

»Mladi za napredek Maribora 2016«

33. srečanje

Vpliv vodnih ekstraktov cejlonskega cimeta (*Cinnamomun verum*) in cimeta kasija (*Cinnamomun cassia*) na sprejem glukoze v celice pivske kvasovke (*Saccharomyces cerevisiae*)

Področje: Biologija

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

Avtor: NINA GOŠNJAK
Mentor: BERNARDA DEVETAK
Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Maribor, februar 2016

»Mladi za napredek Maribora 2016«

33. srečanje

Vpliv vodnih ekstraktov cejlonskega cimeta (*Cinnamomun verum*) in cimeta kasija (*Cinnamomun cassia*) na sprejem glukoze v celice pivske kvasovke (*Saccharomyces cerevisiae*)

Področje: Biologija

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO



Maribor, februar 2016

KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK	4
KAZALO GRAFOV	4
KAZALO TABEL	4
POVZETEK	5
ZAHVALA	6
1 UVOD IN PREGLED OBJAV	7
1.1 Cimet	8
1.2 Utemeljitev metodologije	9
1.3 Raziskovalni vprašanja in hipoteze	10
2 MATERIALI IN METODE DELA	11
2.1 MATERIALI	11
2.2 Laboratorijske aparature	11
2.3 Kemikalije	12
2.4 Eksperimentalni postopek	12
2.4.1 Sprejem glukoze v celice pivske kvasovke v prisotnosti vodnega cimetovega ekstrakta (cejlonskega ali kasija) in v kontroli	12
2.4.2 Allium test	16
3 REZULTATI	18
4 DISKUSIJA IN EVALUACIJA	23
5 DRUŽBENA ODGOVORNOST	28
6 ZAKLJUČEK	29
6 REFERENCE	30
7 PRILOGE	33
Priloga 1: Kalibracija merilca krvnega sladkorja	33
Priloga 2: Določanje eksperimentalnih pogojev	34
Priloga 3: Slike rasnega vršička koreninic čebule, ki so rastle pri različnih koncentracijah cimetovega ekstrakta in v kontroli (lastni vir)	35

KAZALO SLIK

Slika 1: Sprejem glukoze v celico s pomočjo inzulina in GLUT4 transportnega proteina.....	8
Slika 2: Cimeta kasija se je v vreli vodni kopeli spremenil v želatini podobno substanco (lasten vir).....	13
Slika 3: Erlenmajerice z vzorci na magnetnih mešalnih (lasten vir).....	14
Slika 4: Priprava redčitvene vrste	15
Slika 5: Allium test z tremi različnimi koncentracijami (od leve proti desni) cejlonskega cimeta, cimeta kasija in kontrolo (lasten vir)	16

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Spreminjanje procenta glukoze koncentracije v odvisnosti od časa v raztopini pivske kvasovke v treh različnih pogojih: ob dodanem vodnem ekstraktu cejlonskega cimeta, cimeta kasija in v kontroli	18
Graf 2: Optična gostota vzorcev pivske kvasovke z dodanim ekstraktom cejlonskega cimeta ali cimeta kasija in v kontroli pri 600,7 nm v odvisnosti od časa (minutah)	20
Graf 3: Dolžine korenin <i>Allium cepa</i> v odvisnosti od koncentracije (g cimeta mL ⁻¹) raztopine v kateri so rastle (dolžina kontrolnih rastlin je pri koncentraciji 0).....	21
Graf 4: Logger pro graf absorbance v odvisnosti od pogojev (mešanje in nižja temperatura in optimalna temperatura) za celice pivske kvasovke	34

KAZALO TABEL

Tabela 1: Povprečne vrednosti glukoze koncentracije (%) in standardne deviacije v odvisnosti od časa ob dodatku vodnega ekstrakta cejlonskega cimeta, cimeta kasija in v kontroli	19
Tabela 2: Primerjava p-vrednosti T-testa znotraj opazovanih vzorcev pri različnih časovnih intervalih; statistično značilne razlike so sivo senčene.....	19
Tabela 3: Primerjava p-vrednosti T-testa med različnimi opazovanimi vzorci v istih časovnih intervalih; statistično značilne razlike so sivo osenčene.....	20
Tabela 4: Število celic čebule <i>Allium cepa</i> v specifični fazi celičnega cikla pri različnih koncentracijah vodnih ekstraktov cejlonskega cimeta, cimeta kasija in kontroli	21
Tabela 5: Mitotski indeks v čebulnem ravnem vršičku pri različnih koncentracijah cimeta	22
Tabela 6: Kalibracija merilca krvne glukoze z raztopinami znanih koncentracij.....	33

POVZETEK

Cimet postaja vedno bolj priljubljena alternativa v uravnavanju krvnega sladkorja, mnogi pa se ne zavedajo, da poznamo več vrst cimeta. V Sloveniji sta na voljo dve vrsti: cejlonski cimet (*Cinnamomum verum*) in cimet kasija (*Cinnamomum cassia*), ki se razlikujeta po vsebnosti škodljivega kumarina.

Namen te raziskovalne naloge je bil spremljanje sprejema glukoze pivske kvasovke (*Saccharomyces cerevisiae*) v prisotnosti vodnih ekstraktov obeh cimetov. Koncentracijo glukoze smo merili z merilcem krvnega sladkorja, toksičnost obeh vodnih ekstraktov pa smo opazovali s pomočjo Allium testa.

Rezultati niso potrdili hipoteze, da cimet značilno vpliva na sprejem glukoze v celice pivske kvasovke. Cejlonski cimet je bil bolj učinkovit, kot cimet kasija, vendar razlike niso bile statistično značilne. Slednji je celo zaviral sprejem glukoze v celice kvasovk. Allium test je v visokih koncentracijah cimeta kasija pokazal visoko toksičnost (celični cikel se je v rsnem vršičku ustavil na stopnji profaze).

ZAHVALA

Zelo me veseli raziskovanje, še posebej v smeri biologije in medicine, vendar samo želja ni dovolj. Kot dijak namreč nimaš dovolj znanja, da bi poznal tako široko znanstveno polje in potrebuješ nekoga, da te na tvoji poti usmerja, da navodila in pripomore s svojimi izkušnjami. Rada bi se zahvalila svoji mentorici, ki je imela potrpljenje in si vzela čas, da sem lahko izvedla svojo raziskovalno nalogo. Dala mi je napotke in mi predstavila svet novih tehnik, ki jih prej še nisem poznala.

Rada bi se zahvalila tudi šoli, ker je zagotovila vse potrebne materiale, ter naši laborantki za vso pomoč.

Zahvalila bi se tudi ostalim profesorici, ki so kakorkoli prispevale k tej raziskovalni nalogi, ter profesorici iz medicinske fakultete, ki nam je bila pripravljena posoditi merilec krvnega sladkorja.

Na koncu bi se rada zahvalila tudi svojim staršem in družini za vso podporo.

Hvala vsem!

1 UVOD IN PREGLED OBJAV

Ena izmed najbolj zaskrbljujočih kroničnih bolezni 20. stoletja je diabetes (*Diabetes mellitus*). V zadnjih letih se je močno povečalo število primerov diabetesa tipa 2 pri otrocih in najstnikih, za katere je bila ta bolezen atipična. (D'Adamo, 2011; Dabelea, 2014) V zadnjih desetih letih se je pogostost diabetesa tipa 2 pri otrocih povečala iz 3% vseh diagnosticiranih primerov diabetesa, na 45%. (Pinhas-Hamiel, 2005)

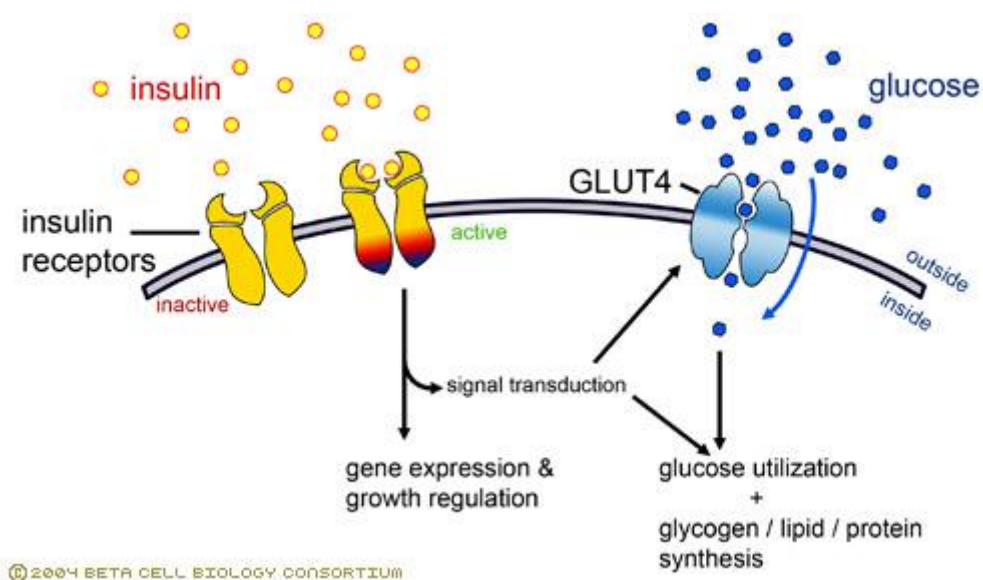
Diabetes se razvije zaradi zmanjšane občutljivosti (človeških) celic na hormon inzulin, ki je glavni protein pri celičnem sprejemu glukoze. Telo zmanjšano občutljivost kompenzira z večjimi količinami sintetiziranega inzulina, vendar pa dolgoročno ni sposobno hiperprodukcije, in tako se pojavi pomanjkanje inzulina. Posledično se koncentracija glukoze v krvi poveča (hiperglikemija). ((NDEP), 2014)

Krvni sladkor se v primeru diabetes tipa 2 nadzoruje z zdravili v obliki tablet, vendar pa se pogosto zgodi, da se ob kombinaciji zdravil in zahtevnejše telesne aktivnosti ali premajhnih obrokov pojavi hipoglikemija – krvni sladkor, nižji od normalnega. (Blumer, 2016) Poznamo zelišča in začimbe, katerim že dolgo časa pripisujejo pozitiven vpliv na sprejem glukoze v celice, saj naj bi zniževali krvni sladkor, ti pripravki pa so čebula, česen (El-Demerdash, 2005), zeleni čaj (Deng, 2013) in cimet. (Deng, 2013; Davis P. A., 2011)

Namen raziskovalne naloge je bil opazovati vpliv cejlonskega cimeta (*Cinnamomum verum*), ki je znan tudi pod imenom »pravi« cimet, in cimeta cassia (*Cinnamomum cassia*) na sprejem glukoze v celice pivske kvasovke (*Saccharomyces cerevisiae*). Takšni eksperimenti so na ljudeh neetični. Prav tako so raziskovalci dokazali, da sta človeški metabolizem in metabolizem kvasovk, inzulinska IGF/I reakcijska pot (Mohammadi, 2014; Bonafè, 2012), in GLUT4, transportne beljakovine (Shewan, 2013), ki se nahajajo v tkivih, na katere vpliva inzulin (MedScape, 2016), signifikantno podobne, zato lahko pivsko kvasovko uporabimo kot modelni organizem za človeka.

