklanja razgradnjom, a ne difuzijom iz sinaptičke pukotine, njegovom hidrolizom acetilkolinesteraza (engl. *acetylcholinesterase,* AChE) kontrolira prijenos živčanih impulsa u kolinergičkoj sinapsi centralnog i perifernog živčanog sustava.



Slika 5. Kemijska struktura acetilkolina

Naime, dolazak živčanog impulsa uzrokuje ispuštanje acetilkolina iz sinaptičkog mjehurića predsinaptičke membrane u sinaptičku pukotinu gdje se zatim veže na kolinergičke receptore (nikotinski i muskarinski receptori) koji su vezani na postsinaptičku membranu kolinergičke sinapse ili na mišićne stanice.

Vezanjem acetilkolina pokreće se niz procesa koji rezultiraju depolarizacijom membrane i daljnjim prijenosom signala odnosno živčanog impulsa. Brzom razgradnjom acetilkolina u sinaptičkoj pukotini djelovanjem AChE, ponovno se uspostavlja polarizacija postsinaptičke membrane i prijenos impulsa prestaje.[13]

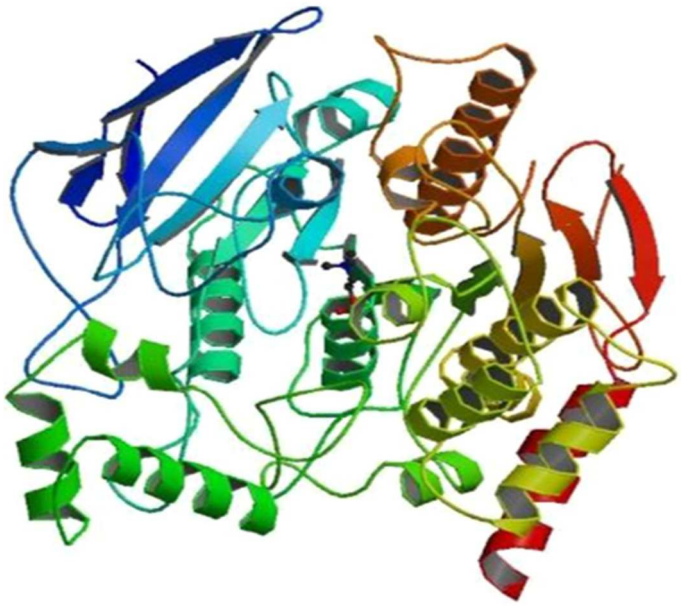


Slika 6. Shematski prikaz kolinergičke sinapse i kružnog ciklusa acetikolina[14]

2.5. Acetilkolinesteraza

Acetilkolinesteraza (engl. *acetylcholinesterase,* AChE) je enzim koji pripada skupini serinskih esteraza. Njezina je fiziološka uloga hidroliza neuroprijenosnika acetilkolina (ACh) tijekom prijenosa živčanih impulsa.

Redovito se može naći u sinapsama te u živčanim i glija stanicama ljudskog mozga. Sintetizira se u koštanoj srži, mozgu i mišićima, a uz živčane stanice, mišiće i mozak, AChE se nalazi i u krvi gdje je vezana na eritrocite.



Slika 7. 3D-struktura acetilkolinesteraze (PDB-2ace) [15]

Struktura i mehanizam djelovanja

AChE, tzv. "prava kolinesteraza" je složen protein čiju osnovnu strukturu čini 12 *ß*-nabranih ploča okruženih s 14 *α*-uzvojnica što je klasificira u skupinu hidrolaza *α*/*ß*-strukture (slika 7.). AChE je polimorfni enzim, vezan na membrane stanica preko kolagenske uzvojnice, sastavljen od globularnih katalitičkih podjedinica, svaki mase 70-80 kDa.

Te podjedinice se grupiraju u oligomerne strukture koje se dijele na dvije klase: globularne strukture (sastavljene od monomera, dimera ili tetramera) i asimetrične strukture (koje se dijele u tri posebne grupe: katalitičke, kolagenske i nekolagenske podjedinice.[17]

Inhibicija

AChE inhibitori se uglavnom koriste kao lijekovi (farmaceutici) i insekticidi. Nije zanemariva ni njihova primjena u obliku neurotoksičnih bojnih otrova (tabun, soman, VX, sarin, uglavnom sintetički spojevi) te kod tradicionalnih obrednih ubojstava ili mučenja (u nekim dijelovima svijeta). Medicinska primjena podrazumijeva korištenje inhibitora AChE kako bi se ublažio nedostatak ACh dok je najstarija primjena bila u oftalmologiji za tretiranje očnog tlaka - glaukoma (nakupljanje tekućine u oku zbog nedovoljnog odvođenja.[14]

2.6. Butirilkolinesteraza

Butirilkolinesteraza (BChE) je enzim koji se sintetizira u jetri i nakon toga se izlučuje u krv. Pripada skupini kolinesteraza odnosno esteraza. Esteraze spadaju u grupu hidrolaza. One cijepaju estere na kiseline i alkohol kemijskom reakcijom koju nazivamo hidroliza. Osim u plazmi i u jetri aktivnost enzima dokazana je i u drugim tkivima, poput masnog tkiva, tankog crijeva, pluća i bijele tvari mozga.[16]



Slika 8. Struktura butirilkolinesteraze (PDB: 1P0I)[17]

Njena fiziološka uloga nije poznata. Pretpostavlja se da sudjeluje u metabolizmu lipida i lipoproteina te u hidrolizi butirilkolina, intermedijernog metabolita koji nastaje tijekom metabolizma ne-esterificiranih masnih kiselina u jetri. Isti enzim sudjeluje i u prijenosu spore živčane provodljivosti, dok u sinapsama u središnjem živčanom sustavu razgrađuje acetilkolin.[18] Pored svoje uloge u metabolizmu lipida, promjene butirilkolinesteraze (BChE) uočene su u bolesnika koji imaju različite neoplazme, poput karcinoma pluća i novotvorine stanica hematopoetskog sustava. Aktivnost BChE smanjena je kod bolesnika s malignim tumorima želudca, debelog crijeva i prostate.

Razlika između AChE i BChE je u specifičnosti prema pojedinim supstratima i ponašanju u suvišku istih, kao i u njihovoj raspodjeli u tkivima. AChE vrlo brzo razgrađuje acetilkolin, dok je mnogo manje aktivna na butirilkolin. BChE je specifičnija za butirilkolin, ali razgrađuje i acetilkolin i propionilkolin. Uz suvišak ACh dolazi do inhibicije AChE dok kod BChE dolazi do aktivacije. Nadalje, postoje različiti specifični inhibitori koji inhibiraju jedan, a ne i drugi enzim i obratno. Poznato je da je AChE rasprostranjena u većim količinama u mozgu, mišićima i u eritrocitnim membranama, dok se BChE većinom nalazi u jetri, crijevima, srcu, bubrezima i plućima.

