

Aktywność antyoksydacyjna preparatów z morwy białej, fasoli zwykłej oraz miłorzębu japońskiego w cukrzycy generowanej podaniem streptozotocyny

Zakład Fizjologii Zwierząt i Toksykologii, Instytut Biologii, Uniwersytet Pedagogiczny w Krakowie
Kierownik Zakładu: dr hab. Grzegorz Formicki, prof. UP

ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF WHITE MULBERRY, PHASEOLUS VULGARIS AND GINKGO BILOBA PREPARATIONS IN STREPTOZOTOCIN DIABETIC MICE

SUMMARY

In the course of diabetes, an increase in oxidative stress occurs as a result of uncontrolled formation of free radicals (ROS). Basic protection is provided by the so-called enzymatic triad: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). The main component of the non-enzymatic antioxidative barrier is glutathione (GSH). One of the treatment strategies is using plant compounds or preparations as protective agents that support the therapy of diabetes. The aim of this work was to investigate the antihyperglycemic, antioxidant and anti-hyperlipidemic effects of the aqueous extract of white mulberry, Ginkgo biloba and Phaseolus vulgaris on streptozotocin (STZ) – induced diabetic mice.

Diabetes was induced in Swiss albino mice by the administration of STZ (65 mg/kg b.w.) intraperitoneally. Aqueous extract of white mulberry, Phaseolus vulgaris and Ginkgo biloba were administered by oral gavage once a day for a period of 15 days. The effect of the extracts on enzymatic and non-enzymatic antioxidants of defence systems such as SOD, CAT, GPx and GSH levels in blood serum was studied.

Our results showed that white mulberry, Phaseolus vulgaris and Ginkgo biloba extracts reduced the blood glucose. As a result of studies carried out it was found that diabetes increases the oxidative stress causing perturbation of the redox homeostasis of the body. The applied plant preparations do not lead to full metabolic control, however, they may have potential protective activity through the stimulation of the antioxidative system in the body.

KEY WORDS: DIABETES MELLITUS – ANTIOXIDANTS – WHITE MULBERRY – PHASEOLUS VULGARIS AND GINKGO BILOBA – MICE

Wstęp

Cukrzyca jest poważnym zagrożeniem dla zdrowia publicznego, a liczba chorych na tę chorobę szybko wzrasta. Ponad 220 milionów ludzi na świecie choruje na cukrzycę i liczba ta może być dwa razy większa już w 2030 roku (1). Zgodnie z definicją podaną przez American Diabetes Association (ADA) pojęcie cukrzycy odnosi się do choroby metabolicznej o różnorodnej etiologii, charakteryzującej się przewlekłą hiperglikemią

z zaburzeniami metabolizmu węglowodanów, tłuszczów i białek, na skutek defektu wydzielania i/lub działania insuliny. Cukrzyca powoduje przewlekłe uszkodzenie, dysfunkcję i niewydolność różnych narządów.

W przebiegu cukrzycy zwiększenie stresu oksydacyjnego występuje w wyniku niekontrolowanego powstawania wolnych rodników (ROS). Stres oksydacyjny wzrasta na skutek zwiększenia stężenia glukozy, stymulacji szlaku polioloowego oraz zmniejszenia enzymatycznych i nieenzymatycznych mechanizmów obronnych (2, 3). Wiele prac doświadczalnych wskazuje na udział wolnych rodników w patogenezie cukrzycy (4). Podstawową ochroną przed wolnymi rodnikami jest tzw. triada enzymatyczna: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT) i peroksydaza glutationowa (GPx). Z kolei, głównym składnikiem nieenzymatycznej bariery antyoksydacyjnej jest glutation zredukowany (GSH).

Wyniki badań potwierdzają, że przeciwutleniacze, zdolne do neutralizowania wolnych rodników, są skuteczne w zapobieganiu rozwoju eksperymentalnej cukrzycy w modelach zwierzęcych (5, 6). Stąd jedną ze strategii leczenia cukrzycy jest stosowanie roślinnych preparatów o działaniu przeciwutleniającym.