Glukozni transport večinoma poteka vzdolž koncentracijskega gradienta v človeku (MedScape, 2016) in v celicah kvasovk (Romano, 1982), vendar pa ta proces v določenih primerih potrebuje energijo (v primeru črevesja in ledvic). GLUT4 je najbolj

pogosta transportna beljakovina v skeletnih mišicah, maščobnem tkivo in v srcu, ki ohranja glukozno homeostazo. (Huang, 2007; MedScape, 2016) te transportne beljakovine so se ohranile skozi evolucijo, kar tudi potrjuje dejstvo, da si enake v človeku in v kvasovkah. (Shewan, 2013) GLUT4 transporterji imajo območje z ogljikovim hidratom, kamor se lahko veže protein, ki prinaša celici sporočilo. Ob celični stimulaciji so GLUT4 transportni proteini poslani z eksocitozo v plazmalemo, kjer se z njo spojijo in postanejo del te. Število GLUT4 proteinov se torej poveča v prisotnosti povišane koncentracije glukoze v medceličnini in s pomočjo teh se poveča sprejem glukoze v celico. Posledično se glukoza v krvni plazmi zmanjša. (MedScape, 2016)



Slika 1: Sprejem glukoze v celico s pomočjo inzulina in GLUT4 transportnega proteina¹

1.1 Cimet

Cimet je začimba, ki se zelo pogosto uporablja pri pripravi sladice. Že kitajska medicina omenja cimetovo sposobnost zmanjševanja plazemske glukoze in spremembe celičnega signaliziranja s pomočjo inzulina. (Davis P. A., 2011) Cimet pridobivamo iz notranjega dela lubja dreves iz rodu *Cinnamomun*, vendar pa ne poznamo le ene vrste cimeta. (CinnamonVogue, 2016)

¹ Pridobljeno iz <http://flipper.diff.org/app/items/info/4673>, dostopano 26. januar 2016

Le nekaj vrst se uporablja v prehranski industriji. Cejlonski cimet izvira iz Šrilanke in je znan po izjemnih učinkih na krvni sladkor. Vsebuje le nizke koncentracije kumarina, naravne substance z močnimi negativnimi vplivi na telo. (Cheng, 2014)

Poznamo pa tudi drug vrsto cimeta- cimet kasija, ki je na voljo v večini Severne Amerike, na Kitajskem in v večjem delu Azije. Ta vrsta cimeta izvira iz Kitajske in Indonezije in ima kar 1200 krat višje vsebnosti kumarina kot cejlonski cimet. Dolgotrajnejša uporaba tega cimeta lahko povzroči zdravstvene težave povezane predvsem z ledvicami in jetri. (Benefits of Honey, 2016)

Pozitivni vpliv cimeta je bil pripisan aktivni spojini cinamaldehydu, ki naj bi pospeševal produkcijo inzulina in povečal občutljivost celic na inzulin. Na živalih so dokazali, da cimetovi vidni ekstrakti povečajo izražanje receptorjev, ki imajo vlogo v regulaciji rezistentnosti na inzulin. (Allen, 2013)

1.2 Utemeljitev metodologije

Na podlagi znanstvenih člankov, ki potrjujejo podobnost med mehanizmom celičnega sprejemanja glukoze človeških celic in celic gliv kvasovk, sem se odločila, da bom uporabila najenostavnejšo metodo za določanje koncentracij glukoze pri koncentracijah med približno 4,0 in 20,0 mmol L⁻¹ (Mandal, 2013) in sicer aparat za merjenje krvne glukoze pri ljudeh. Pripravili smo glukozno raztopino s koncentracijo 10 mmol L⁻¹, saj je, kot piše Mandal, to mejna vrednost, ki loči diabetike in ne-diabetike. Prav tako smo se odločili, da sami ocenimo toksičnost obeh cimetov z Allium testom (Firbas, 2011) in se ne zanašamo le na podatke ostalih raziskovalcev, saj se vsebnost aktivnih spojin razlikuje od proizvajalca do proizvajalca, nas pa je zanimal le specifičen cimet, ki je na voljo v slovenskih bio-prodajalnah in ima označeno vrsto. Rezultati toksičnosti so namreč lahko ekstrapolirani iz čebulnih celic na človeške in tudi kvasne celice (Ennever, 1988; Hatayoglu, 2007)

1.3 Raziskovalni vprašanji in hipoteze

RV₁: Kako se bo spreminjala koncentracija glukoze v primerjavi z začetno koncentracijo, v odvisnosti od časa v glukozni raztopini z pivsko kvasovko (*Saccharomyces cerevisiae*) ob prisotnosti vodnega ekstrakta cejlonskega cimeta (*Cinnamomum verum*), v prisotnosti vodnega ekstrakta cimeta kasija (*Cinnamomum cassia*) ali v glukozni raztopini brez aditivov, in ali so razlike med njimi statistično značilne?

RV₂: Ali vodni ekstrakti cejlonskega cimeta in cimeta kasija zavirajo rast čebulnih (*Allium cepa*) korenin in ali so razlike med toksičnostjo obeh ekstraktov v primerjavi z kontrolo, določene z *Allium* testom, statistično značilne?

H₁: Glukozna koncentracija se bo zmanjševala v odvisnosti od časa v obeh opazovanih eksperimentalnih skupinah in v kontroli.

H₂: Med vzorci, ko bomo dodali vodni ekstrakt cejlonskega cimeta, cimeta kasija in v primeru kontrole, bodo signifikantno značilne razlike v koncentraciji glukoze v odvisnosti od časa.

H₃: Cejlonski cimet bi naj imel pozitiven učinek na sprejem glukoze v celice in cimet kasija negativni, mutageni učinek, zato bo *Allium* test pokazal mutagenost cimeta kasija tako, da bodo korenine, zrasle v tem ekstraktu krajše in dedni material bo mutiral.

2 MATERIALI IN METODE DE LA

2.1 MATERIALI

- Suhe pivske kvasovke (Dr. Oetker, L218)
- Čebulne čebulice *Allium cepa* (Semenarna Ljubljana d.d.)
- Zmlet cejlonski cimet *Cinnamomum verum* (Sonnetor GmbH)
- Zmlet cimet kasija *Cinnamomum cassia* (Sonnetor GmbH)
- Standardne epruvete (18×100mm)
- Merilni valji (100 mL, 500 mL)
- Merilne bučke Scott (250 mL ± 0.5 mL)
- Čaše (30 mL, 500 mL)
- Erlenmajerice (250 mL) z pokrovčki
- Plastične petrijevke premera 9 cm
- Avtomatske pipete z pripadajočimi tipsi (10-100 µL, 100-1000 µL, 1-10 mL)
- Pasteurjeve pipete (5 mL)
- Centrifugirke (15 mL)
- Kivete (Ratiolab, 27110)
- Krovna in objektna stekelca za mikroskopijo
- Filter papir
- Pinceta
- Nož
- Parafilm
- Spatula Drigalski
- Aluminijska folija (Mercator)
- Bombažne blazinice (dm)
- Rokavice (Nitril)

2.2 Laboratorijske aparature

- Magnetsko mešalo in grelnik (WiseStir MSH-20D)
- Merilec krvnega sladkorja OneTouch Ultra LIFESCAN z testnimi lističi
- Centrifuga
- Tehnica (±0.001 g) (Kern)
- Stresalnik za epruvete RS-VA10 (Phoenix)
- Brezzračna komora
- UV-Vis spektrofotometer (Vernier)
- Prenosni računalnik z programom Logger Pro 3.8.4.2
- Mikroskop ICC50 (Leica)
- Gorilnik (Campingaz)
- Termometer (HANNA CheckTemp1)
- Avtoklav CertoClav CVEL 12 LGS (LGA, Nurnberg)

2.3 Kemikalije

- Destilirana voda
- D-glukoza (Fluka)
- Pepton (Fluka)
- Kvasni ekstrakt (Kemika, Zagreb)
- Absolutni etanol $\geq 99.8\%$ (Sigma-Aldrich)
- Absolutna etanojska kislina $\geq 99.8\%$ (Sigma-Aldrich)
- Glacialna etanojska kislina $\geq 99.8\%$ (Sigma-Aldrich)
- Karmin (Merck)
- Natrijev klorid (Mercator)

2.4 Eksperimentalni postopek

Raziskava je bila zvedena v šolskem laboratoriju v času med decembrom 2015 in januarjem 2016. Sestavljena je bila iz dveh ločenih delov. V prvem delu smo opazovali vpliv obeh vrst cimeta na sprejem glukoze v celice pivske kvasovke in v drugem delu toksičnost obeh cimetov s pomočjo Allium testa.

2.4.1 Sprejem glukoze v celice pivske kvasovke v prisotnosti vodnega cimetovega ekstrakta (cejlonskega ali kasija) in v kontroli

2.1.1.1 Pred-eksperimenti

Metoda še ni bila nikjer omenjena v znanstvenih člankih, zato so bili pogoji določeni na podlagi pred-eksperimentov. Merilec krvnega sladkorja smo najprej kalibrirali z pripravljenimi glukoznimi raztopinami z znanimi koncentracijami (Priloga 1). Med izmerjenimi in pričakovanimi vrednostmi in ni bilo opaženih nobenih značilnih razlik.

Najbolj ugodni pogoji za rast pivske kvasovke so bili določeni spektrofotometrično z optično gostoto pri 600.7 nm. Ugotovili smo, da je bolj pomemben dostop zraka (Homepages.gac.edu, 2015) pri mešanju z magnetnim mešalom pri 23°C, kot zagotavljanje optimalne temperature - 30°C, če se je treba odločiti med dvema faktorjema. (Priloga 2)

Ker so bile uporabljene suhe kvasovke, so morali biti časi meritev skrbno določeni. Na podlagi pred-eksperimenta, pri katerem merili koncentracije glukoze vsakih 15 minut v dveh kontrolnih skupinah, smo določili, da je najbolje pustiti celicam, da se aktivirajo 60 minut in nato nadaljevati z meritvami vsakih 30 minut. Potrebno je bilo omejiti število meritev, ker je metoda draga.

2.1.1.2 Priprava cimetovih ekstraktov

Cimetova ekstrakta sta bila pripravljena v razmerju 1:6; 5 g specifičnega mletega cimeta (kasija ali cejlon) smo raztopili v 30 mL destilirane vode in vreli pet minut v vodni kopeli. (Cheng, 2014). Metoda se je izkazala za neprimerno, saj se je cimet kasija spremenil namesto v tekoč ekstrakt, v želatini podobno substanco in je zato bilo nemogoče iz nje pridobiti ekstrakt.



Slika 2: Cimet kasija se je v vreli vodni kopeli spremenil v želatini podobno substanco (lasten vir)

Ekstrakti so zato bili pripravljene v enakem razmerju, vendar pa smo jih le segrevali pet minut in to nikakor ne do vretja. Ekstrakte smo potem aseptično prenesli v centrifugirke in centrifugirali 10 minut pri 5000 rpm. Potem smo ekstrakte pustili pol ure na hladnem, da se je izločilo olje, ki naj bi vsebovalo kumarin. Olje smo odstranili in ekstrakt uporabili v eksperimentu.

2.1.1.3 Nastavitev poskusa

Naslednje je bilo pripravljeno in sterilizirano v avtoklavu:

- Erlenmajerice z 50 mL 10 mmol L^{-1} glukoze raztopine, pokrite z pokrovčki in aluminijasto folijo
- 28 epruvt z 9 mL fiziološke raztopine (0,9% natrijev klorid)
- YEPD agar pripravljen z kuhanjem 2% D-glukoze, 2% peptona, 2% agarja in 1% kvasnega ekstrakta v 0,5 L destilirane vode.

Potem smo dodali sterilni magnet, potopljen v 70% etanol, v vsako erlenmajerico z sterilno raztopino glukoze in jih postavili na magnetno mešalo (vzdrževana temperatura je bila $23.0^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ in število vrtljajev 600 rpm). Temperatura okolja je

bila $24.0^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$, v času eksperimenta. Dodali smo 0,013 g suhega kvasa Dr. Oetker vsaki erlenmajerici in pustili pet minut, da se je raztopil. Potem smo v eksperimentalne skupine dodali še 1 mL specifičnega ekstrakta (cejlonski ali kasija) in pustili eno minuto, da se je zmešalo. Nato smo vzeli prve vzorce.



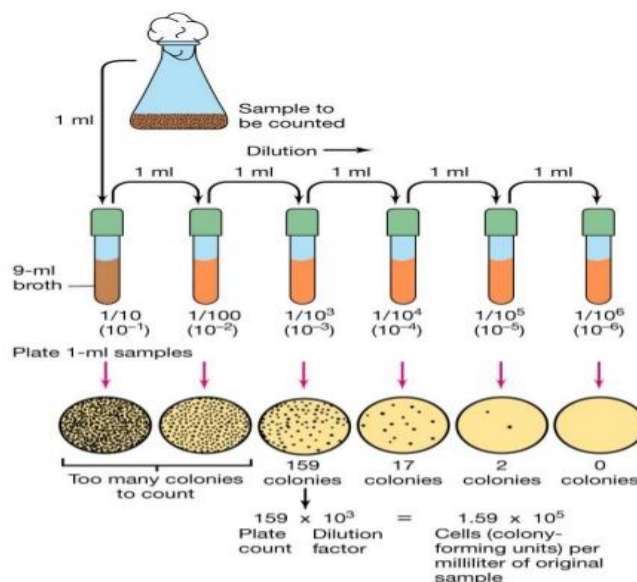
Slika 3: Erlenmajerice z vzorci na magnetnih mešalih (lasten vir)

2.1.1.4 Meritve

Ob določenem času (0, 60, 120, 150, 180 minut) smo iz vsake erlenmajerice vzeli 10 μL raztopine z avtomatsko pipeto in izmerili koncentracijo glukoze z merilcem krvnega sladkorja. Iz vsake erlenmajerice smo vzeli še 3 mL in izmerili optično gostoto pri 600.7 nm. Ko smo izmerili koncentracijo glukoze in optično gostoto po 60 minutah, smo dodali v eksperimentalne vzorce še mililiter specifičnega ekstrakta (cejlon ali kasija). Spektrofotometer je bil ponovno kalibriran, tako da dodatek cimeta ni vplival na optično gostoto. Meritve so bile ponovljene ob omenjenih časih. Po 60. minuti nismo dodali več ekstraktov.