Kod mnogih organizama kao što su ljudi, konji i miševi postoji velika aktivnost BChE u plazmi dok štakori u plazmi imaju mnogo veću aktivnost AChE. AChE i BChE dijele oko 65 % aminokiselinskog slijeda i imaju slične molekularne oblike i strukturu aktivnog mjesta iako se genetski kodiraju na različitim kromosomima. Glavna funkcija AChE je brza razgradnja ACh u kolinergičnim sinapsama i to je ujedno i jedan od najbržih poznatih enzima.[14]

3. PREGLED KORIŠTENIH TEHNIKA I METODA

3.1. Metode izolacije biološki aktivnih spojeva

3.1.1. Ekstrakcija

Ekstrakcija je tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topljivost u različitim otapalima. Bilo da se radi o ekstrakciji iz tekuće ili iz čvrste faze, organsko otapalo koje se primjenjuje za ekstrakciju treba zadovoljiti sljedeće uvjete:

- otapalo mora biti kemijski inertno prema prisutnim tvarima,
- tvar koja se ekstrahira mora imati što bolju topljivost u tom otapalu
- otopina iz koje se ekstrahira željena tvar i otapalo moraju se što više razlikovati u gustoći,
- otapalo ne smije imati previsoko vrelište kako bi se, nakon ekstrakcije, moglo lako ukloniti,
- otapalo mora biti što manje zapaljivo, neotrovno i jeftino.

Otapala koja se najčešće koriste za ekstrakciju u organskom laboratoriju su: dietil-eter, kloroform, petroleter, diklormetan itd.[19]

Za vrijeme ekstrakcije odvija se prijenos mase, tj. otopljene tvari prelaze iz materijala (u ovom slučaju biljnog materijala) u otapalo. Prijenos mase odvija se u tri stupnja:

1. željena komponenta se otapa u otapalu

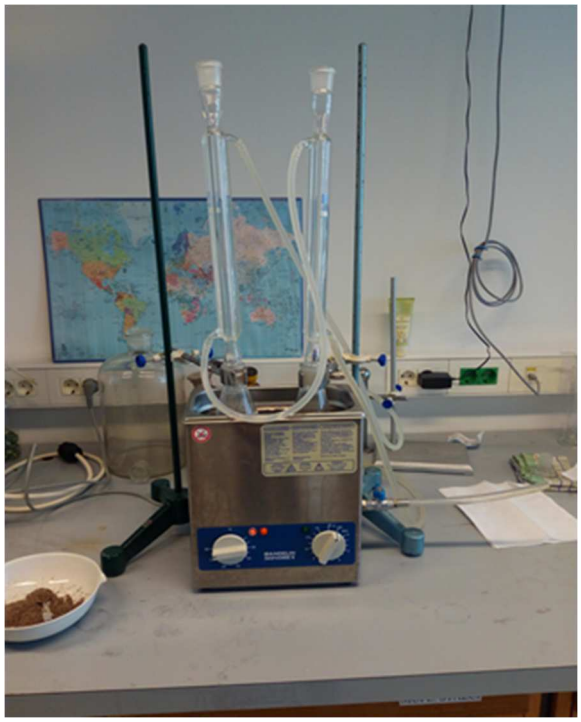
2. smjesa otopljene tvari i otapala prelazi iz materijala na površinu

3. otopljena tvar se raspršuje u volumenu otapala.

3.1.2. Ultrazvučna ekstrakcija

Kod ultrazvučno potpomognute ekstrakcije (engl. *ultrasound assisted extraction*, USE) ekstrakcija je olakšana upotrebom ultrazvuka (visoko-frekventni pulsevi, 20kHz). Ultrazvuk je dio zvučnog spektra od 20kHz do 10MHz. Širi se putem valova pri čemu uzrokuje vibracije molekula medija i prijenos mehaničke energije titranja valova na medij.

Ultrazvučni valovi putuju kroz medij i uzrokuju ekspanzijske i kompresijske cikluse. Ekspanzija razdvaja molekule, a kompresija ih združuje. Ekspanzija može uzrokovati kavitacijske mjehuriće u tekućini i proizvesti negativan tlak. Mjehurići se formiraju, rastu i konačno pucaju. U blizini čvrste granice pucanje je asimetrično i proizvodi brze mlaznice tekućine kroz koje snažno djeluju na površinu i uzrokuju veće prodiranje otapala u uzorak i ubrzavaju prijenos mase.[20]



Slika 9. Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučne kupelji (slika 9.) se često koriste u laboratorijima jer su lako dostupne i relativno jeftine. Obično su elementi pretvornika smješteni na dnu spremnika, te oni prenose vibracije direktno tekućini koja je u spremniku. Prednosti postupka ultrazvučne ekstrakcije su njena relativna brzina, jednostavnost, smanjenje čestica, ubrzani prijenos mase tvari i to što ne zahtijeva skupe instrumente, a nedostaci veliki volumen otapala i moguća potreba višekratne ekstrakcije. Ekstrakti se nakon završene ekstrakcije moraju filtrirati.

Mehanički učinak ultrazvuka, tj. djelovanje kavitacija na staničnu stijenku biljke, dovodi do oštećenja stijenke, čime se poboljšava prijenos mase i olakšava pristup otapala staničnom sadržaju dajući tako veći prinos ekstrakcije.[20]

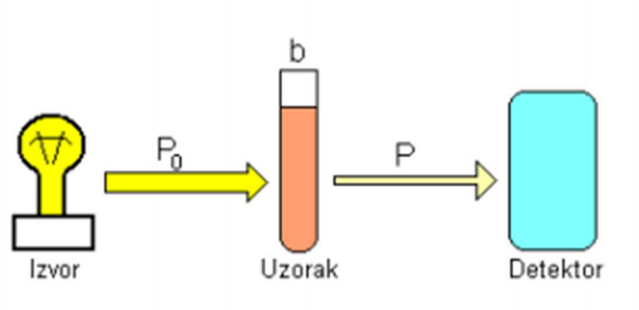
3.2. Spektrofotometrijske metode

Spektrofotometrija je tehnika kojom se mjeri transmitancija emitiranog elektromagnetskog zračenja kroz ispitivani uzorak, tj. apsorbancija tog istog uzorka pri određenoj valnoj duljini (slika 10.). Uređaj za mjerenje apsorbancije naziva se spektrofotometar.

Transmitancija (T) otopine definira se kao dio upadnog zračenja koji je prošao kroz otopinu:

$$T = \frac{P}{P_o} \qquad [1]$$

gdje je P_0 ulazna snaga snopa svjetlosti, a P snaga snopa svjetlosti nakon apsorpcije.



Slika 10. Prigušivanje snopa zračenja kao rezultat apsorpcije u otopini

Apsorbancija (A) se definira jednadžbom [2]:

$$A = -log_{10}T = -log\frac{P}{P_o} = log\frac{P_o}{P} \qquad [2]$$

Funkcijski odnos između veličine mjerene apsorpcijskom metodom i one koja se određuje (koncentracija c) poznat je kao ***Lambert - Beerov zakon*** [3]:

$$A = log\frac{P_o}{P} = a \cdot b \cdot c \qquad [3]$$

gdje je a konstanta proporcionalnosti-apsorptivnost (apsorpcijski koeficijent), b duljina puta zračenja kroz uzorak, a c je koncentracija apsorbirajuće vrste. Budući da je apsorbancija veličina bez dimenzija, jedinice za apsorpcijski koeficijent određuju se uz pretpostavku da je lijeva strana jednadžbe bezdimenzijska.[21]

3.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola primjenom Folin-Ciocalteu metode

Folin-Ciocalteu metoda je spektrofotometrijska metoda koja se temelji na oksidaciji fenolnih skupina do kinona dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa (FC) te nastajanju plavo obojenog produkta.