Morwa (*Morus alba* L.), a przede wszystkim ekstrakt z liści tej rośliny, to naturalny lek stosowany od setek lat w medycynie tradycyjnej. Liście morwy zawierają liczne związki biologicznie czynne, między innymi fitosterole, w tym β -sitosterol, stigmasterol, kampesterol, glukozyd β -D-sitosterolu, olejki eteryczne; kwasy: octowy, propionowy, walerianowy, salicylowy; aminokwasy: kwas asparaginowy i kwas glutaminowy; witaminy: A, B₁, B₂, C; mikroelementy: cynk, miedź, bor, mangan, żelazo i inne (7). Ponadto, morwa zawiera alkaloid 1,5-didezoksy-1,5-imino-D-sorbitol=1-dezoksynojirimycinę (DNJ) oraz jego pochodne. Związek ten, rozpuszczalny w wodzie, występuje tylko w liściach morwy i wykazuje właściwości przeciwcukrzycowe (8). DNJ jest skutecznym inhibitorem α -glukozaminidazy, hamuje reakcję katalizowaną przez α -glukohydrolazę, dzięki czemu spowalnia

rozkład zawartej w żywności skrobi na cukry proste, takie jak glukoza, co z kolei prowadzi do obniżenia poposiłkowej hiperglikemii (9, 10). Innym składnikiem morwy, wpływającym na gospodarkę węglowodanową, jest flawonoid glikozydowy kwercetyna, który hamuje działanie enzymu reduktazy aldozy (ALR2), odpowiedzialnego za syntezę sorbitolu z nadmiaru glukozy. Podwyższony poziom sorbitolu może prowadzić do powikłań w funkcjonowaniu układu nerwowego, oczu i nerek, szczególnie u diabetyków. Ponadto kwercetyna chroni komórki, błony komórkowe i DNA przed uszkodzeniami spowodowanymi działaniem wolnych rodników, co odgrywa ważną rolę w profilaktyce wielu chorób, m.in. cukrzycy (11).

Fasola zwykła (*Phaseolus vulgaris* L.) powoduje obniżenie poziomu glukozy w surowicy krwi (12). Składnikami fasoli wykazującymi właściwości przeciw-cukrzycowe są β -sitosterol i stigmasterol. Fitosterole te są w stanie zwiększyć produkcję insuliny, hormonu naturalnie obniżającego stężenie glukozy we krwi. Jest to możliwe poprzez pobudzanie trzustki do wytwarzania insuliny. Ponadto zawarty w liścieniach zarodka fasoli inhibitor α -amylazy zapobiega trawieniu skrobi (13, 14). Działanie przeciwutleniające związane jest z obecnością flawonoidów i fitosteroli.

Miłorząb japoński (*Ginkgo biloba* L.) był używany w tradycyjnej chińskiej medycynie przez tysiące lat. Jest wszechstronnie badany ze względu na jego korzystne efekty w leczeniu i zapobieganiu wielu chorób. Ekstrakt z miłorzębu poprawia przepływ krwi, chroni komórki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi wywołanymi przez wolne rodniki, wzmacnia pamięć (15, 16, 17). Po podaniu ekstraktów z miłorzębu zaobserwowano obniżenie poziomu glukozy we krwi. Frakcja flawonoidów zawarta w wyciągu z *Ginkgo biloba* znacząco hamuje aktywność α -amylazy oraz α -glukozydazy (18). Ma działanie przeciwutleniające wynikające z bezpośredniego osłabienia reaktywnych form tlenu na drodze chelatowania niektórych prooksydacyjnych jonów metali, np. miedzi i żelaza, co prowadzi do blokowania ich zdolności generowania wolnych rodników. Z kolei promowanie ekspresji białek antyoksydacyjnych zwiększa metabolizm przeciwutleniaczy, takich jak glutation (19, 20). Struktura chemiczna flawonoidów, składająca się z pierścienia aromatycznego i wiązania podwójnego, wydaje się reagować wybiórczo z rodnikami hydroksylowymi (21).

Streptozotocyna (STZ) jest często stosowana do wywołania cukrzycy u zwierząt doświadczalnych, poprzez jej toksyczny wpływ na komórki β trzustki (22). Cytotoksyczne działanie STZ jest związane z wytwarzaniem reaktywnych form tlenu (ROS), prowadzące do uszkodzeń oksydacyjnych (23).