Po koncu eksperimenta smo pripravili redčitveno vrsto za vsako eksperimentalno in kontrolno skupino tako kot je prikazano na spodnji shemi. 100 μL petkrat redčene raztopine smo aseptično premazali preko YEPD agarja in pustili 3 dni v inkubatorju pri 30°C . CFU smo prešteli in povprečne koncentracije kvasovk v testirani raztopini

so bile: $1,7 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ v primeru kontrole, z dodatkom cejlonskega cimeta $1,9 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ in z dodatkom cimeta kasija $1,6 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$.



Slika 4: Priprava redčitvene vrste²

Eksperiment smo ponovili večkrat, saj nismo imeli na voljo dovolj opreme. Skupaj smo opazovali pet kontrolnih vzorcev, pet vzorcev z dodanim vodnim ekstraktom cejlonskega cimeta in tri z dodanim vodnim ekstraktom cimeta kasija.

2.1.1.5 Izračuni sprememb

Ker je začetna koncentracija variirala od enega do drugega vzorca, ne bi bilo relevantno opazovati povprečnih vrednosti. Zato smo izračunali spremembe v koncentraciji, v primerjavi z začetno koncentracijo glukoze ob času 0 in tako dobili procent glukozone koncentracije, ki je še ostal v raztopini po določenem času.

$$\text{Koncentracija (\%)} = \frac{\text{Glukozna koncentracija ob specifičnem času}}{\text{Začetna glukozna koncentracija ob času } t = 0} [\%]$$

² Pridobljeno iz: <http://www.slideshare.net/HamaNabaz/water-microbiology-21923074>, 26. januar 2016

2.4.2 Allium test

Pripravili smo naslednje:

- Fiksativ iz glacialne etanojske kisline ($\geq 99.8\%$) in etanola v razmerju 1:3
- Acetokarmin pripravljen z segrevanjem 0,5 g karmina, 45 mL glacialne etanojske kisline in 55 mL destilirane vode

Allium test se uporablja za določevanje toksičnosti tekočih vzorcev. (Firbas, 2011) pripravili smo tri različne, a visoke koncentracije vodnega cejlonskega cimetovega ekstrakta in vodnega ekstrakta cimeta kasije.

Zmešali smo eno čajno žličko (0,750 g), dve čajni žlički (1,500 g) ali tri čajne žličke (2,250 g) specifičnega cimeta v 300 mL destilirane vode in segrevali pet minut v vodni kopeli. Ekstrakte smo potem prefiltrirali in z njimi napolnili epruvete (z vsako koncentracijo in kontrolo, destilirano vodo, smo napolnili 8 epruvet). Čebulice *Allium cepa* smo nato odrezali na basal stem in potopili v raztopine. Raztopine smo dodajali dnevno, saj je pomembno, da so koreninice vedno potopljene, da se ne izsušijo.

Daljše kot zrastejo koreninice, manj je vzorec toksičen in je posledično bolj kvaliteten. Toksičnost je lahko tudi tako velika, da ne le zavira rast korenin, temveč tudi poškoduje dedni material. (Firbas, 2011)

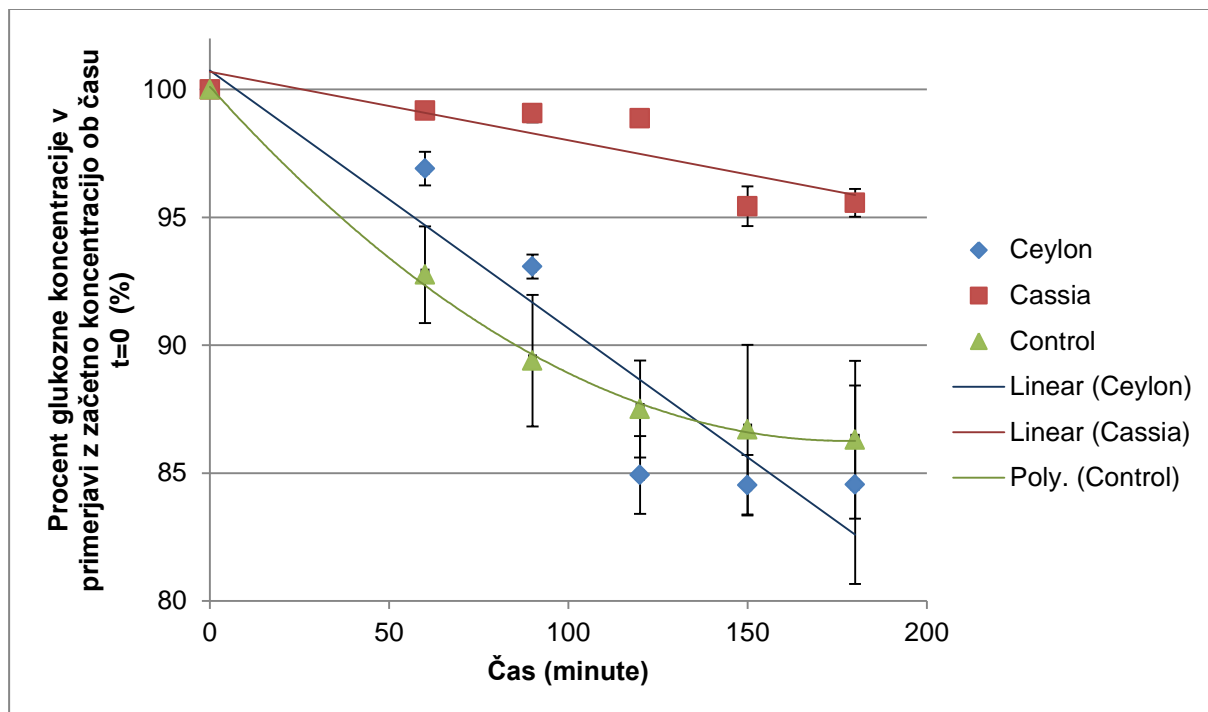


Slika 5: Allium test z tremi različnimi koncentracijami (od leve proti desni) cejlonskega cimeta, cimeta kasija in kontrolo (lasten vir)

Čebulice smo pustili rasti štiri dni in po tem času smo izmerili dolžine najdaljših koreninic na vsaki čebulici, jih odrezali in dali v fiksativ. Koreninice smo nato dodali k 2 mL barvila acerokarmin in vreli oboje 2 minuti na gorilniku. (Roberts, 1974) Iz koreninic smo nato pripravili vzorce, ki smo jih pregledali pod mikroskopom pri 400× in 1000× povečavi. Opazovali smo mitotski indeks in oblike celic.

3 REZULTATI

Graf 1: Spreminjanje procenta glukoze koncentracije v odvisnosti od časa v raztopini pivske kvasovke v treh različnih pogojih: ob dodanem vodnem ekstraktu cejlonskega cimeta, cimeta kasija in v kontroli



Kontrola (graf najboljšega ujemanja, eksponenten, in R^2 vrednost):

$$y = 0,0004x^2 - 0,1556x + 100,11$$
$$R^2 = 0,9975$$

Interval znotraj katerega so bile izmerjene koncentracije: 12,1-17,4 mmol L⁻¹

Cejlonski cimet (graf najboljšega ujemanja, linearna, in R^2 vrednost)

$$y = -0,1008x + 100,74$$
$$R^2 = 0,8885$$

Interval znotraj katerega so bile izmerjene koncentracije: 11,7-15,5 mmol L⁻¹

Cimet kasija (graf najboljšega ujemanja, linearna, in R^2 vrednost):

$$y = -0,0268x + 100,71$$
$$R^2 = 0,7557$$

Interval znotraj katerega so bile izmerjene koncentracije: 16,2-17,0 mmol L⁻¹

Tabela 1: Povprečne vrednosti glukoze koncentracije (%) in standardne deviacije³ v odvisnosti od časa ob dodatku vodnega ekstrakta cejlonskega cimeta, cimeta kasija in v kontroli

Čas (min)	Cejlonski cimet		Cimet kasija		Kontrola	
	Povprečna vrednost [%]	Standardna deviacija (±) [%]	Povprečna vrednost [%]	Standardna deviacija (±) [%]	Povprečna vrednost [%]	Standardna deviacija (±) [%]
0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0
60	96,9	0,7	99,2	0,2	92,8	1,9
90	93,1	0,5	99,1	0,4	89,4	2,6
120	84,9	1,5	98,9	0,1	87,5	1,9
150	84,5	1,2	95,4	0,8	86,7	3,3
180	84,6	3,9	95,6	0,5	86,3	3,1

Tabela 2: Primerjava p-vrednosti T-testa⁴ znotraj opazovanih vzorcev pri različnih časovnih intervalih; statistično značilne razlike so sivo senčene

p-vrednosti T-testa (primerjava enakih vzorcev pri različnih časovnih intervalih)			
Specifična skupina primerjana pri naslednjih časovnih intervalih (min)	Kontrola	Cejlonski cimet	Cimet kasija
0 in 60	0,00156	0,00193	0,02908
60 in 90	0,12099	0,00636	0,22540
90 in 120	0,02256	0,00499	0,43805
120 in 150	0,51572	0,69174	0,02644
150 in 180	0,74736	0,99155	0,82690
0 in 90	0,00118	0,00013	0,04410
90 in 150	0,02131	0,00187	0,03953
120 in 180	0,27389	0,88727	0,01816
0 in 180	0,00089	0,00625	0,00744

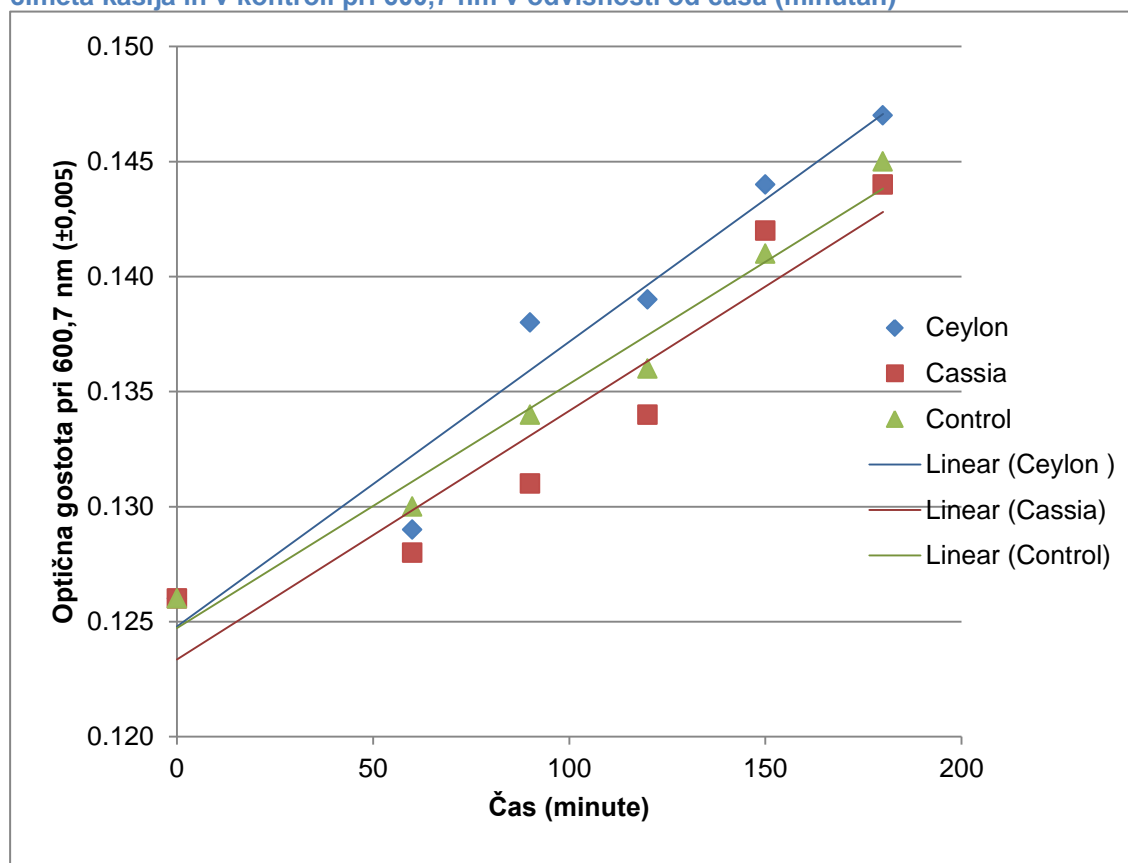
³ Povprečja in standardne deviacije smo izračunali s pomočjo računalniškega programa Excel.