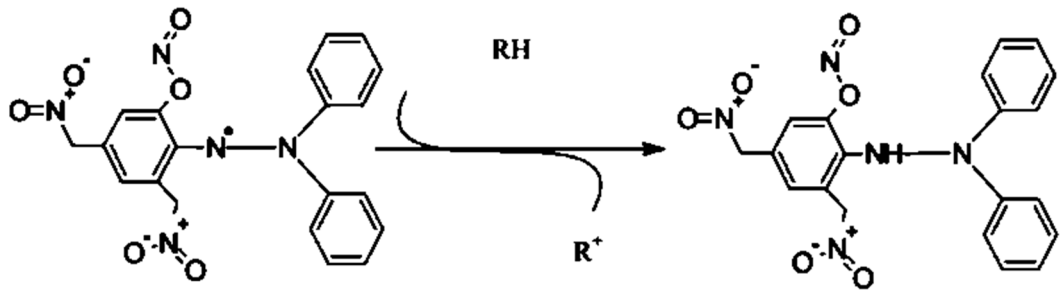
FC reagens je žuto obojena smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline koja ne sadrži fenole. Potpuna kemijska priroda reakcije nije poznata, ali se smatra da dolazi do heteropolifosfovolframat molibdat redukcijskih reakcija reverzibilnih izmjena jednog ili dva elektrona što dovodi do nastanka obojenih spojeva, s maksimalnom apsorpcijom pri valnoj duljini od 765 nm. Fenolni spojevi reagiraju s Folin-Ciocalteu reagensom pod uvjetom da je pH otopine 10, što se postiže dodatkom Na_2CO_3. Pri toj pH vrijednosti fenoli disociraju proton i prelaze u fenolat anion, koji je potom sposoban reducirati FC reagens.

Na osnovu izmjerene apsorbancije uzorka iz prethodno načinjene baždarne krivulje očita se sadržaj ukupnih fenola u ispitivanom uzorku. Baždarna se krivulja dobiva mjerenjem apsorbancije uzorka različitih koncentracija galne kiseline u reakciji s Folin-Ciocalteu reagensom.

Unatoč nedovoljno razjašnjenoj kemijskoj prirodi FC, metoda je pouzdana, jednostavna i ponovljiva za određivanje fenolnih antioksidansa.

3.2.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka metodom vezivanja DPPH radikala

Metoda hvatanja slobodnih 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH) jedna je od najčešće korištenih metoda za određivanje sposobnosti hvatanja slobodnih radikala i temelji se na sposobnosti ekstrakta da smanji aktivnost DPPH radikala. Ne ovisi o polarnosti antioksidansa, već samo o njegovoj strukturi. Mehanizam reakcije DPPH radikala je prikazan na slici 11.



Slika 11. Mehanizam reakcije DPPH radikala s antioksidansom[22]

Alkoholna otopina DPPH• se reducira u prisutnosti antioksidansa i pri tome dolazi do nastanka neradikalnog oblika (DPPH-H). Ova se metoda temelji na redukciji stabilnog radikala DPPH•, koji radi nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra. Sparivanjem elektronskog para stabilnog radikala DPPH• u prisutnosti elektron donora (antioksidans, koji hvata slobodne radikale), ljubičasta se boja mijenja u žutu. Nastali spoj ima smanjeni intenzitet apsorpcije u vidljivom dijelu spektra, a rezultirajuće obezbojenje je u stehiometrijskom odnosu s brojem sparenih elektrona.[23]

Redukcija se prati smanjenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 517 nm i moguće je mjerenjem vrijednosti apsorbancije odrediti postotak redukcije DPPH• sljedećim izrazom:

$$\% \text{ redukcije} = (A_K - A_A / A_K) \times 100 \qquad [4]$$

gdje je A_A apsorbancija otopine s dodanim antioksidansom (mjerena 1 sat nakon dodatka), a A_K je apsorbancija čiste otopine (kontrolni uzorak).

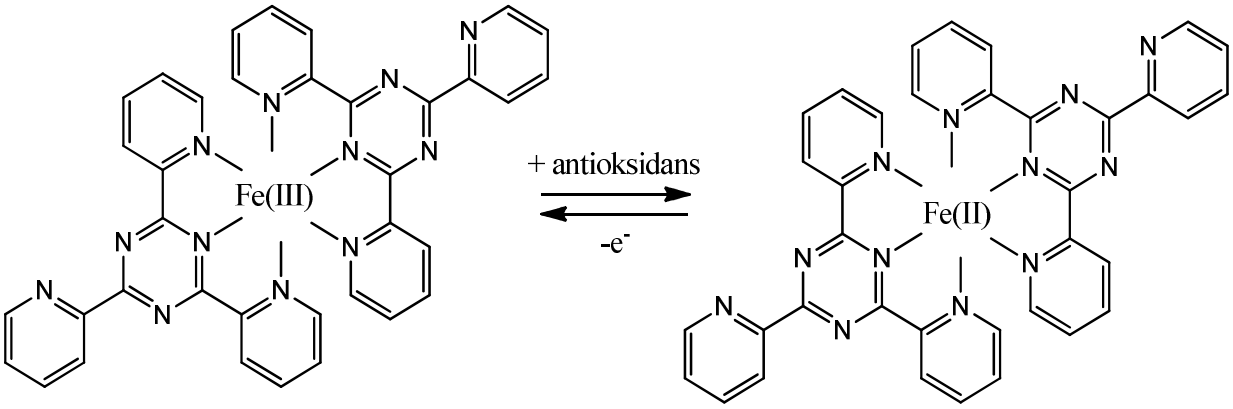
3.2.3. Metoda mjerenja redukcijskog potencijala

FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power – antioksidativna moć redukcije željeza*) metoda je jednostavna i brza, indirektna metoda mjerenja ukupnog redukcijskog potencijala. Temelji se na redukciji Fe^{3+} iona u Fe^{2+} ion u prisutnosti antioksidansa, a mehanizam djelovanja FRAP reakcije je prikazan na slici 12.

FRAP metoda je kolorimetrijski temeljena na redoks sustavu gdje se neenzimski antioksidansi (npr. vitamin C, bioflavonoidi) koriste kao reducensi.