Istnieje wiele strategii poszukiwań skutecznych metod leczenia lub łagodzenia powikłań towarzyszących cukrzycy. Ekstrakty o potencjalnym działaniu przeciw-cukrzycowym mogą stabilizować wahania stężenia cukru we krwi, zwiększać wrażliwość komórek na insulinę, łagodzić stany zapalne lub zmniejszać powstawanie wolnych rodników. Stąd celem eksperymentu była analiza wpływu preparatów z morwy białej, fasoli zwykłej oraz miłorzębu japońskiego na wybrane parametry systemu antyoksydacyjnego w zwierzęcym modelu cukrzycy.

Material i metody

Badania przeprowadzono na samcach myszy szczepu Swiss o masie 25-26 g, hodowanych (hodowla własna – zwierzętarnia Instytutu Biologii, UP w Krakowie) w stałych warunkach oświetlenia LD 12:12 i karmionych standardową dietą z nieograniczonym dostępem do wody. Cały eksperyment został zaakceptowany przez Lokalną Komisję Etyczną w Krakowie (No. 122/2010). Badane zwierzęta podzielono na osiem grup doświadczalnych. W pierwszym etapie eksperymentu u myszy I, V, VI i VII grupy doświadczalnej została wgenerowana cukrzyca na drodze dootrzewnowego podania streptozotocyny w buforze cytrynianowym (0,05 mol, pH 4,5) (24). Do badań zostały przeznaczone zwierzęta z wygenerowaną hiperglikemią (ponad 200 mg/dl). W drugim etapie eksperymentu podawano badane ekstrakty (tab. 1). Po 30 min od ostatniego podania badanych ekstraktów zwierzęta wprowadzano w stan głębokiej narkozy, dekapitowano, a następnie pobierano do badań krew z tętnicy szyjnej.

Całkowita aktywność GPx w surowicy krwi została oznaczona metodą Paglia i Valentine (25). Całkowita aktywność SOD została ustalona przez zahamowanie redukcji cytochromu c, zgodnie z metodą Flohe i Ottinga (26). Całkowita aktywność CAT była określana metodą Aebi (27). Stężenie GSH w krwi oceniano poprzez ocenę wolnych grup -SH, za pomocą odczynnika 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoesowego (DTNB) – metodą opisaną przez Sedlaka i Lindsaya (28). Białko oznaczano metodą Bradforda (29).

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono za pomocą programu Statistica, wersja 9. Różnice między kolejnymi grupami były oceniane za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA. Znamienności statystyczne zostały określone przy wartości $p < 0,05$.

Wyniki

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że cukrzyca (I grupa doświadczalna) zwiększa stres oksydacyjny, w porównaniu do grupy kontrolnej,

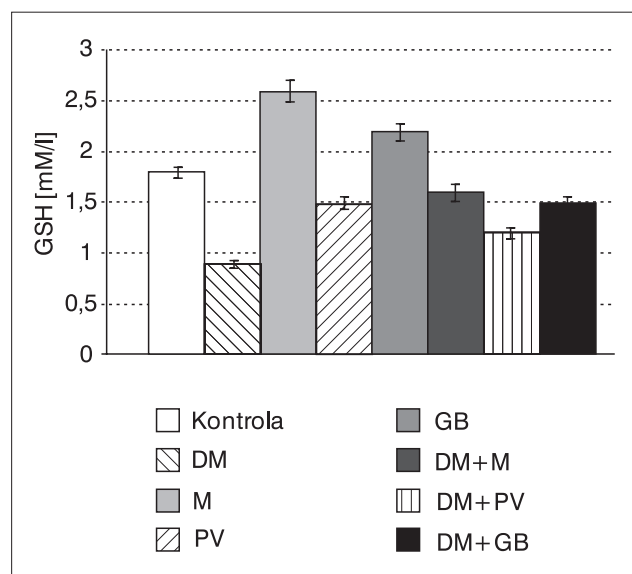
Tabela 1. Podział myszy doświadczalnych na grupy badawcze.

Grupa eksperymentalna	Podana substancja	Dawka/objętość	Droga podania
Grupa kontrolna	sól fizjologiczna	100 μ l	doustnie
I Grupa doświadczalna (DM)	streptozotocyna (STZ)	65 mg/kg m.c.	dootrzewnowo, jedнокrotne
II Grupa doświadczalna (M)	ekstrakt z liści morwy (M)	100 mg/kg m.c./dzień	doustnie, 5 tygodni
III Grupa doświadczalna (PV)	ekstrakt z nasion fasoli (PV)	300 mg/kg m.c./dzień	doustnie, 5 tygodni
IV Grupa doświadczalna (GB)	ekstrakt z liści miłorzębu (GB)	200 mg/kg m.c./dzień	doustnie, 5 tygodni
V Grupa doświadczalna (DM+M)	STZ + M	j.w.	j.w.
VI Grupa doświadczalna (DM+PV)	STZ + PV	j.w.	j.w.
VII Grupa doświadczalna (DM+GB)	STZ + GB	j.w.	j.w.