⁴ T-test je bil izračunan s pomočjo računalniškega programa Excel. Izračunane vrednosti so v bistvu p-vrednosti. Če je $p \leq 0.05$ so razlike med opazovanimi skupinami statistično značilne.

Tabela 3: Primerjava p-vrednosti T-testa med različnimi opazovanimi vzorci v istih časovnih intervalih; statistično značilne razlike so sivo osenčene

p-vrednosti T-testa (primerjava različnih eksperimentalnih skupin pri enakih časovnih intervalih)			
Čas (min)	Kontrola in cejlon	Kontrola in kasija	Cejlon in kasija
0	0,00000	0,00000	0,00000
60	0,02117	0,00218	0,00192
90	0,04459	0,00145	0,00001
120	0,08645	0,00026	0,00051
150	0,27638	0,00457	0,00006
180	0,54558	0,00302	0,01469

Graf 2: Optična gostota vzorcev pivske kvasovke z dodanim ekstraktom cejlonskega cimeta ali cimeta kasija in v kontroli pri 600,7 nm v odvisnosti od časa (minutah)



Graf 3: Dolžine korenin *Allium cepa* v odvisnosti od koncentracije (g cimeta mL⁻¹) raztopine v kateri so rastle (dolžina kontrolnih rastlin je pri koncentraciji 0)

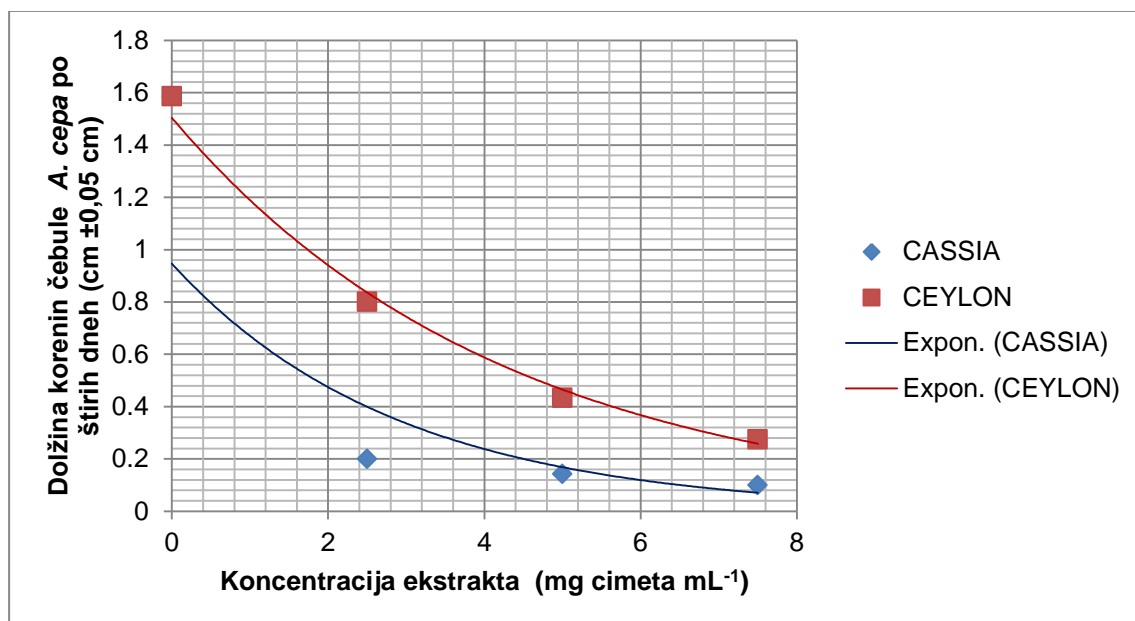


Tabela 4: Število celic čebule *Allium cepa* v specifični fazi celičnega cikla pri različnih koncentracijah vodnih ekstraktov cejlonskega cimeta, cimeta kasija in kontroli

			Število prešteti celic v specifičnem stadiju celičnega cikla				
Tip testirane tekočine	Koncentracija raztopine (mg mL ⁻¹)	Št. poskusa					
			Profaza	Metafaza	Anafaza	Telofaza	Interfaza
Kontrola	0,0	1	34	1	2	3	10
		2	33	1	1	4	11
		3	34	0	2	6	8
		4	34	1	2	2	11
		5	33	1	2	5	9
Cejlinski cimet	2,5	1	47	1	1	1	0
		2	45	1	2	2	0
		3	44	1	4	1	0
		4	44	2	1	3	0
		5	42	0	1	7	0
	5,0	1	36	1	8	5	0
		2	40	3	1	6	0
		3	37	4	2	7	0
		4	38	2	4	6	0
		5	37	2	5	6	0
	7,5	1	45	0	2	3	0
		2	43	2	2	3	0
		3	45	1	1	3	0
		4	45	1	2	2	0
		5	44	1	2	3	0

Cimet kasija	2,5	1	50	0	0	0	0
		2	50	0	0	0	0
		3	50	0	0	0	0
		4	50	0	0	0	0
		5	50	0	0	0	0
	5,0	1	50	0	0	0	0
		2	50	0	0	0	0
		3	50	0	0	0	0
		4	50	0	0	0	0
		5	50	0	0	0	0
	7,5	1	50	0	0	0	0
		2	50	0	0	0	0
		3	50	0	0	0	0
		4	50	0	0	0	0
		5	50	0	0	0	0

Tabela 5: Mitotski indeks v čebulnem rasnem vršičku pri različnih koncentracijah cimeta

	Koncentracija (mg cimeta mL ⁻¹)	Število prešteti celic	Skupno število celic, ki se delijo	Povprečno število prešteti celic	Povprečno število celic, ki se delijo	Mitotski indeks
Kontrola		250	84	50	16.8	0.336
Cejlonski cimet	2,5	250	250	50	50	1.000
	5,0	250	250	50	50	1.000
	7,5	250	250	50	50	1.000
Cimet kasija	2,5	250	250	50	50	1.000
	5,0	250	250	50	50	1.000
	7,5	250	250	50	50	1.000

4 DISKUSIJA IN EVALUACIJA

Rezultati predstavljeni v Grafu 1 kažejo, da se je koncentracija glukoze zmanjšala v vseh opazovanih skupinah. Koncentracija glukoze se je po 180 minutah znižala na 86,3% začetne koncentracije v primeru kontrole. Razlika v primerjavi z začetno koncentracijo statistično značilna ($p=0,001$)⁵. V primeru, ko smo dodali ekstrakt cejlonskega cimeta, se je koncentracija znižala na 84,6% začetne koncentracije ($p=0,006$) in pri dodatku cimeta kasija na 95,6% ($p=0,007$).

Statistično značilne razlike so med začetno in končno koncentracijo v vseh treh poizkusih (Tabela 2). Celice pivske kvasovke v glukozni raztopini sprejemajo glukozo, da lahko opravljajo vse celične funkcije, oz. v našem primeru, da se celice najprej sploh aktivirajo in začnejo metabolne procese. (Youk, 2016; Weusthuis, 1994) Opazili smo zanimivo tendenco pri kontroli, saj so se hitrosti glukoznega sprejema (gradient krivulje se zmanjšuje) spreminjale v odvisnosti od časa in prav tako niso bile enake v vseh opazovanih vzorcih. Zato bi lahko rekli, da so se celice aktivirale že v prvih 60 minutah (92,8% začetne koncentracije). Ko pa smo dodali ekstrakte, se nivo glukoze ni znižal na enak način. V primeru cejlonskega cimeta, se je nivo v 90 minutah znižal na 93,1% začetne koncentracije, za razliko od kontrole, ki je vsebovala 89,4% začetne glukoze. Vendar pa se je v primeru cejlonskega cimeta koncentracija po 120 minutah znižala na 84,9%. V primeru cimeta kasije se nivo ni močno znižal do 120. minute. Potem se je koncentracije sicer znižala (98,9%), vendar je bila razlika zelo majhna v primerjavi z drugima opazovanima skupinama.

Opazila sem, da je hitrost reakcije v odvisnosti od časa stremela k nič. Nivo glukoze se ni več spreminjal v primerjavi z začetnimi spremembami. Prvi del glukoznega metabolizma, ki poteka v citoplazmi se imenuje glikoliza in v neki točki ta proces doseže stabilno stanje, v katerem celica sprejme dovolj glukoze za svoje delovanje, zato se koncentracija glukoze v okolju ne spreminja več. (Bakker, 2010) To bi lahko bilo povezano z načinom, kako glukoza vstopa v celice. Difuzija skozi proteinske kanalčke, ki poteka vzdolž koncentracijskega gradienta je namreč odvisna od gradienta. (Romano, 1982) Če se ustvari enakomerno porazdeljena koncentracija,

⁵ Razlike so statistično značilne, če je $p \leq 0,05$.

glukoza ne vstopa več v celice z takšno hitrostjo in posledično se hitrost sprejema zniža. To tezo bi lahko potrdili tudi moji grafi.

Procent glukozne koncentracije v odvisnosti od časa lahko prikažemo s kvadratno enačbo $y=0,0004x^2 - 0,1556x + 100,11$. R^2 vrednost za dobljene vrednosti je bila 99,75%, kar je zelo visoko ujemanje. Enačbi, ki najboljše prikažeta spremembo koncentracije v primeru cejlonskega cimeta je bila linearna, z enačbo $y=-0,1008x + 100,74$ in R^2 vrednost 88,85%) in za cimet kasija $y=-0,0268x + 100,71$, in R^2 vrednost 75,57%). R^2 vrednosti v primeru teh linearnih enačb sta bili veliko nižji, kot v primeru eksponentne enačbe, ki prikaže spremembe koncentracij pri kontroli. S pomočjo grafa lahko sklepamo, da linearna enačba ne prikaže sprememb dovolj natančno. V primeru dodanih cimetov lahko opazimo, da sprememba sprva sledi linearnemu padanju koncentracij, potem pa se ta trend spremeni in bolj sledi eksponentni enačbi, kot v primeru kontrole. Ta opažanja tudi ne zanikajo teze, da se hitrost reakcije v odvisnosti od časa približuje vrednosti nič, le v primeru, da bi spremembe popolnoma sledile linearni enačbi bi to lahko predlagali. Prav tako p-vrednosti v Tabeli 2 potrjujejo, da se koncentracija ni spreminjala značilno med 150 in 180 minutami.

V drugi hipotezi sem predpostavila, da bodo med različnimi opazovanimi vzorci (dodan cejlonski cimet, cimet kasija in kontrola) značilne razlike. Nivo glukoze se je v primeru kontrole znižal za 7,2% v prvih 60 minutah, med 60. in 120. minuto dodatnih 5,3% in v zadnjih 60 minutah samo 1,2%. Nasprotno pa se v prvih 90 minutah koncentracija v primeru dodanega ekstrakta cejlonskega cimeta ni veliko spremenila. Sprememba je bila v povprečju 6,9% in koncentracije so bile signifikantno višje v primerjavi z kontrolo (po 60 minutah $p=0.021$ in pri 90 minutah 0.044). Po 120 minutah se je koncentracija glukoze v primeru cejlonskega cimeta zmanjšala, vendar je bila koncentracija neznačilno nižja od tiste, pri kontroli.

Dodan ekstrakt cimeta kasije je celo zaviral sprejem glukoze in to je v nasprotju z pričakovanji. Mnogi raziskovalci so namreč opazili pozitiven vpliv cimeta kasija na sprejem glukoze v primerjavi z kontrolo (Kumar, 2014), česar pa nismo dokazali v tej raziskavi, saj so p-vrednosti, ki primerjajo razlike med koncentracijami z dodanim cimetom kasija in obema ostalima pogojevma, pokazale, da so bile razlike v

koncentracij v primeru dodanega cimeta kasija statistično značilno višje (Tabela 3). Tudi drugi raziskovalci v svojih raziskavah niso uspeli dokazati statistično značilnih razlik med kontrolo in eksperimentom, med katerim so v gojišče z glukozo dodajali cimet (Ranasinghe, 2012).

Na podlagi rezultatov smo drugo hipotezo, da bodo razlike v koncentraciji med vzorci z dodanim cimetom in kontrolo statistično značilne, zavrnil. Vzrokov za nepričakovane rezultate je več. Vsebnost aktivnih substanc kot je kumarin, ki je toksičen (Benefits of Honey, 2016), in cinamaldehyd se spreminja od proizvajalca do proizvajalca in načina pridelave. (Allen, 2013) Vsebnosti so odvisne tudi od območja, kjer je cimet pridelan in ker nismo našli nobenih poročil, koliko specifičnih aktivnih substanc naj bi vseboval cimet, ki so ga uporabili v drugih raziskavah, je nemogoče narediti primerjavo in odkriti vzroke za razlike.