Nastali Fe^{2+} ioni u prisutnosti 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ reagens) tvore stabilni kompleks, koji apsorbira pri 593 nm i nastaje plavo obojenje čiji intenzitet ovisi o količini antioksidansa u uzorku. Reakcija se odvija u kiselom (pH = 3,6) mediju.[24]

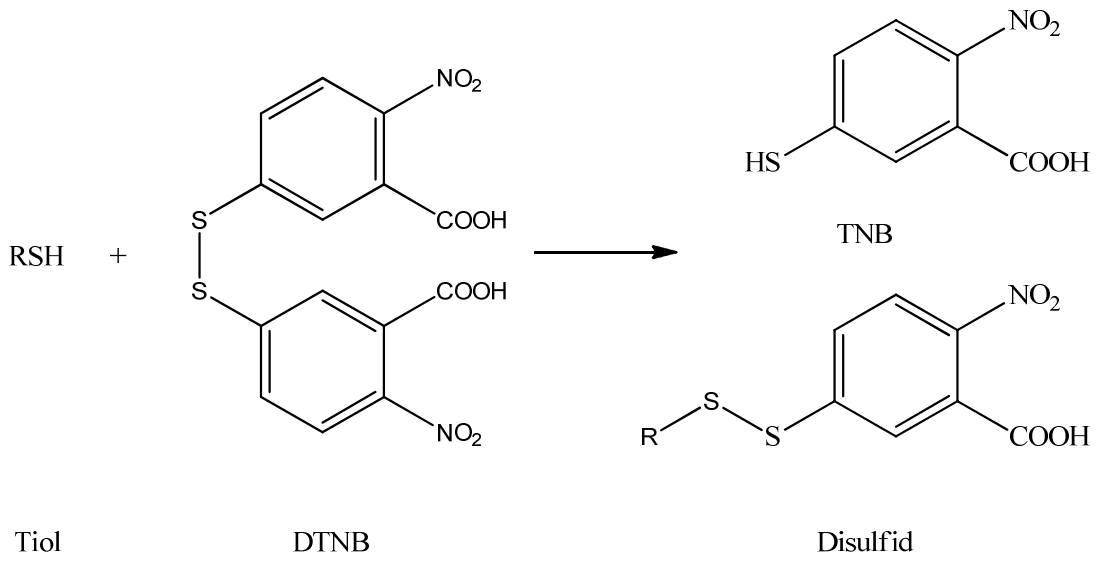
$$TPTZ - Fe(III)_{\check{z}uto-sme\dj e} \xrightarrow{Antioksidans} TPTZ - Fe(II)_{plavo}$$



Slika 12. Mehanizam djelovanja FRAP reakcije[13]

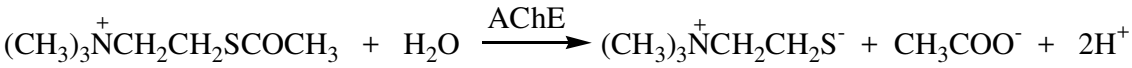
3.2.4. Ispitivanje sposobnosti inhibicije kolinesteraza metodom po Ellmanu

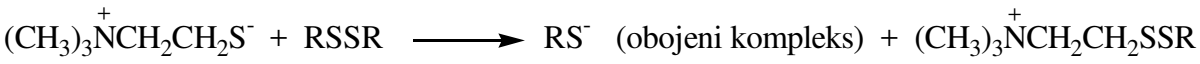
Ellmanova metoda je spektrofotometrijska metoda koja služi za mjerenje aktivnosti kolinesteraza pri čemu rabi tiokolinske supstrate. Ellmanov reagens (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina ili DTNB) se koristi za određivanje broja ili koncentracije tiolnih skupina u uzorku. Tioli reagiraju s DTNB-om i tom reakcijom nastaje 2-nitro-5-merkaptobenzojeva kiselina (TNB), koja zatim u vodi ionizira u TNB- anion kod neutralnog ili alkalnog pH. Oslobođeni TNB- ion ima intenzivno žutu boju. Apsorpcijski maksimum DTNB-a je pri valnoj duljini od 320 nm, dok se količina oslobođenog TNB- mjeri pri duljini od 412 nm.[25]

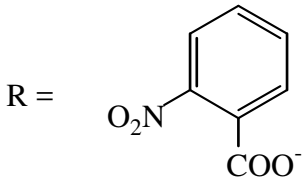


Slika 13. Ellmanova reakcija za određivanje tiola[14]

Ellmanova reakcija za određivanje inhibicijske sposobnosti enzima AChE se odvija prema sljedećim jednadžbama:







Sposobnost inhibicije enzima računa se prema izrazu [5]:

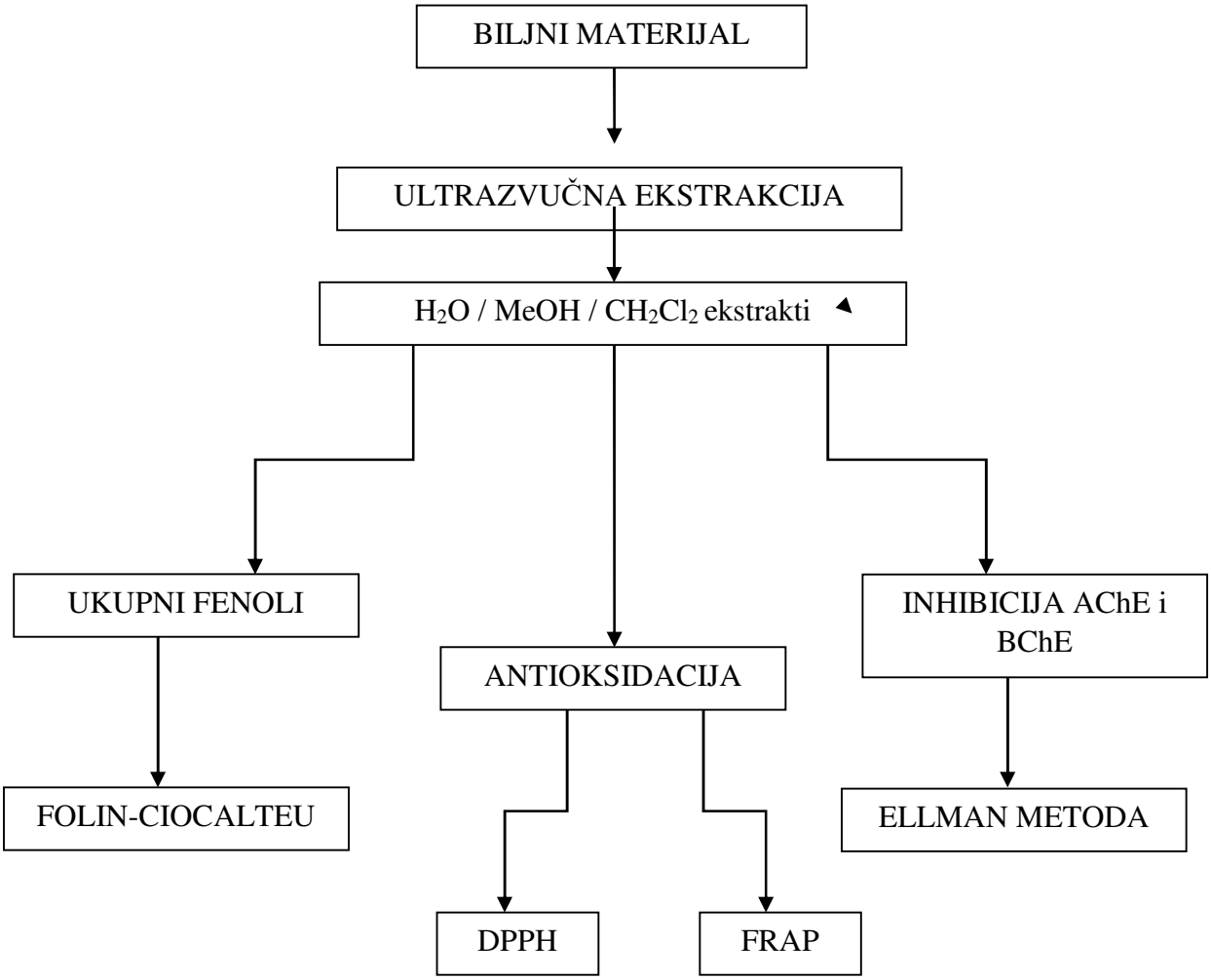
$$\textit{\% inhibicije AChE/BChE} = (A_K - A_A / A_K) \times 100 \qquad [5]$$