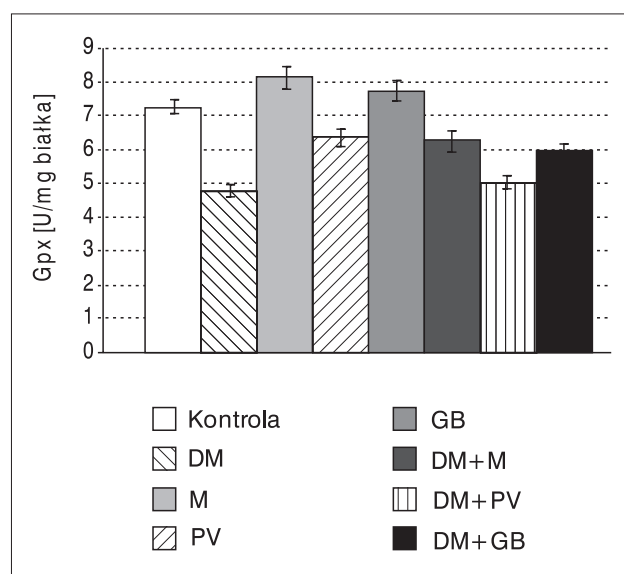
powodując zaburzenia oksydo-redukcyjnej homeostazy organizmu. Po podaniu preparatów roślinnych (II, III i IV grupa doświadczalna) zaobserwowano wzrost aktywności SOD, CAT i GPx w porównaniu do grupy doświadczalnej z wywołaną cukrzycą. U zwierząt, u których wywołano cukrzycę (V, VI i VII grupa doświadczalna), podanie ekstraktów roślinnych łagodziło stres oksydacyjny. Największe zmiany badanych parametrów zaobserwowano po podaniu ekstraktu z morwy białej. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinach 1-4.

Dyskusja

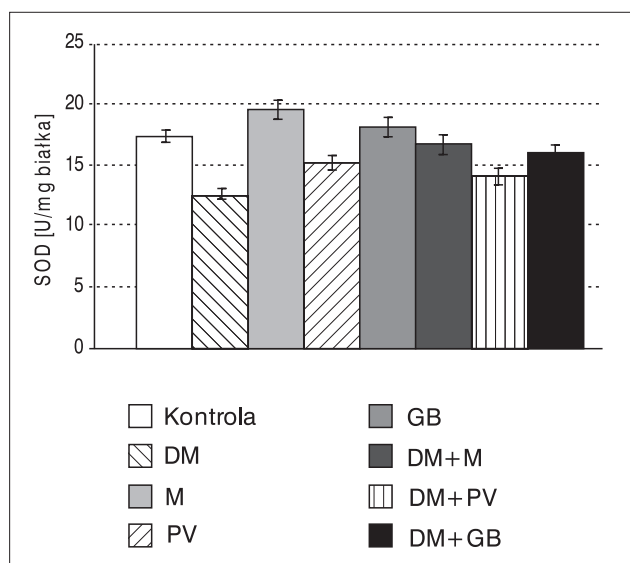
Cukrzyca jest rozpowszechnioną, przewlekłą chorobą. Zwiększony stres oksydacyjny może odgrywać rolę w patogenezie i progresji cukrzycy oraz jej powikłań (30, 31). Uzyskane wyniki badań potwierdzają, że przewlekła hiperglikemia u chorych na cukrzycę zwierząt generuje stres oksydacyjny, co z kolei prowadzi do niedoboru aktywności antyoksydacyjnej systemu obronnego i powoduje wzrost poziomu ROS. Stąd stosowanie ekstraktów roślinnych o przeciwutleniającym działaniu może skutecznie wpływać na ochronę