Prav tako je bila večina omenjenih raziskav narejena *in vivo*, na ljudeh, oziroma na živalih, zato je morda razlog, da rezultatov *in vitro* raziskav ne moremo primerjati z tistimi, narejenimi *in vivo*, saj se makromolekule drugače povezujejo in vplivajo ena na drugo v bolj kompleksnih organizmih. (Bakker, 2010) Morda je več različnih dejavnikov in molekul prisotnih v organizmu, ki vplivajo na spremembo mehanizma glukoznega sprejema pri človeku in povečajo učinkovitost cimeta, enakih substanc pa pri kvasovkah ne najdemo. Rezultatov torej ne moremo generalizirati iz kvasovk na ljudi, saj iz te raziskave ne moremo poznati razlik med eksperimenti *in vitro* in *in vivo*.

Ekstrakte smo k raztopini dodali dvakrat. Na začetku eksperimenta in po 60 minutah. Možno je, da se učinek ekstrakta zmanjšuje v odvisnosti od časa, in da bi morali cimet dodajati bolj pogosto (morda bi ob ponovnem dodatku cimeta dobili statistično značilne razlike med cejlonskim cimetom in kontrolo). Tako so namreč narejene raziskave na ljudeh. Ljudje uživajo kapsule cimeta daljše časovno obdobje. Meta analiza je pokazala, da so ljudje z diabetesom tipa 2, ki so uživali cel cimet ali cimet v prahu imeli statistično značilne razlike v krvnem sladkorju, izmerjenim na tešče, v primerjavi z ljudmi, ki so uživali placebo. (Davis P. A., 2011; Allen, 2013) Cimet so uživali dnevno do 18 tednov, preden so bile primerjave narejene. Morda cimet nima

takojšnjega učinka in ga je potrebno uživati daljše časovno obdobje, da vpliva na metabolne poti.

Namen drugega dela raziskovalne naloge je bilo določiti toksičnost uporabljenih vzorcev cejlonskega cimeta in cimeta kasija z Allium testom. (Firbas, 2011) Tretja hipoteza, da bo Allium test pokazal toksičnost cimeta kasije v primerjavi z kontrolo je potrjena. Tri visoke koncentracije vodnih ekstraktov obeh cimetov so vlivale na rast koreninic, ki so veliko krajše kot pri kontroli. Na grafu 3 je opazna negativna korelacija med dolžino koreninic čebule in koncentracijo ekstrakta. Korenine so bile krajše, ko so rasle v ekstraktu cimeta kasija, kot pri isti koncentraciji cejlonskega cimeta. To pomeni, da je cimet kasija bolj toksičen kot cejlonski cimet. (Firbas, 2011) Oba cimeta sta torej pokazala toksičnost v primerjavi z kontrolo.

Koreninice čebule so v ekstraktu cimeta kasije zrasle le do 2 mm v vseh opazovanih koncentracijah, kar pomeni, da tudi podvajanje koncentracije pri tako visokih koncentracijah ne spremeni toksičnosti. Tudi cejlonski cimet se je izkazal za toksičnega, vendar pa pri nižjih koncentracijah predstavlja le nizek zaviralni učinek, če predpostavimo, da graf (Graf 3) predstavlja resnično spreminjanje tudi v nižjih koncentracijah.

Ko smo koreninice opazovali pod mikroskopom smo opazili, da so se samo v primeru kontrole pojavljale celice v interfazi (mitotski indeks 0,336). V primeru cejlonskega cimeta, so bile vse celice v različnih fazah celične delitve delitve (mitotski indeks je bil 1). Večina je bila v profazi, vendar pa je v povprečju bila najmanj ena celica od petdesetih v vsaki od ostalih stopenj celične delitve. V nasprotju temu pa se je celični cikel celic koreninic čebule, ki so rasle v ekstraktu cimeta kasija ustavil v profazi v vseh opazovanih celicah (mitotski indeks 1). Celice so bile nepravilnih oblik, v primerjavi z celicami, ki so zrastle v kontroli. To je verjetno posledica zelo visokih koncentracij cimeta kasija. Ekstrakt cimeta kasija je torej toksičen in tretja hipoteza je bila potrjena.

Iz Graf 2 je razvidno kaj se je verjetno zgodilo med eksperimentom. Optična gostota pri 600.7 nm je pokazala, da med opazovanimi vzorci tudi na koncu ni bilo razlik med koncentracijami pivskih kvasovk, saj so vse vrednosti znotraj ranga, ki ga zaznamuje

zanesljivost aparata (0,005). Ekstrakti torej kratkotrajno niso zavirali celičnih delitev, morda pa so vseeno zavirali aktivacijo celic in vplivali na sprejem glukoze do določene točke.

5 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Raziskovalna naloga ima pomemben zaključek. Rezultati so namreč pokazali, da je cimeta kasija v visokih koncentracijah močno toksičen, zato bi predlagala, da se naredi več raziskav s tej smeri. Cimeta je namreč na voljo v večini bio-trgovin kot so Norma in Biotopic, potrošniki pa se v veliki večini ne zavedajo negativnih učinkov tega cimeta. Zavedam se, da so bile testirane koncentracije zelo visoke in so zato povzročile popolno spremembo celic, vendar pa bi, kot omenja Firbas (2011) lahko prišlo do genskih mutacij, morda pri nižjih koncentracijah.

Zanimivo in družbeno odgovorno bi bilo tudi raziskati, če je cimeta kasija toplotno stabilen in s čim je povezana formacija želatini podobne substance ob vretju (Slika 2), ker se cimeta pogosto uporablja v jedeh, ki so izpostavljene visokim temperaturam.

Cejlonski cimeta je dobra alternativa (Medagama, 2015), vendar pa menim, da bi morali biti potrošniki obveščeni o tveganjih, povezanih z pogosto uporabo cimeta kasija.

6 ZAKLJUČEK

Kot smo predvideli se je koncentracija glukoze v vseh opazovanih pogojih zniževala v odvisnosti od časa v raztopini z pivsko kvasovko, vendar pa so koncentracije variirale med posameznimi skupinami. Cejlonski cimet ima potencialno pozitiven vpliv na sprejem glukoze, vendar razlike niso bile statistično značilne in bi to bilo potrebno preizkusiti v nadaljnjih raziskavah. Toksičnost cejlonskega cimeta je nižja v primerjavi z ekstraktom cimeta kasije. Ekstrakt cimeta kasije se je namreč izkazal za močno toksičnega in je v celicah povzročil celične deformacije v visokih koncentracijah in imel celo zaviralni učinek na sprejem glukoze v celice pivske kvasovke.

Poskus bi bilo potrebno ponoviti z že aktiviranimi celicami pivske kvasovke, ki bi jih dodali raztopini, saj se zdi, da je v tem eksperimentu cimet vplival zaviralno na aktivacijo celic. To bi pojasnilo, da se je koncentracija glukoze začela zniževati šele po 60-90 minutah, medtem ko se je v primeru kontrole koncentracija najbolj znižala na začetku eksperimenta. Ta zaviralni učinek je lahko tudi povezan z tendenco, ki smo jo opazili pri Allium testu, kjer se je dolžina koreninice čebule zniževala z naraščajočo koncentracijo cimeta.

Zanimivo bi bilo tudi preizkusiti spreminjanje koncentracije glukoze, če bi konstantno dodajali cimetov ekstrakt in ne samo na začetku eksperimenta in po šestdesetih minutah. Tako so namreč raziskave narejene na ljudeh- ljudje uživajo cimet čez daljše časovno obdobje in njihova plazemska glukozna koncentracijo so merili šele čez daljše obdobje in jo primerjali z rezultati skupine, ki je uživala placebo. V tem eksperimentu smo namreč opazovali le takojšnji odziv celic na cimet, morda pa je hitrejši sprejem glukoze povezan z spremembo mehanizma, ki traja dalj časa.

6 REFERENCE

1. (NDEP), N. D. (2014, Julij). *Overview of Diabetes in Children and Adolescents*. Povzeto Januar 26, 2016, iz http://www.niddk.nih.gov/health-information/health-communication-programs/ndep/living-with-diabetes/youth-teens/diabetes-children-adolescents/Documents/overview-of-diabetes-children-508_2014.pdf
2. Allen, R. W. (2013, September). Cinnamon Use in Type 2 Diabetes: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis.
3. Bakker, B. M. (2010). Systems biology from microorganisms to human metabolic diseases - the role of detailed kinetic models. *Biochemical Society Transactions*, 5(38), 1294-1301.
4. Benefits of Honey. (2016). *Benefits-of-Honey.com*. Povzeto Januar 22, 2016, iz Ceylon Cinnamon Versus Cassia Cinnamon: <http://www.benefits-of-honey.com/ceylon-cinnamon.html>
5. Blumer, I. (2016). *Non-insulin drugs to lower blood glucose*. Povzeto Januar 26, 2016, iz Our diabetes: <http://www.ourdiabetes.com/drugs-to-lower-blood-glucose.htm>
6. Bonafè, M. B. (2012, Julij). Polymorphic Variants of Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) Receptor and Phosphoinositide 3-Kinase Genes Affect IGF-I Plasma Levels and Human Longevity: Cues for an Evolutionarily Conserved Mechanism of Life Span Control - See more at: <http://press.endoc. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism>, 88(7).
7. Cheng N., L. L. (2014, Maj 24). Process for preparing water extract of cinnamon. *Patent Application Publication*.
8. Cheng, N. L. (2014, Maj 24). Process for preparing water extract of cinnamon. *Patent Application Publication*.
9. CinnamonVogue. (2016). *cinnamonvogue.com*. Povzeto January 22, 2016, iz Types of Cinnamon: http://www.cinnamonvogue.com/Types_of_Cinnamon_1.html
10. D'Adamo, E. C. (2011, Maj). Type 2 Diabetes in Youth: Epidemiology and Pathophysiology. *Diabetes Care*, 34(2).
11. Dabelea, D. e. (2014, Maj 7). Prevalence of Type 1 and Type 2 Diabetes Among Children and Adolescents From 2001 to 2009. *JAMA*, 311(17), 1778-1786.
12. Davis, P. A. (2011, September). Cinnamon Intake Lowers Fasting Blood Glucose: Meta-Analysis. *Journal of Medicinal Food*, 14(8), 884-889.
13. Davis, P. A. (2011, September). Cinnamon Intake Lowers Fasting Blood Glucose. *Journal of Medicinal Food*, 14(9), 884-889.
14. Deng, R. (2013, April 15). *A Review of the Hypoglycemic Effects of Five Commonly Used Herbal Food Supplements*. Povzeto Januar 13, 2016, iz <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626401/>

15. El-Demerdash, F. M. (2005, Januar). Biochemical study of the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rates. *Food and Chemical Toxicology*, 43(1), 57-63.
16. Ennever, F. K. (1988). The ability of plant genotoxicity assays to predict cancerogenicity. *Mutation Research*, 1-4(205), 99-105.
17. Firbas, P. (2011). *Kemizacija okolja in citogenetske spremembe* (First ed.). (J. P. Lasan, Ed.) Grosuplje, Slovenija: Ekslibris.
18. Hatayoglu, S. E. (2007). Relationship between radiation induced dicentric chromosome aberrations and micronucleus formation in human lymphocytes. *Journal of experimental and clinical cancer research*, 2(26), 229-234.
19. Homepages.gac.edu. (2015). *culturetips.html*. Povzeto November 20, 2015, iz Homapages.gac.edu:
<http://homepages.gac.edu/~dahlseid/CHE360/Lab/culturetips.html>
20. Huang, S. C. (2007). The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metabolism*, 5(4), 237–252.
21. Kumar, I. M. (2014, September). Enhanced anti-diabetic activity of polyphenol-rich de-coumarinated extracts of Cinnamomum cassia. *Journal of functional foods*, 54-64.
22. Mandal, A. (2013, Oktober 2). *NewsMedical*. Povzeto Januar 22, 2016, iz Blood Sugar Normal Values: <http://www.news-medical.net/health/Blood-Sugar-Normal-Values.aspx>
23. Medagama, A. B. (2015, Oktober). The glycaemic outcomes of Cinnamon, a review of the experimental evidence and clinical trials. *Nutrition Journal*, 108.
24. MedScape, F. a. (2016). *Regulation of Glucose Uptake*. Povzeto Januar 26, 2016, iz MedScape: <http://www.medscape.org/viewarticle/438374>
25. Mohammadi, S. e. (2014, November 26). *Scope and limitations of yeast as a model*. Povzeto Januar 8, 2016, iz https://www.cs.purdue.edu/homes/mohammas/pdfs/yeast_vs_human_tissues.pdf
26. Pinhas-Hamiel, O. Z. (2005). The global spread of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *The Journal of Pediatrics*, 146, 693–700.
27. Ranasinghe, P. e. (2012). Effects of Cinnamomum zeylanicum (Ceylon cinnamon) on blood glucose and lipids in a diabetic and healthy rat model. *Pharmacognosy Res.*, 4(2), 73-79.
28. Roberts, M. B. (1974). *A functional approach students manual*. Australia: Thomas Nelson and Sons Ltd. Australia.