gdje je A_A apsorbancija test otopine, a A_K je apsorbancija kontrolnog uzorka.

4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. Biljni materijal

Korijen običnog gaveza (*Symphytum officinale* L.) je kupljen u Kući čaja u Splitu 18. ožujka 2018. godine. Zemlja podrijetla biljnog materijala je Republika Hrvatska, proizvođač je tvrtka Suban d.o.o. Osušeni biljni materijal podvrgnut je ekstrakciji s vodom, metanolom i diklormetanom. Na slici 14. prikazana je shema priprave i analize korijena gaveza



Slika 14. Shema priprave i analize biljnog ekstrakta

4.2. Aparatura i pribor

- digitalna vaga: Kern ALS 120-4
- ultrazvučna kupelj: Bandelin Sonorex RK 103 H
- centrifuga: Nuve 1200R
- rotacijski vakuum uparivač: Heidolph Laborota 4000-efficient
- čitač mikrotitarskih pločica: Tecan SUNRISE
- mikrotitarske pločice (96 jažica)
- automatske mikropipete: SARTORIUS
- staklena čaša
- tikvica s okruglim dnom
- povratno hladilo
- lijevak za filtraciju
- Erlenmeyerova tikvica

4.3. Priprava otopina s biljnim materijalom

U tri tikvice s okruglim dnom stavljeno je oko 5 g usitnjenog biljnog materijala te je u prvu dodano oko 250 mL vode, u drugu oko 300 mL metanola, a u treću oko 300 mL diklormetana. Tikvica s vodom uronjena je u ultrazvučnu kupelj i refluksirana je sat vremena na temperaturi od 80°C. Tikvice sa metanolom i diklormetanom su refluksirane sat vremena na temperaturi od 60°C. Dobiveni ekstrakti su filtrirani dva puta. Nakon toga uzorci s organskim otapalima su upareni do suha u rotacijskom vakuum uparivaču. Zaostali talog u tikvici je otopljen u odgovarajućem otapalu i centrifugiran. Otopina je za daljnje analize čuvana u hermetički zatvorenoj bočici u hladnjaku na temperaturi od 4 °C. Vodeni ekstrakt je podvrgnut procesu liofilizacije.

4.4. Priprava otopina potrebnih koncentracija

Masa ekstrakta nakon uparivanja dobivena je iz razlike mase tikvice poslije uklanjanja otapala (tikvice s talogom) i mase prazne tikvice. Masena koncentracija uzorka određena je pomoću izraza [6]:

$$\gamma\ (uzorka\ ) = \frac{m\ (uzorka)}{V\ (otapala)} \qquad [6]$$

Dobivena koncentracija vodenog ekstrakta iznosi 5 mg/mL, ekstrakta s metanolom (MeOH) 26,61 mg/mL i ekstrakta s diklormetanom (CH_2Cl_2) 10 mg/mL. Otopine tih koncentracija su dalje razrijeđene kako bi se dobile niže prikazane koncentracije potrebne za provođenje analiza. U tablici 4. prikazane su početne koncentracije uzoraka korištene za pojedinu metodu.

Tablica 4. Početne koncentracije uzoraka za pojedinu metodu

	Folin-Ciocalteu	**DPPH**	**FRAP**	**Ellman**
Vodeni ekstrakt	5mg/ml 3 mg/mL 2 mg/mL 1 mg/mL	5 mg/mL 1 mg/mL	5 mg/mL 1 mg/mL	5 mg/mL 1 mg/mL
Metanolni ekstrakt		5 mg/mL 1 mg/mL 0,5 mg/mL	1 mg/mL 5 mg/mL 0,5 mg/mL	26,61 mg/mL 10 mg/mL 5mg/mL
Diklormetanski ekstrakt		5 mg/mL 1 mg/mL 0,5 mg/mL	5 mg/mL 1 mg/mL 0,5 mg/mL	1 mg/mL 0,5 mg/mL

4.5. Određivanje ukupnih fenola po Folin-Ciocalteu

Priprava reagensa*:*

- Folin- Ciocalteu fenol reagens
- otopina natrijevog karbonata, w (Na_2CO_3) = 20%: 200 g bezvodnog natrijevog karbonata otopi se u 1L vode, uz kuhanje; otopina se nakon 24 h filtrira
- matična otopina standarda (galne kiseline), c ($C_7H_6O_5$) = 100-1000 mg/L

Postupak:

U odmjernu tikvicu od 25 mL otpipetira se 25 µL prethodno razrijeđenog uzorka, odnosno vodenog ekstrakta biljke, doda se 1,975 mL destilirane vode i 125 µL Folin-Ciocalteu reagensa. Otopina se promiješa i nakon par minuta doda joj se 375 µL 20% otopine natrijevog karbonata. Referentna otopina je pripravljena od 125 µL FC reagensa, 1,975 mL destilirane vode i 375 µL Na_2CO_3. Otopine se ostave stajati 2 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega im se na spektrofotometru izmjeri apsorbancija pri 765 nm. Sadržaj fenolnih spojeva računa se preko jednadžbe baždarnog pravca, a rezultati se izražavaju u mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po 1 g ekstrakta (mg GAE/g).

4.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti vezivanjem slobodnog radikala DPPH metodom

Priprava reagensa:

U tikvici je otopljeno 4 mg 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u 96% etanolu.

Postupak:

Slijepa proba se pripravi miješanjem 200 µL DPPH reagensa s 10 µL etanola. U jažice je stavljeno po 200 µL svježe pripravljenog DPPH reagensa, 10 µL etanola za slijepu probu i 10 µL uzorka različitih koncentracija(vodeni ekstrakt 5mg/mL i 1 mg/mL;. metanolni ekstrakt 1mg/mL).

Redukcija se prati smanjenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 517 nm odnosno promjenom boje od ljubičaste na početku reakcije do žute i moguće je mjerenjem vrijednosti apsorbancije odrediti postotak redukcije DPPH· izrazom [4].