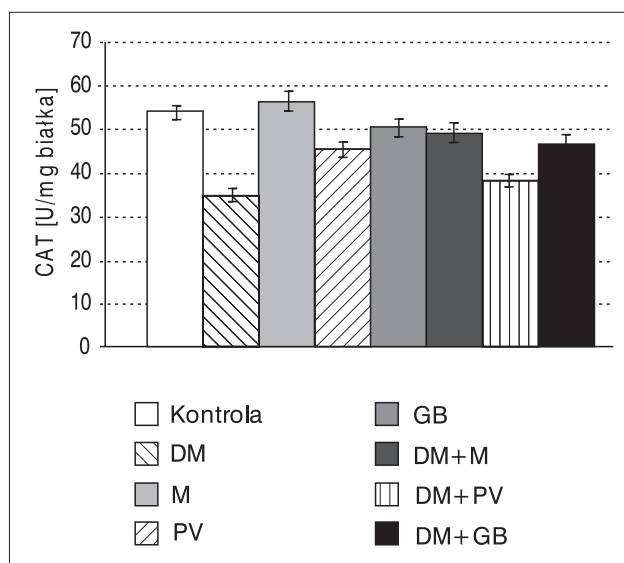
Ryc. 1. Wpływ wyciągów wodnych z liści morwy białej (M), nasion fasoli zwykłej (PV) i liści miłorzębu japońskiego (GB) na stężenie glutationu (GSH) we krwi myszy z cukrzycą (DM) indukowaną streptozotocyną. Dane przedstawiono jako średnie \pm SD (n = 7). Wartości są istotne statystycznie przy p < 0,05: a) cukrzyca w porównaniu z kontrolą; b) ekstrakty M, PV i GB w odniesieniu do cukrzycy; c) cukrzyca + ekstrakty M, PV i GB w odniesieniu do cukrzycy nielezionej.



Ryc. 2. Wpływ wyciągów wodnych z liści morwy białej (M), nasion fasoli zwykłej (PV) i liści miłorzębu japońskiego (GB) na aktywność peroksydazy glutationowej (GPx) w surowicy krwi myszy z cukrzycą (DM) indukowaną streptozotocyną. Dane przedstawiono jako średnie \pm SD (n = 7). Wartości istotne statystycznie przy p < 0,05: a) cukrzyca w porównaniu z kontrolą; b) ekstrakty M, PV i GB w odniesieniu do cukrzycy; c) cukrzyca + ekstrakty M, PV i GB w odniesieniu do cukrzycy nielezionej.



Ryc. 3. Wpływ wyciągów wodnych z liści morwy białej (M), nasion fasoli zwykłej (PV) i liści miłorzębu japońskiego (GB) na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w surowicy krwi myszy z cukrzycą (DM) indukowaną streptozotocyną. Dane przedstawiono jako średnie \pm SD (n = 7). Wartości istotne statystycznie przy p < 0,05: a) cukrzyca w porównaniu z kontrolą; b) ekstrakty M, PV i GB w odniesieniu do cukrzycy; c) cukrzyca + ekstrakty M, PV i GB w odniesieniu do cukrzycy nieleczonej.



Ryc. 4. Wpływ wyciągów wodnych z liści morwy białej (M), nasion fasoli zwykłej (PV) i liści miłorzębu japońskiego (GB) na aktywność katalazy (CAT) w surowicy krwi myszy z cukrzycą (DM) indukowaną streptozotocyną. Dane przedstawiono jako średnie \pm SD (n = 7). Wartości istotne statystycznie przy p < 0,05: a) cukrzyca w porównaniu z kontrolą; b) ekstrakty M, PV i GB w odniesieniu do cukrzycy; c) cukrzyca + ekstrakty M, PV i GB w odniesieniu do cukrzycy nieleczonej.

organizmu przed wolnymi rodnikami, między innymi poprzez stymulację enzymatycznego i nieenzymatycznego systemu obrony.