29. Romano, H. A. (1982). Facilitated diffusion of 6-deoxy-D-glucose in bakers' yeast: evidence against phosphorylation-associated transport of glucose. *Journal of Bacteriology*, 1295–1297.
30. Shewan, A. M. (2013). Endosomal sorting of GLUT4 and Gap1 is conserved. *Journal of Cell Science*, 1576–1582.
31. Weusthuis, R. A. (1994, December). Chemostat Cultivation as a Tool for Studies on. *Microbiological reviews*, 58(4), 616-630.
32. Youk, H. v. (2016). <http://q-bio.org/>. Povzeto Januar 24, 2016, iz http://q-bio.org/w/images/c/c5/055_Youk.pdf

7 PRILOGE

Priloga 1: Kalibracija merilca krvnega sladkorja

Najprej smo kalibrirali merilec krvnega sladkorja tako, da smo pripravili glukozne raztopine z znanimi koncentracijami in potem preverili vrednosti izmerjene z aparatom. V litru destilirane vode smo raztopili 18 g glukoze. To je bila začetna 0.100 M raztopina, ki smo jo kasneje še bolj redčili, kot to opisuje tabela.

Tabela 6: Kalibracija merilca krvne glukoze z raztopinami znanih koncentracij

Koncentracija raztopine (mmol L ⁻¹)	0,0	3,0	6,0	9,0	12,0	15,0	18,0
Volumen of 0.1 M raztopine glukoze (mL)	0,0	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5	1,8
Volumen destilirane vode (mL)	10,0	9,7	9,4	9,1	8,8	8,5	8,2
Izmerjena koncentracija z merilcem (mmol L ⁻¹)	0,0	2,9	6,2	9,1	11,9	15,1	18,0

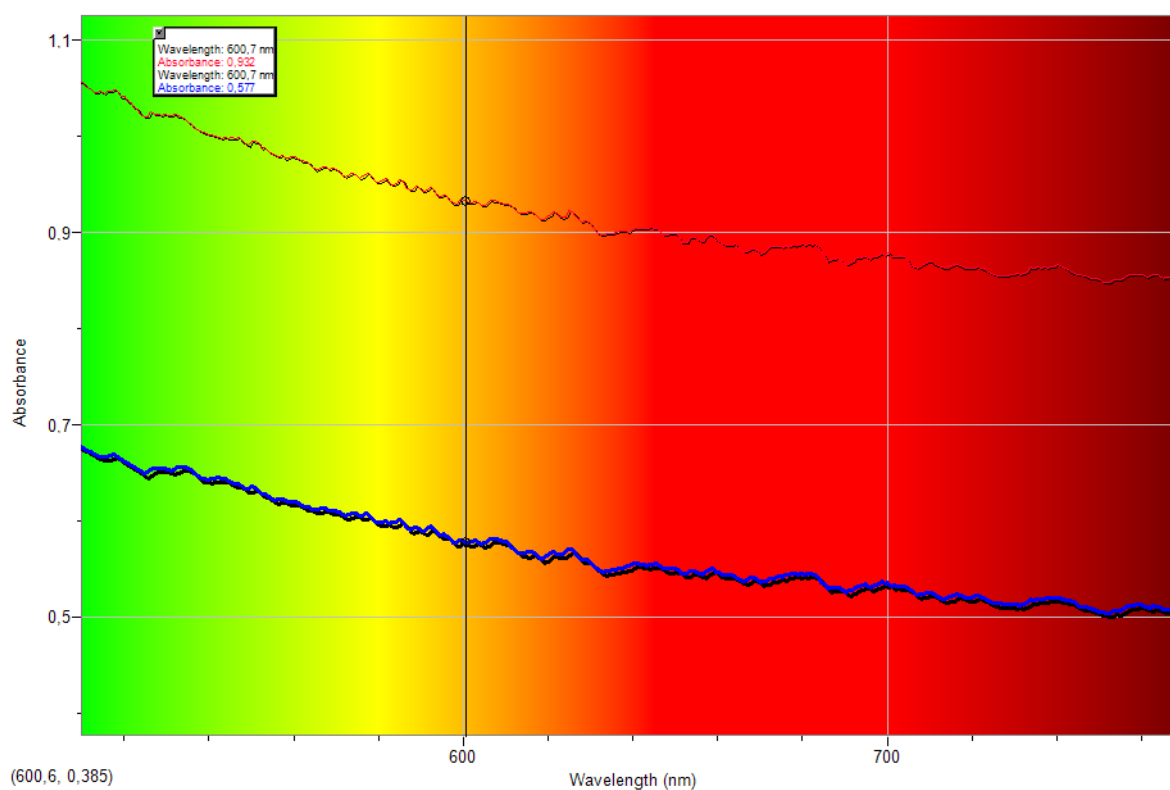
Na podlagi te umeritve smo zaključili, da je merilec zanesljiv.

Priloga 2: Določanje eksperimentalnih pogojev

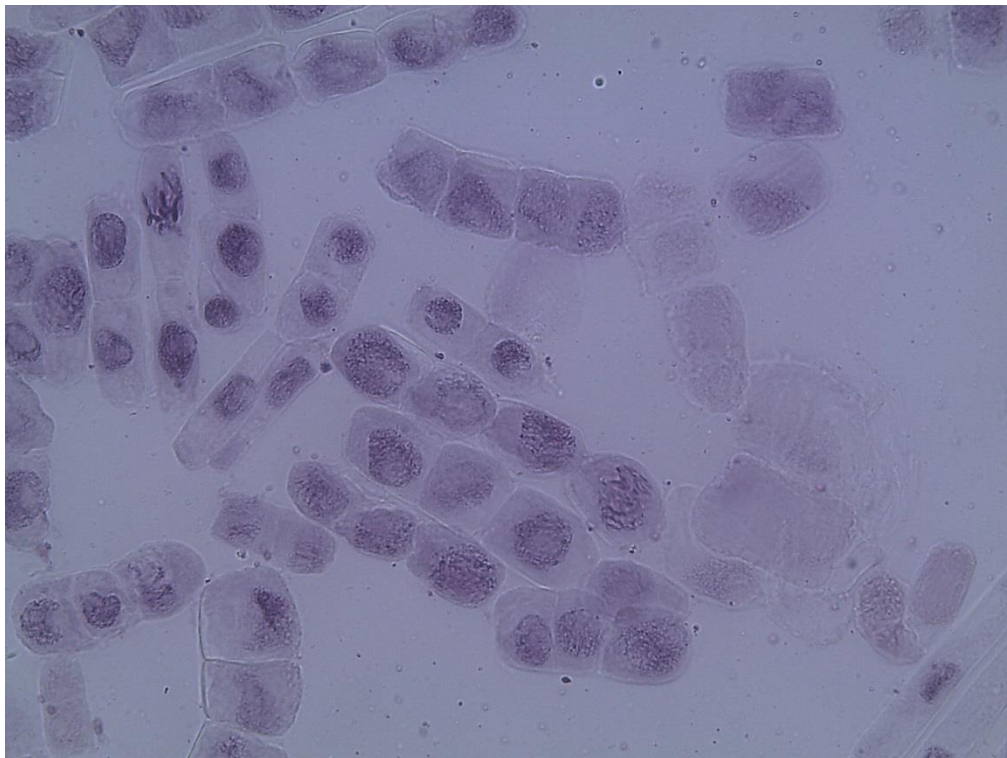
Da smo določili kateri izmed dveh faktorjev je bolj pomemben: zadostna količina zraka pri nižji temperaturi (23,0°C) ali optimalna temperatura 30°C, smo naredili prekonočno kulturo, ki smo ji izmerili začetno optično gostoto pri 600,7 nm.

OD_{600,7} je bila v primeru, ko smo kulturo inkubirali pri 30°C brez mešanja 0,577 (modra krivulja) in za kulturo, ki je bila gojena na magnetnem mešalu pri 23,0°C, 0,932 (rdeča krivulja). Na podlagi rezultatov smo zaključili, da je dober dostop zraka pomembnejši kot optimalna temperatura.

Graf 4: Logger pro graf absorbance v odvisnosti od pogojev (mešanje in nižja temperatura in optimalna temperatura) za celice pivske kvasovke



Priloga 3: Slike rasnega vršička koreninic čebule, ki so rastle pri različnih koncentracijah cimetoovega ekstrakta in v kontroli (lastni vir)



Slika 6: Celice koreninskega vršička čebule obarvane s karmin očetno. Čebulice so rastle v vodi Povečava400x.

Slike 7-11. Celice koreninskega vršička čebule obarvane s karmin očetno. Čebulice so rastle v ekstraktu cejlonskega cimeta z koncentracijo $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ Povečava $400\times$.



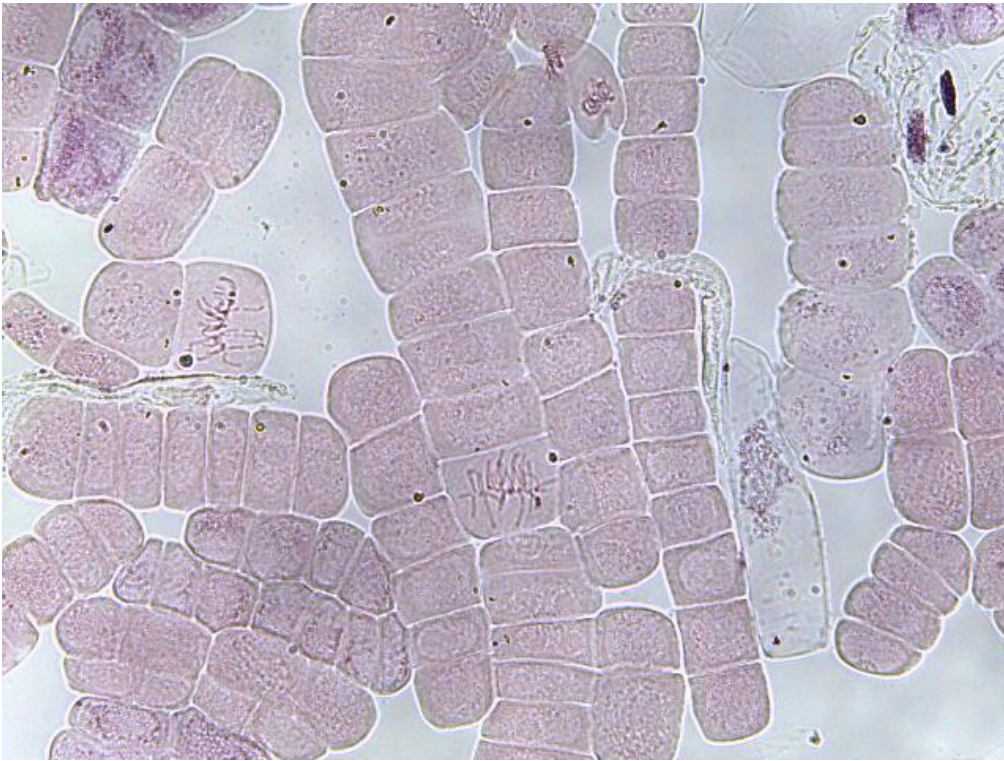
Slika 7



Slika 8



Slika 9



Slika 10



Slika 11

Sliki 12 in 13. Celice koreninskega vršička čebulice obarvane s karmin očetno. Čebulice so rastle v ekstraktu cejlonskega cimeta z koncentracijo $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Povečava $400\times$.