4.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

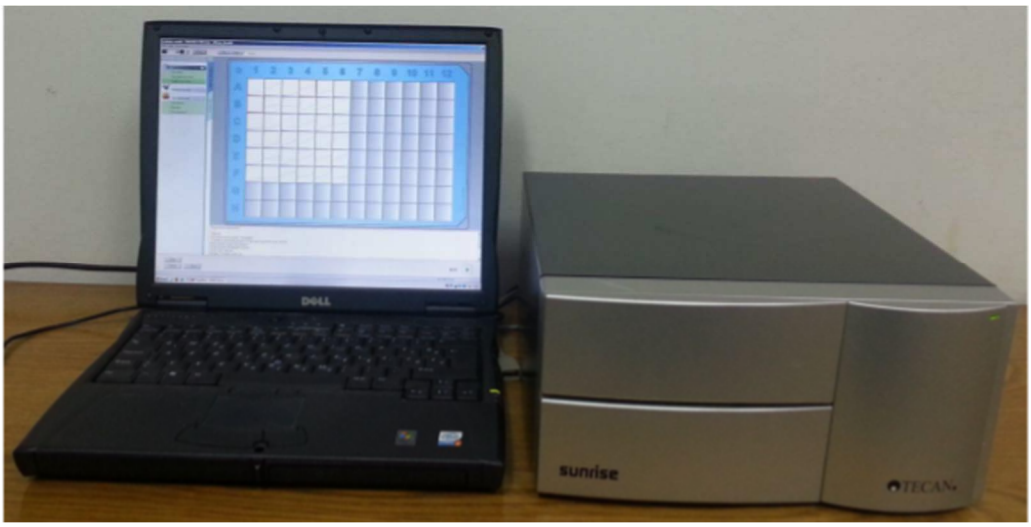
Priprava reagensa:

1. Acetatni pufer; 0,3 M, pH=3,6
    - pomiješano je 3,1 g natrij-acetata trihidrata ($C_2H_3Na0_2$ x $3H_2O$) i 16 mL glacijalne octene kiseline ($C_2H_4O_2$) i nadopunjeno destiliranom vodom do potrebnog volumena od 1L
2. Otopina TPTZ
    - pripremljena je 10 mM otopina 2,4,6,tripiridil-s-triazina u 40 mM HCl-u: otopljeno je 0,031 g TPTZ-a u 10 mL 40 mM otopine HCl-a
3. Otopina ($FeCl_3$ x $6H_2O$)
    - otopljeno je 0,054 g željezovog(III) klorida u destiliranoj vodi i nadopunjeno do 10 mL

4. Standard
    - otopina standarda pripravljena je otapanjem 0,0056 g ($FeSO_4$ x $7H_2O$) u 10 mL destilirane vode
5. FRAP reagens
    - pomiješano je 25 mL acetatnog pufera s 2,5 mL otopine TPTZ-a i 2,5 mL otopine željezo(III) klorida heksahidrata

Postupak:

Slijepa proba se pripravi miješanjem 225 µL FRAP reagensa bez TPTZ i 7,5 µL H_2O. U jažice je stavljeno po 225 µL svježe pripravljenog FRAP reagensa, 7,5 µL destilirane vode za slijepu probu i 7,5 µL uzorka, mogućeg antioksidansa, ili standarda za ostala mjerenja. Praćena je promjena apsorbancije pri valnoj duljini od 593 nm. Mjerenje je trajalo 4 minute počevši od trenutka kada je dodan uzorak koji se mjerio te se stvorilo plavo obojenje koje ima apsorpcijski maksimum kod 593 nm.



Slika 15. Višekanalni čitač mikrotitarskih pločica "Tecan Sunrise"

4.8. Ispitivanje sposobnosti inhibicije enzima AChE i BChE metodom po Ellmanu

Kemikalije:

1. enzim acetilkolinesteraza (AChE)
2. enzim butirilkolinesteraza (BChE)
3. acetiltiokolin jodid (ATChI)
4. S-butirilkolin jodid (S-BTChI)
5. 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina) – DTNB
6. pufer (pH=7 i pH=8)

U tablici 5. je prikazana priprava kemikalija za rad dok je u tablici 6. prikazana shema otopina korištenih u eksperimentu.

Tablica 5. Priprava kemikalija za rad

Kemikalije	**Osnovna otopina**	**Konačna koncentracija**	**Volumen/µL**
Pufer			190
DTNB	13,079 mg u 5 mL pufera (pH=7)	0,3 Mm	10
ATChI	15,9mg u 5 mL pufera (pH=8)	0,5 Mm	10
S-BTChI	17,45 mg u 5mL pufera (pH=8)	0,5 Mm	10
AChE	6,6 µL u 5 mL pufera (pH=8)	0,03 U[1]/mL	10
BChE	14 µL u 5 mL pufera (pH=8)	0,03 U/mL	10

[1] Definicija U (engl. *Unit*): 1 U acetilkolinesteraze će hidrolizirati 1 µmol acetilkolina, na kolin i acetat, po minuti pri pH = 8 i temperaturi od 37 °C.

Postupak:

Tablica 6. Shema otopina u eksperimentu

	Kontrola	**Kontrola EtOH**	**Uzorak**
Pufer	190	190	180
DTNB	10	10	10
Uzorak	/	/	10
AChE/BChE	10	10	10
ATChI/BTChI	10	10	10

U svakoj jažici reakcijska smjesa sadrži:

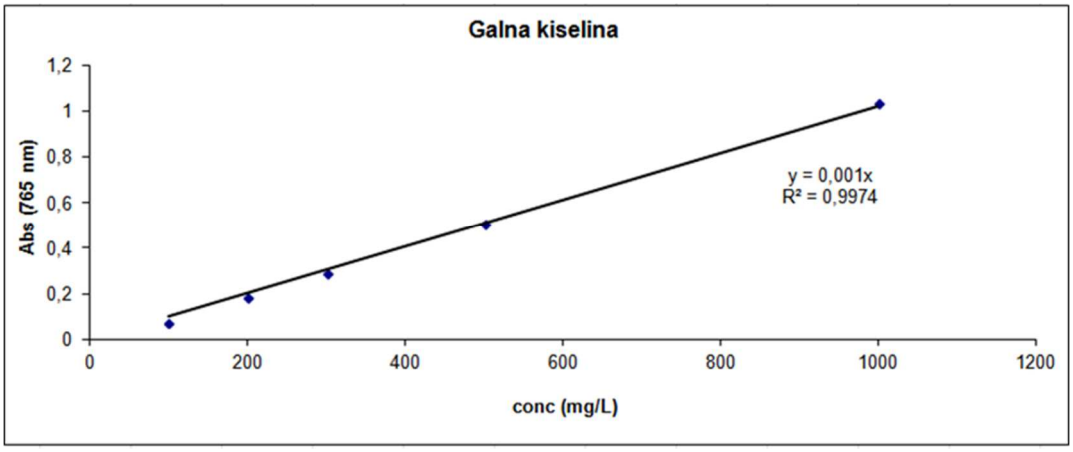
- 180 µL 0,1 mol/L fosfatnog pufera pH=8
- 10 µL 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeve kiseline) DTNB-a, čija koncentracija u smjesi iznosi 0,3 mmol/L (početna otopina pripremljena u 0,1 mol/L fosfatnom puferu pH=7 s dodatkom 0,12 mol/L natrij-bikarbonata, radi stabilnosti DTNB-a)
- 10 µL kolinesteraze
- 10 µL ATChI/BTChI
- 10 µL uzoraka određene koncentracije otopljenog u etanolu ili samog etanola u slučaju kontrolnog mjerenja.