W badaniu założono, że szereg składników biologicznie czynnych zawartych w ekstraktach z liści morwy białej, naowocni fasoli zwykłej oraz liści miłorzębu japońskiego, może wykazywać właściwości antyoksydacyjne. Badania prowadzone przez Yanga i wsp. (32) na szczurach pozostających na wysokotłuszczowej diecie dowiodły, że stosowanie ekstraktów z owoców morwy białej (MFP) skutecznie obniża w surowicy krwi oraz wątrobie stężenie triglicerydów i cholesterolu całkowitego, (wskaźników miażdżycy) i kwasu tiobarbiturowego, przy jednoczesnym podwyższeniu aktywności SOD i GPx. Te korzystne efekty MFP mogą być efektem działania błonnika, kwasów tłuszczowych, związków fenolowych, flawonoidów, antocyjanów, witamin i pierwiastków śladowych. Z kolei Katsube i wsp. (33) stwierdzili, że w liściach morwy białej zawarte są flawonoidy, m.in. kwercetyna, które wykazują działanie antyoksydacyjne. Po podaniu sproszkowanych liści morwy zaobserwowali zmniejszenie stresu oksydacyjnego oraz poprawę glikemii w wątrobie otyłych myszy. Podobne wyniki badań uzyskali Naowaboot i wsp. (34), stosując alkoholowy ekstrakt z liści morwy. Według Wattanapitayakula i wsp. (35), którzy badali potencjalne właściwości

ochronne ekstraktów roślinnych w stosunku do kardiotoxyczności dokсорubicyny, wodny ekstrakt z liści morwy (*Morus alba*) wykazywał wysoką aktywność redukującą żelazo III wartościowe.

Pokarmy o niskim indeksie glikemicznym (IG) mogą zmniejszyć ryzyko cukrzycy oraz jej powikłań. Ponadto prowadzonych jest wiele badań nad produktami, które spowalniają wchłanianie węglowodanów, poprzez hamowanie enzymów odpowiedzialnych za ich trawienie. Wybór rodzaju węglowodanów zawartych w diecie oraz ich właściwości glikemiczne wynika z określenia szybkości wchłaniania cukrów w organizmie. Jednym ze sposobów zmniejszenia poposiłkowego IG jest włączenie do diety skrobi odpornych na trawienie w jelicie cienkim, które przechodzą do jelita grubego, gdzie działają jak błonnik. Skrobia ta naturalnie występuje w nasionach roślin strączkowych i nieprzetworzonych produktach pełnoziarnistych. Spowalnia ona wchłanianie węglowodanów poprzez hamowanie enzymów odpowiedzialnych za ich trawienie, m.in. α -amylazy.

Fasola zwykła zawiera 3 izofomy inhibitora α -amylazy (α -A1, α -A12, α -AIL). Izoforma α -A1 odpowiada anty-amylazie u ludzi. Enzym ten znajduje się wyłącznie w osi zarodkowej i liścieniu zarodka. Często enzym ten jest określany jako białko obrony (37). Stąd uzyskane w badaniu wyniki mogą wskazy-

wać na regulacyjną rolę nasion fasoli w hiperglikemii. Liczne badania farmakologiczne i kliniczne udowodniły, że fitosterole, podawane ludziom lub zwierzętom, obniżają stężenie niektórych parametrów opisujących blok metaboliczny w cukrzycy, m.in. stężenia glukozy i cholesterolu. Zawarte w nasionach fasoli sitosterol i stigmasterol, podane zwierzętom doświadczalnym, zmniejszają nasilenie stanu zapalnego w organizmie. Efektem rozwoju stanu zapalnego jest wytwarzanie wolnych rodników. Powstawanie nadmiernej liczby wolnych rodników nie jest zjawiskiem pozytywnym i bez wystarczająco silnego mechanizmu kompensacyjnego (np. obecność antyoksydantów) ROS mogą bez przeszkód niszczyć składniki komórek. Przewlekły stan zapalny jest uważany za główny czynnik przyczyniający się do takich chorób, jak astma, artretyzm, nowotwory, zapalenie jelit. Okazało się, że stan zapalny rozwijający się w układzie krążenia może inicjować lub nasilać choroby autoimmunologiczne, w tym cukrzycę typu I. Badania prowadzone przez Reyes-Bastidas i wsp. (36) dowiodły, że spożywanie mąki uzyskiwanej z roślin strączkowych zapobiega zmianom patologicznym związanym ze stresem oksydacyjnym. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wskazują, że ekstrakt z nasion fasoli, obniżając stan zapalny, chroni organizm przed nasilonym powstawaniem wolnych rodników.