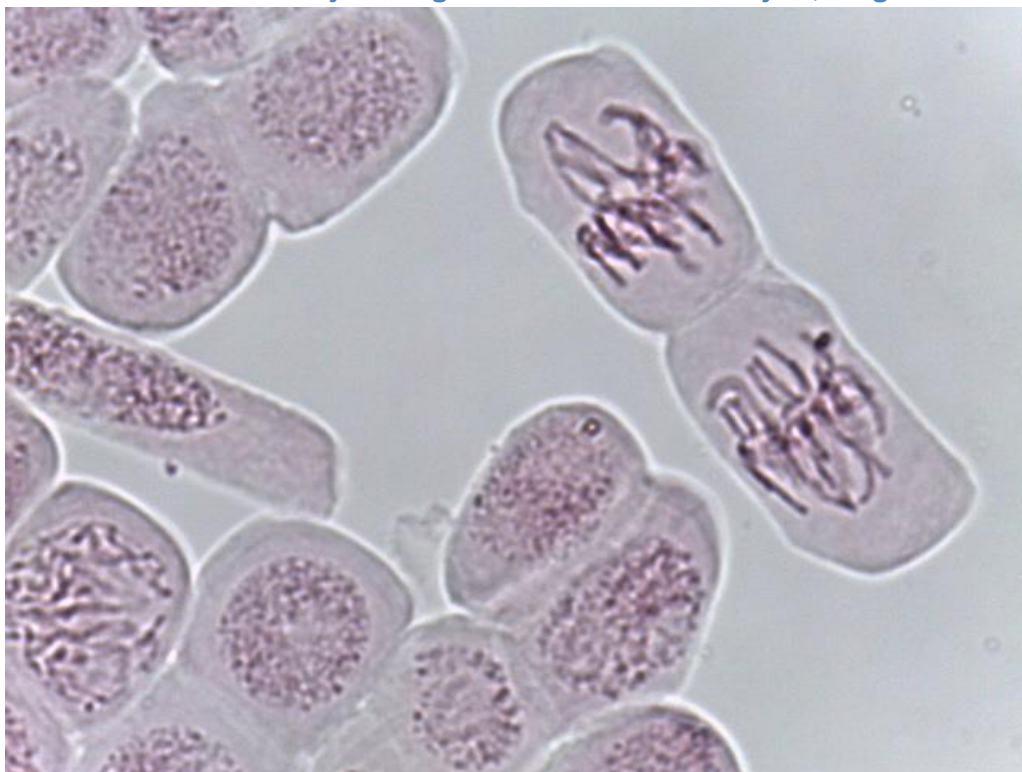


Slika 12



Slika 13

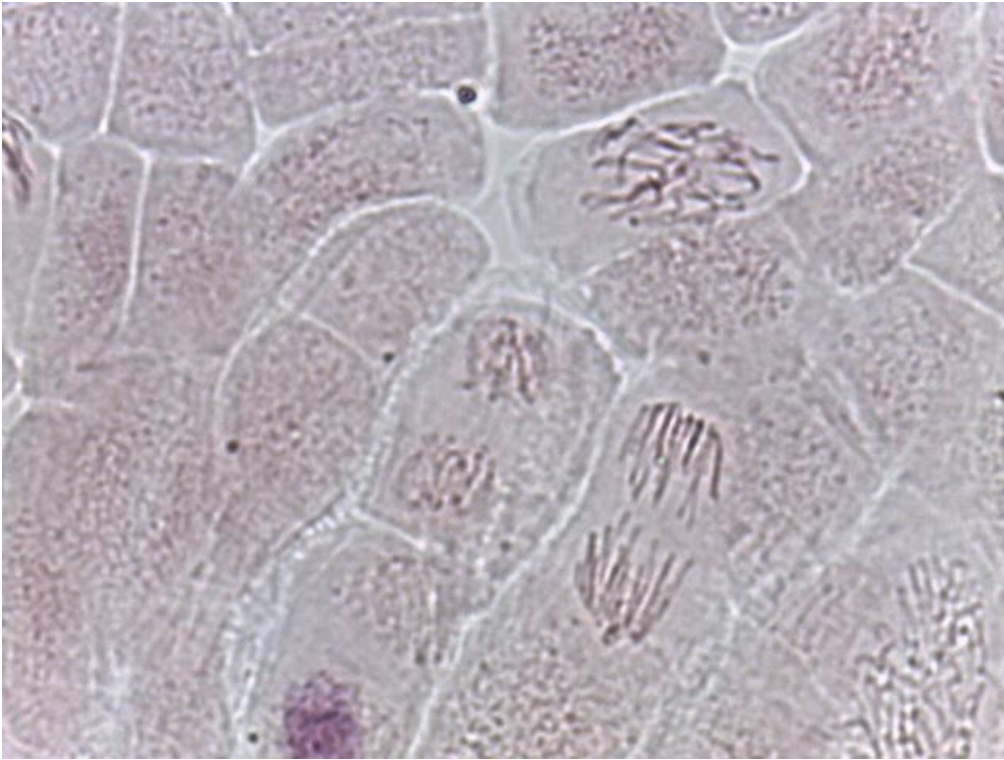
Slike 14-18. Celice koreninskega vršička čebule obarvane s karmin očetno. Čebulice so rastle v ekstraktu cejlonskega cimeta z koncentracijo $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Povečava $1000\times$.