Uzorci se otpipetiraju u jažice, prema shemi iz tablice 5. s time da se supstrat, ATChI/BTChI dodaje neposredno prije početka mjerenja budući da on započinje reakciju. Neenzimska hidroliza praćena je tzv. "blank" mjerenjima, odnosno slijepim probama. Mjerenje se vršilo na višekanalnom čitaču mikrotitarskih pločica "Sunrise" (Tecan, GmbH, Austrija) uz automatsko miješanje i pohranjivanje podataka na računalo (slika 15.). Jedna mikrotitarska pločica ima 96 jažica.

5. REZULTATI

5.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola primjenom Folin-Ciocalteu metode

Za izradu standardne krivulje, pripravljene su otopine standarda, galne kiseline koncentracije 100-1000 mg/L, koje su ispitane prema prethodno opisanom postupku (poglavlje 4.5.). Iz dobivenih podataka izradi se standardna krivulja s vrijednostima koncentracije standarda na apscisi i vrijednostima apsorbancije na ordinati (slika 16.).



Slika 16. Standardna krivulja (galne kiseline) za određivanje ukupnih fenola

Tablica 7. Sadržaj ukupnih fenola u vodenom ekstraktu biljke

Uzorak vodeni ekstrakt	**Ukupni fenoli (mg GAE/mg ekstrakta)**
5 mg/mL	215,5
3 mg/mL	105,00
2 mg/mL	103,00
1 mg/mL	79,00

5.2. Određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka DPPH metodom

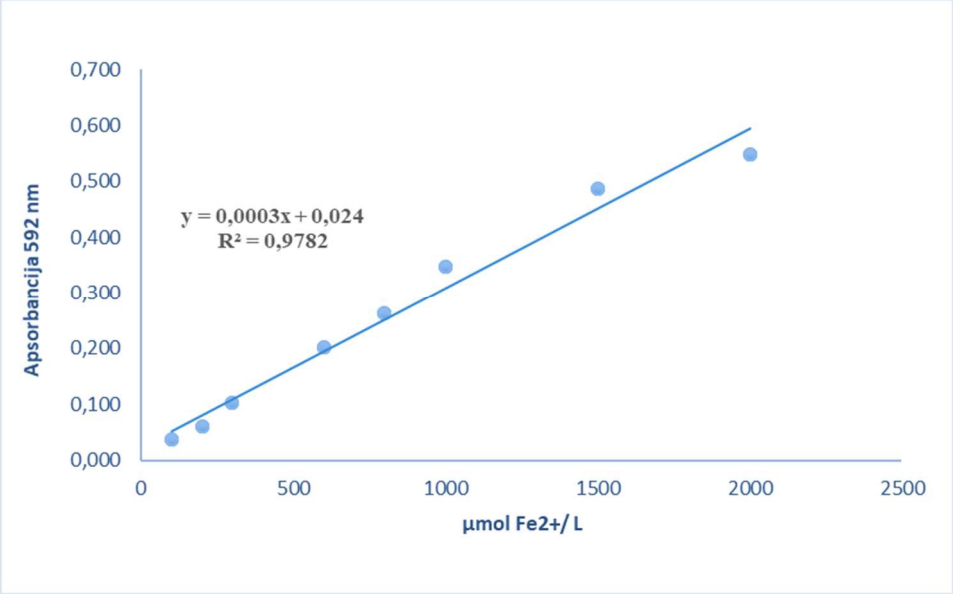
Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti vodenog, metanolnog i diklormetanskog ekstrakta biljke gavez su prikazani u tablici 8. Uzorci s diklormetanom nisu pokazali sposobnost inhibicije DPPH radikala.

Tablica 8. Rezultati antioksidacijske aktivnosti mjereni DPPH metodom

Koncentracija uzorka	**DPPH %**
Vodeni uzorak	
167 µg/mL	63,59
33 µg/mL	8,33
Metanolni uzorak	
167 µg/mL	10,23

5.3. Određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka FRAP metodom

Na slici 17. je prikazana standardna krivulja za FRAP metodu koja služi za određivanje antioksidacijske aktivnosti. Rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti ekstrakata korijena gaveza FRAP metodom su prikazani u tablici 9.



Slika 17. Standardna krivulja za FRAP metodu

Tablica 9. Rezultati antioksidacijske aktivnosti mjereni FRAP metodom

Koncentracija uzorka (µg/L)	FRAP (µmol Fe^{2+}/ L)
Vodeni ekstrakt	
238,10	2344,41
47,62	570,42
Metanolni ekstrakt	
238,10	721,25
47,62	279,58
Diklormetanski ekstrakt	
238,10	722,08
47,62	177,08
23,81	116,25

5.4. Sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE mjerena metodom po Ellmanu

Metodom po Ellmanu ispitana je sposobnost inhibicije enzima acetilkolinesteraze i butirilkolinesteraze vodenih, metanolnih i diklormetanskih ekstrakata korijena gaveza. Ispitivane su serije uzoraka različitih početnih koncentracija: vodeni ekstrakt (5 mg/mL, 1mg/mL), metanolni ekstrakt (26,61 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL) i diklormetanski ekstrakt (1 mg/mL, 0,5 mg/mL). Niti jedan od uzoraka nije pokazao sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE.

6. RASPRAVA

Cilj ovog rada je bio odrediti sadržaj ukupnih fenola, ispitati antioksidacijska svojstava i potencijalne sposobnosti inhibicije enzima AChE i BChE vodenog, metanolnog i diklormetanskog ekstrakta korijena biljke gavez (*Symphytum officinale* L.). Rad je bio usmjeren ka pronalasku potencijalno biološki aktivnih spojeva iz prirode.

Sadržaj ukupnih fenola određen je primjenom Folin-Ciocalteu metode, antioksidacijska aktivnost je ispitana metodama hvatanja slobodnih radikala (DPPH) i mjerenjem redukcijskog potencijala (FRAP), dok je sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE određena metodom po Ellmanu.

Ispitivanjem sadržaja ukupnih fenolnih spojeva na vodenom uzorku koncentracije 5 mg/mL utvrđeno je 215 mg GAE/mg ekstrakta. Na vodenim uzorcima od 3 mg/mL, 2 mg/mL i 1 mg/mL utvrđeno je redom 105 mg GAE/mg ekstrakta, 103 mg GAE/mg ekstrakta i 78 mg GAE/mg ekstrakta.