Stres oksydacyjny, który przyczynia się znacząco do powikłań cukrzycy, jest konsekwencją zarówno zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu i/lub osłabienia mechanizmów antyoksydacyjnych. W badaniach wykazano zarówno obniżenie stężenia zredukowanego glutationu (GSH), jak i aktywności triady enzymatycznej – SOD, CAT i GPx u myszy z cukrzycą streptozotocynową. Jest to wynikiem zwiększonego wykorzystania antyoksydantów w ochronie przed wzrastającym poziomem wolnych rodników, które powstają w wyniku samoutleniania nadmiaru glukozy i nieenzymatycznej glikacji białek, towarzyszącej hiperglikemii. Przewlekłe podawanie ekstraktu z liści miłorzębu japońskiego stymuluje mechanizmy obrony antyoksydacyjnej organizmu i odwraca negatywne skutki cukrzycy. Podobne wyniki uzyskano stosując w leczeniu cukrzycy ekstrakty z przepękli ogórkowatej (balsamki ogórkowatej) (*Momordica charantia* L.), kozieradki pospolitej (kozieradki lekarskiej) (*Trigonella foenum graecum* L.) oraz mahoniowca właściwego (*Swietenia mahagoni* L.) (38, 39). Działanie antyoksydacyjne ekstraktu z miłorzębu japońskiego, wykazane w badaniach, jest związane z zawartymi w nim składnikami biologicznie czynnymi: flawonoidami i terpenami, które mogą zmiatać wolne rodniki i zmniejszyć poziom reaktywnych form tlenu (40).

Wniosek

Zastosowane w pracy ekstrakty roślinne z liści morwy białej, nasion fasoli zwykłej i liści miłorzębu japońskiego nie prowadzą do pełnej kontroli metabolicznej, jednak mogą mieć potencjalne działanie ochronne poprzez stymulację systemu antyoksydacyjnego organizmu.

Piśmiennictwo

1. World Health Organization. Prevalence of diabetes worldwide. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>.
2. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17(1):24-38.
3. Al-Rawi NH. Oxidative stress, antioxidant status and lipid profile in the saliva of type 2 diabetics. *Diabet Vasc Dis Res* 2011; 8(1):22-8.
4. Matteucci E, Giampietro O. Oxidative stress in families of type 1 diabetic patients. *Diabet Care* 2000; 23(8):1182-6.
5. Kubisch HM, Wang J, Bray TM i wsp. Targeted overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase protects pancreatic β -cells against oxidative stress. *Diabet* 1997; 46(10):1563-6.
6. Naziroglu M, Cay M. Protective role of intraperitoneally administered vitamin E and selenium on the oxidative defense mechanisms in rats with diabetes induced by streptozotocin. *Biol Stress Elem Res* 2001; 47:475-88.
7. Asano N, Oseki K, Tomioka E i wsp. N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydr Res* 1994; 17, 259(2):243-55.
8. Jeszke M, Kobus-Cisowska J, Flaczek E. Liście morwy jako źródło naturalnych substancji biologicznie aktywnych. *Post Fitoter* 2009; 3:175-9.
9. Asano N, Yamashita T, Yasuda K i wsp. Polyhydroxylated alkaloids isolated from mulberry trees (*Morus alba* L.) and silkworms (*Bombyx mori* L.). *J Agric Food Chem* 2001; 49(9):4208-13.
10. Nakanishi H, Onose S, Kitahara E i wsp. Effect of environmental conditions on the α -glucosidase inhibitory activity of mulberry leaves. *Biosci Biotechnol Biochem* 2011; 23, 75(12):2293-6.
11. Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R i wsp. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 2002; 76, (3):560-8.
12. Helmstädter A. Beans and diabetes: *Phaseolus vulgaris* preparations as antihyperglycemic agents. *J Med Food* 2010; 13(2):251-4.
13. Obiro WC, Zhang T, Jiang B. The nutraceutical role of the *Phaseolus vulgaris* alpha-amylase inhibitor. *Br J Nutr* 2008; 100:1-12.
14. Moreno J, Altabella T, Chrispeels MJ. Characterization of alpha-amylase-inhibitor, a lectin-like protein in the seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol* 1990; 92:703-9.
15. Smith PF, MacLennan K, Darlington CL. The neuroprotective properties of the *Ginkgo biloba* leaf: A review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). *J Ethnopharmacol* 1996; 50:131-9.
16. Mahadevan S, Park Y. Multifaceted therapeutic benefits of *Ginkgo biloba* L. chemistry, efficacy, safety, and uses. *J Food Sci* 2008; 73:R14-9.
17. Parsad D, Pandhi R, Juneja A. Effectiveness of oral *Ginkgo biloba* in treating limited, slowly spreading vitiligo. *Clin Exp Dermatol* 2003; 28:285-7.
18. Tanaka S, Han LK, Zheng YN i wsp. Effects of the flavonoid fraction from *Ginkgo biloba* extract on the postprandial blood glucose elevation in rats. *Yakugaku Zasshi* 2004; 124(9):605-11.
19. Smith JV, Luo Y. Elevation of oxidative free radicals in Alzheimer's disease models can be attenuated by *Ginkgo biloba* extract EGb 761. *J Alzheimers Dis* 2003; 5:287-300.
20. Gohil K, Packer L. Global gene expression analysis identifies cell and tissue specific actions of *Ginkgo biloba* extract, EGb 761. *Cell Mol Biol* 2002; 48:625-31.
21. Zimmermann M, Colciaghi F, Cattabeni F i wsp. *Ginkgo biloba* extract: from molecular mechanisms to the treatment of Alzheimer's disease. *Cell Mol Biol* 2002; 48:613-23.
22. Acharya JD, Ghaskadbi SS. Islets and their antioxi-