Mjerenja antioksidacijske aktivnosti pomoću DPPH metode su provedena za različite serije početnih koncentracija (5 mg/mL, 1 mg/mL i 0,5 mg/mL). Najveća inhibicija postignuta je kod vodenog uzorka konačne koncentracije u sustavu 167 µg/mL u iznosu od 63,59 %. Vodeni uzorak konačne koncentracije u sustavu 33 µg/mL pokazuje inhibiciju od 8,33 %. Metanolni uzorak konačne koncentracije u sustavu 167 µg/mL pokazuje inhibiciju od 10,23 %. Uzorci s diklormetanom ne pokazuje inhibicijsku sposobnost. Na temelju rezultata može se zaključiti da se postotak inhibicije DPPH radikala smanjuje proporcionalno sa smanjenjem koncentracije uzorka.

Redukcijski potencijal vodenog ekstrakta biljke određen je FRAP metodom. Mjerenjem promjene apsorbancije (ΔA) izračunate su vrijednosti koncentracija nastalog Fe^{2+}, koje su proporcionalne koncentracijama antioksidansa. Vodeni uzorak konačne koncentracije u sustavu 238,10 µg/mL pokazuje najveću redukcijsku sposobnost s vrijednošću od 2344,41µmol Fe^{2+}/L. Slijede diklormetanski i metanolni uzorci konačne koncentracije u sustavu od 238,10 µg/mL i vodeni uzorak od 47,62 µg/mL u iznosu od 722,208 µmol Fe^{2+}/L, 721,25 µmol Fe^{2+}/L i 570,42µmol Fe^{2+}/L.

Metodom po Ellmanu ispitana je sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE. Za mjerenje su korišteni uzorci različitih koncentracija. Niti jedan od uzoraka nije pokazao sposobnost inhibicije enzima (5.4.).

7. ZAKLJUČAK

- U ovom eksperimentalnom radu, analizama je dokazana relativno dobra antioksidacijska aktivnost vodenog ekstrakta biljke gaveza (*Symphytum officinale* L.). Rezultati ispitivanja inhibicije enzima acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE) su pokazali da niti jedan ispitivani uzorak nije inhibirao enzime.

- Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u vodenom ekstraktu iznosi za koncentraciju od 5mg/mL 215,5 mg GAE/mg ekstrakta.

- DPPH metodom je utvrđeno da najveću inhibiciju postiže vodeni ekstrakt pri konačnoj koncentraciji u sustavu od 167 µg/mL s 63,59 % inhibicije DPPH radikala. Smanjenjem koncentracije (33 µg/mL dolazi do znatnijeg smanjenja inhibicije DPPH radikala (8,33%).

- FRAP metodom određen je antioksidacijski kapacitet uzoraka za različite serije početnih koncentracija za vodeni, metanolni i diklormetanski uzorak (5 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5mg/mL) te je utvrđeno da najbolju antioksidacijsku aktivnost ima vodeni uzorak pri konačnoj koncentraciji u sustavu 238,10 µg/mL u iznosu od 2344,31 µmola Fe^{2+}/L.

- Metodom po Ellmanu se ispitivala sposobnost inhibicije enzima AChE i BChE vodenim, metanolnim i diklormetanskim ekstraktom biljke. Ispitivani uzorci nisu pokazali sposobnost inhibicije enzima.

8. LITERATURA

1.URL:https://hirc.botanic.hr/fcd/DetaljiFrame.aspx?IdVrste=10584&taxon=Symphytum+officinale+L (17.3.2018.)

2.URL:http://www.stazamazdravlja.info/ljekovito-bilje/prirodni-analgetik-ova-biljka-je-lijek-za-cukljeve-bolne-misice-i-zglobove/ (30.6.2018.)

3. F. Stickel, H. K. Seitz, *The efficacy and safety of comfrey*. Pub H Nut 3(4A) (2000) str. 501-508

4. T. Nikolić ur. (2015): *Rasprostranjenost Symphytum officinale L. u Hrvatsko*j, Flora Croatica baza podataka (http://hirc.botanic.hr/fcd). Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (17.3.2018.)

5. URL: http://www.belupo.hr/Default.aspx?sid=4763 (3.8.2015)

6. URL: https://prae-valeo.com/test/antioksidanti/oksidativni-stres-ros (26.6.2018.)

7. K. Šebetić , *Antioksidansi – u središtu zanimanja medicine u 21. Stoljeća*, Oktal pharma, Zagreb, 2007

8. A. Gašparović-Čipak., T. Lovaković, N. Žarković, *Oxidative Stress and Antioxidants: Biological Response Modifiers of Oxidative Homeostasis in Cancer*, Periodicum biologorum, (2010) str. 112

9.URL:medlib.mef.hr/368/1/Simic_G_Neurobiologija_demencija_rep_368.pdf (4.8.2015.)

10.URL:https://edukal.alzheimer.hr/application/files/8314/6028/0683/Prijedlog_Nacionalne_strategije_borbe_protiv_demencije.pdf (4.8.2015.)

11. R. Anand , Kiran Dip Gill, Abbas Ali Mahdi, *Therapeutics of Alzherimer's disease: Past,present and future, Neuropharmacology,* (2014) str. 76

12.URL:http://neuron.mefst.hr/docs/medicina/medicine_engl/katedra_fiziologija/Zdravstveni_studiji/prezentacije/Sredisnji_zivcani_sustav_ZDRAV_STUD_2013.pdf (10.8.2015.)

13. A. Đulović, *Usporedba dviju metoda za određivanje inhibicijske sposobnosti na kolinesteraze,* Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2014

14. F. Burčul, *Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice* Ranunculaceae, Doktorski rad, Zagreb, 2014

15. A. Bosak, M. Kataliniý, Z. Kovarik, *Kolinesteraze: struktura, uloga, inhibicija*, Arh Hig Rada Toksikol, 2011

16. URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Esterase (10.10.2016.)

17.URL:http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1p0i(10.10.2016)

18. N. Blažević, *Učinci antilipidnih lijekova na butirilkolinesterazu u biološkom materijalu štakora*, Diplomski rad, Zagreb, 2014

19. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999

20. I. Jerković, *Kemija aroma*, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, 2011

21. L. Kukoč-Modun, *Molekulska apsorpcijska spektrofotomerija* (Laboratorijska vježba), 2003

22. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, *Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity*, 1994

23. G. C. Yen, P. D. Duh, *Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species*. Food Chemistry, 1994

24. I. F. F.Benzie, J. J. Strain, *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measure of „antioxidant power": The FRAP assay*, Analytical Biochemistry (1996) str. 239

25. G. L. Ellman, D. K. Courtney, V. Andres , R. M. Featherstone, *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*, Biochemical Pharmacology 7 (1961)

26. M. Brnčić, B. Tripalo, A. Penava, D. Karlović, D. Ježek, D. Vikić Topić, S. Karlović, T. Bosiljkov, *Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane*, Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam

27.URL:https://bib.irb.hr/datoteka/775700.Pages_from_Medix_117_Strategija.pdf (12.4.2018.)