- dant defense. *Islets* 2010; 2(4):225-35. **23.** Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001; 50(6):537-46. **24.** Siddiqui O, Sun Y, Liu JC i wsp. Facilitated transdermal transport of insulin. *J Pharm Sci* 1987; 76(4):341-5. **25.** Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70(1):158-69. **26.** Flohe L, Otting F. Superoxide dismutase assays. *Met Enzym* 1984; 105:93-104. **27.** Aebi H. Catalase *in vitro*. *Met Enzym* 1984; 105:121-6. **28.** Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25(C):192-205. **29.** Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analyt Biochem* 1976; 72(1-2):248-54. **30.** Hiramatsu K, Arimori S. Increased superoxide production by mononuclear cells of patients with hypertriglyceridemia and diabetes. *Diabetes* 1988; 37(6):832-7. **31.** Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Rad Biol Med* 1991; 10(5):339-52. **32.** Yang X, Yang L, Zheng H. Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(8-9):2374-9. **33.** Katsube T, Yamasaki M, Shiwaku K i wsp. Effect of flavonol glycoside in mulberry (*Morus alba* L.) leaf on glucose metabolism and oxidative stress in liver in diet-induced obese mice. *J Sci Food Agric* 2010; 90(14):2386-92. **34.** Naowaboot J, Pannangpetch P, Kukongviriyapan V i wsp. Antihyperglycemic, antioxidant and antiglycation activities of mulberry leaf extract in streptozotocin-induced chronic diabetic rats. *Plant Foods Hum Nutr* 2009; 64(2):116-21. **35.** Wattanapitayakul SK, Chularojmonti L, Herunsalee A i wsp. Screening of antioxidants from medicinal plants for cardioprotective effect against doxorubicin toxicity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 96(1):80-7. **36.** Reyes-Bastidas M, Reyes-Fernández EZ, López-Cervantes J i wsp. Physicochemical, nutritional and antioxidant properties of tempeh flour from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Sci Technol Int* 2010;16(5):427-534. **37.** Barrett ML, Udani JK. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control. *Nutr J* 2011; 17:10-24. **38.** Tripathi UN, Chandra D. Anti-hyperglycemic and anti-oxidative effect of aqueous extract of *Momordica charantia* pulp and *Trigonella foenum graecum* seed in alloxan-induced diabetic rats. *Ind J Biochem Biophys* 2010; 47(4):227-33. **39.** Panda SP, Haldar PK, Bera S i wsp. Antidiabetic and antioxidant activity of *Swietenia mahagoni* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmac Biol* 2010; 48(9):974-9. **40.** Smith JV, Luo Y. Studies on molecular mechanisms of *Ginkgo biloba* extract. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 64:465-72.

otrzymano/received: 05.04.2012
zaakceptowano/accepted: 28.04.2012

Adres/address:
*dr Agnieszka Greń
Instytut Biologii
Uniwersytet Pedagogiczny w Krakowie
ul. Podbrzezie 3, 31-054 Kraków
tel.: +48 (12) 622-66-94
e-mail: agrenagren@gmail.com