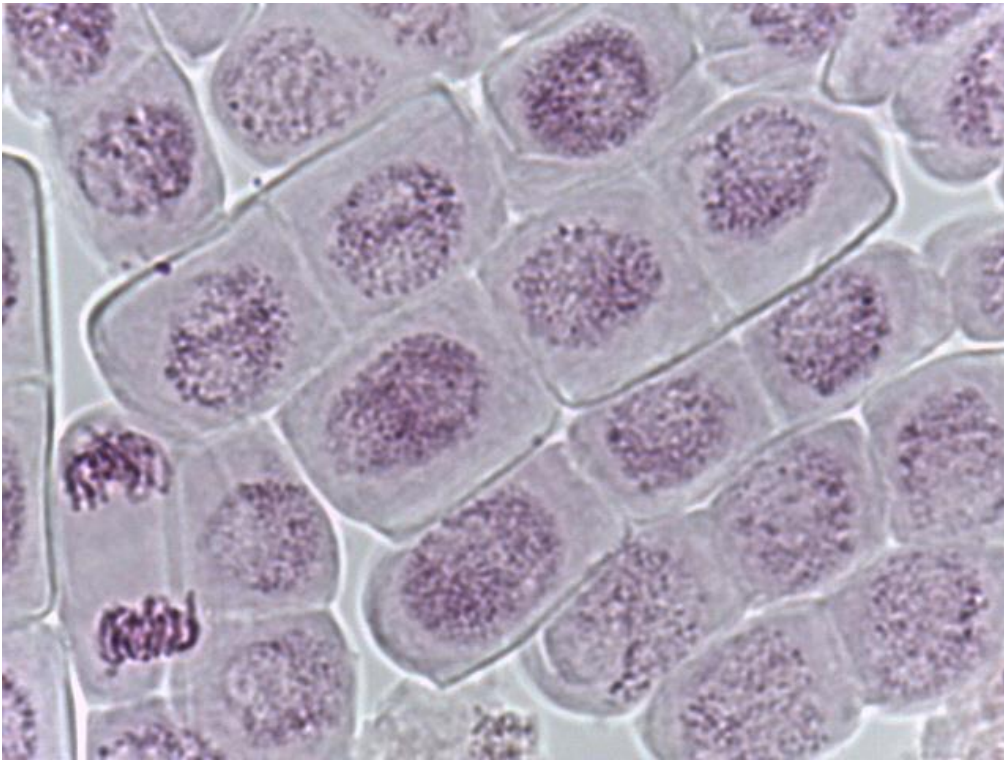
Slika 14



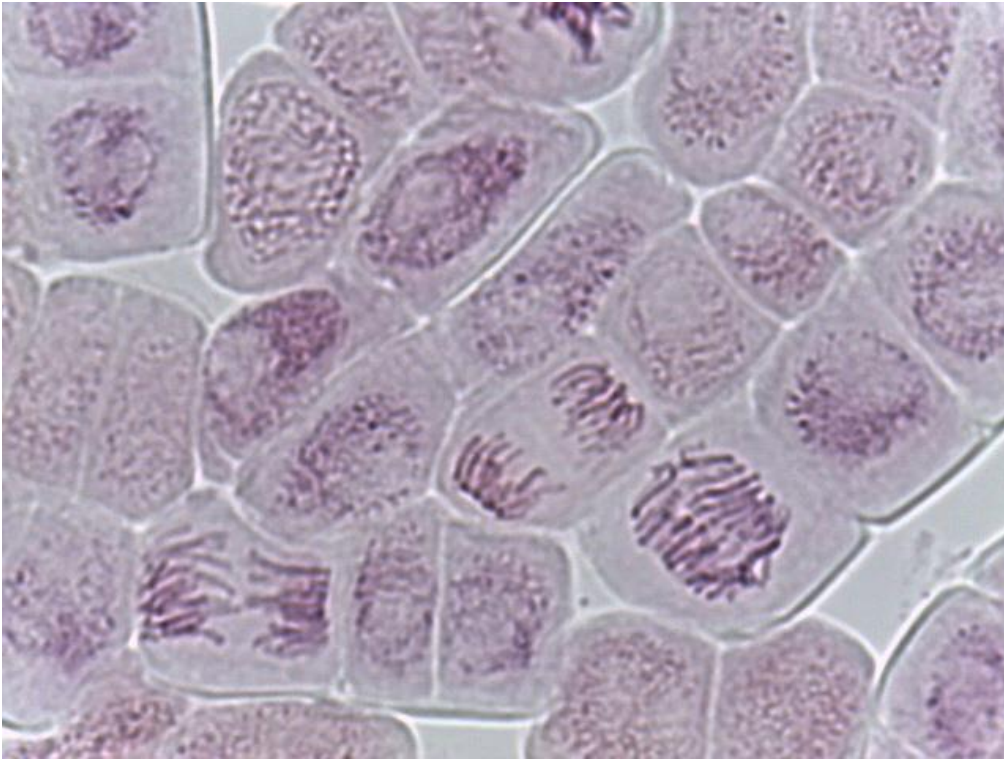
Slika 15



Slika 16

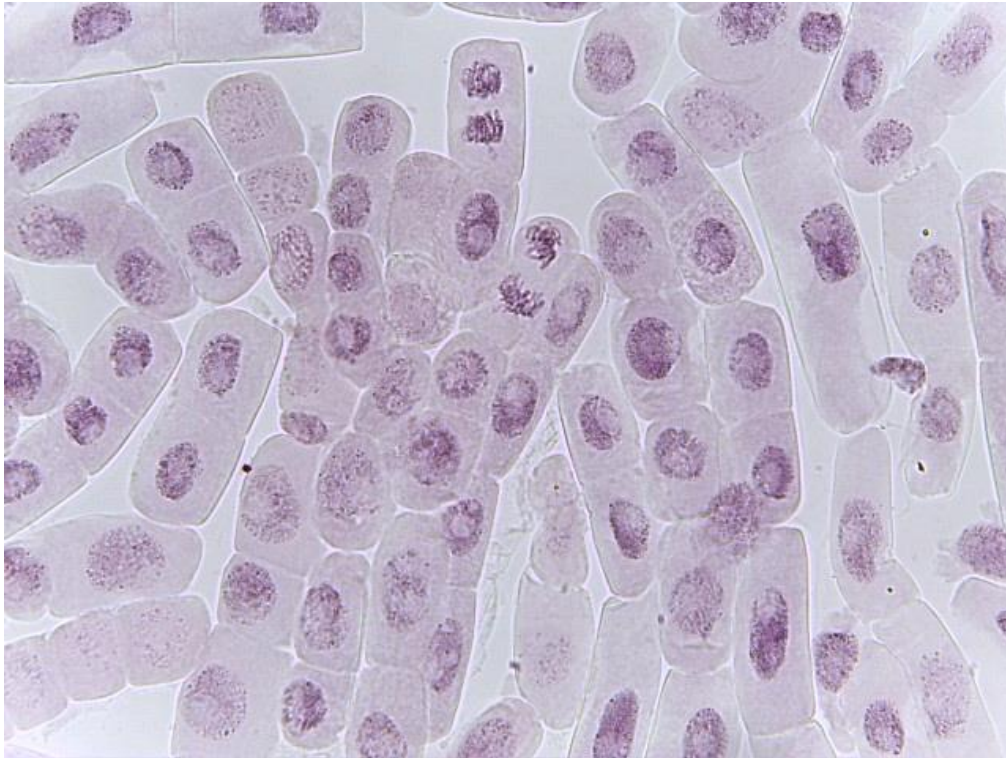


Slika 17

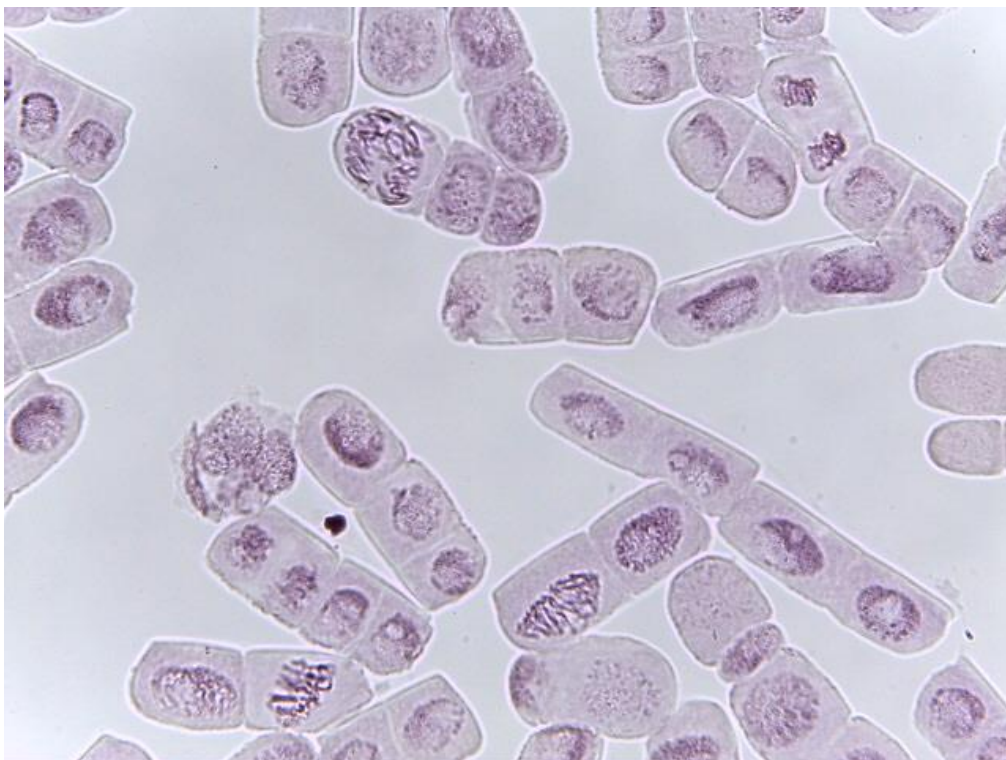


Slika 18

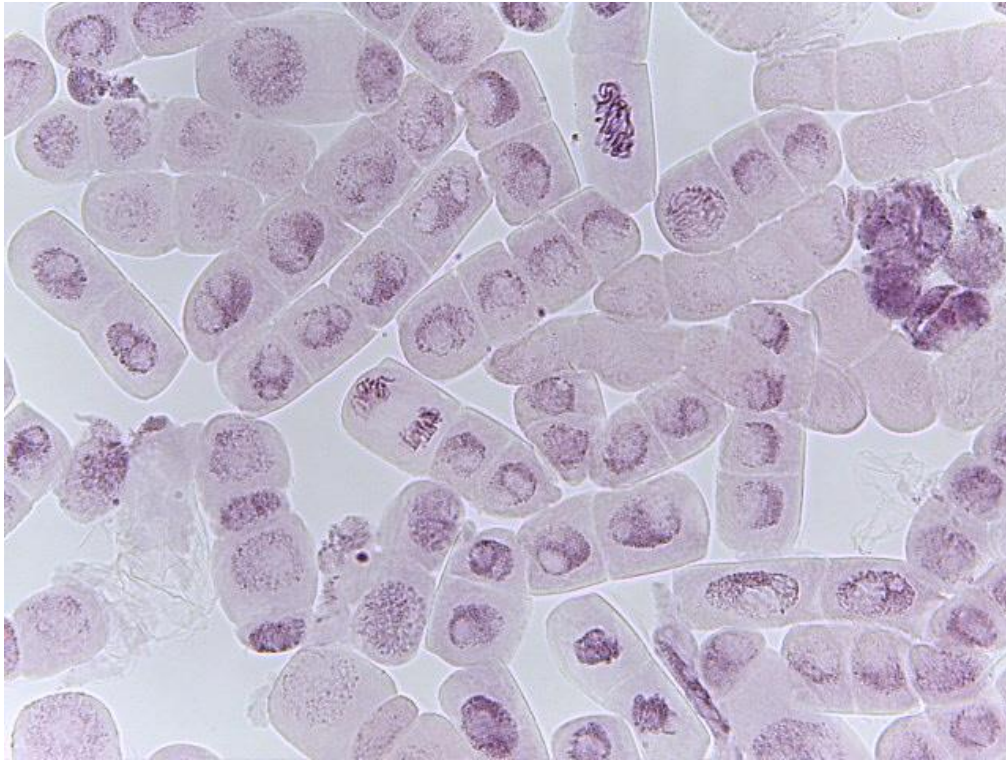
Slike 19-22. Celice koreninskega vršička čebule obarvane s karmin očetno. Čebulice so rasle v ekstraktu cejlonskega cimeta z koncentracijo $7,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Povečava $400\times$.



Slika 19



Slika 20



Slika 21

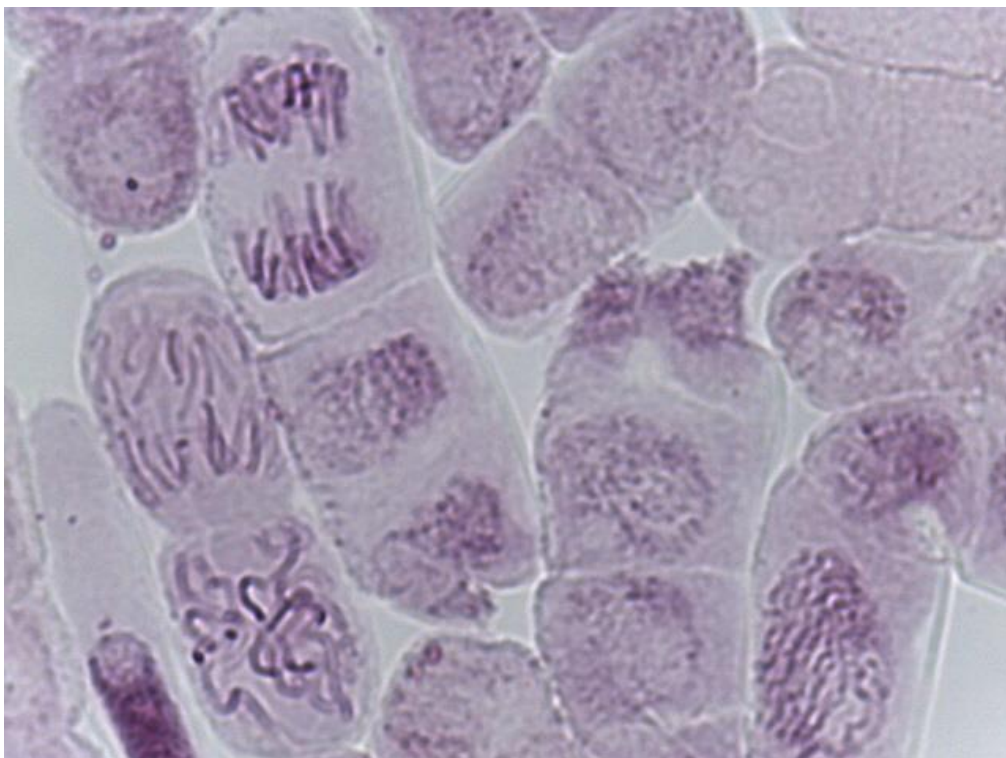


Slika 22

Sliki 23 in 24. Celice koreninskega vršička čebule obarvane s karmin očetno. Čebulice so rasle v ekstraktu cejlonskega cimeta z koncentracijo $7,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Povečava $1000\times$.

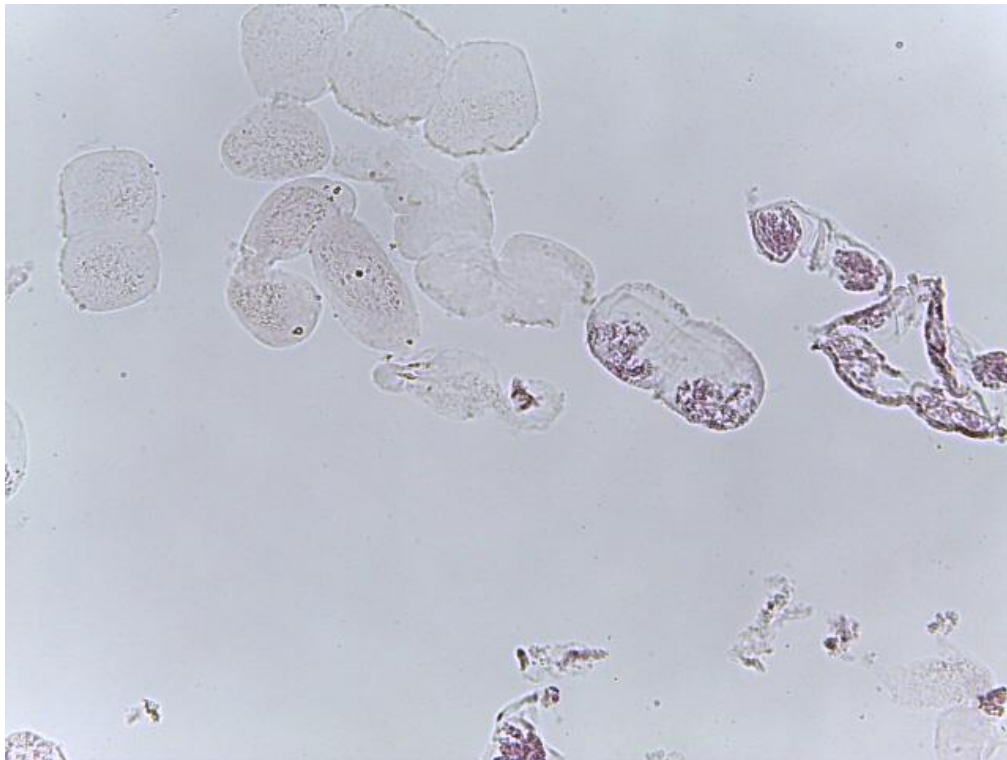


Slika 23

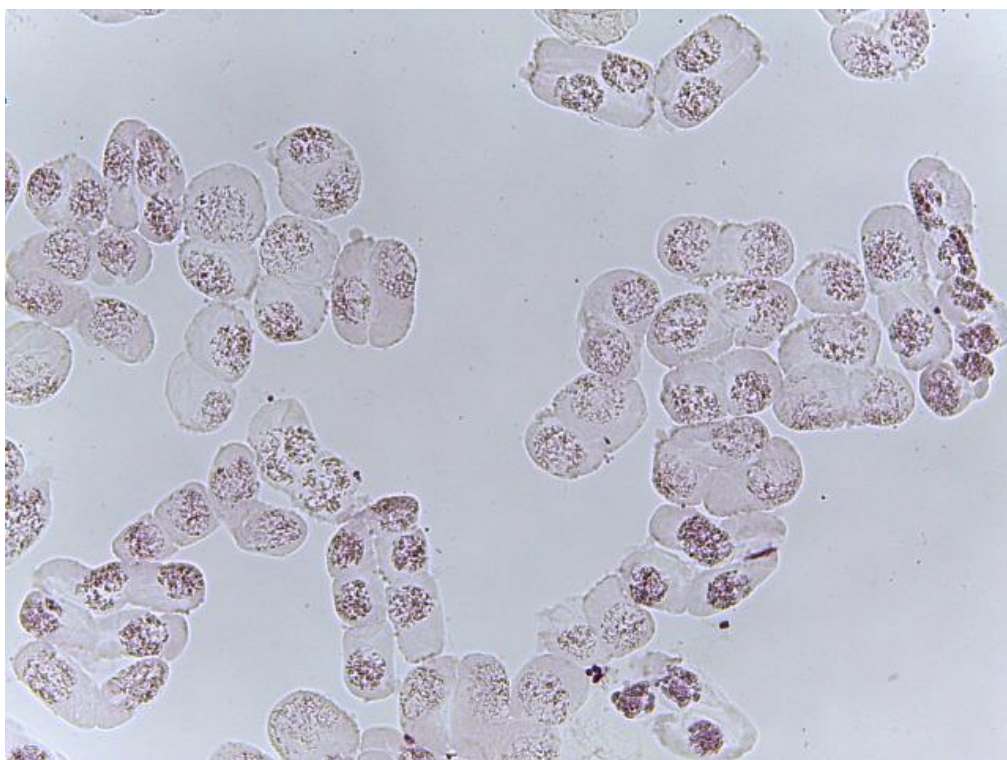


Slika 24

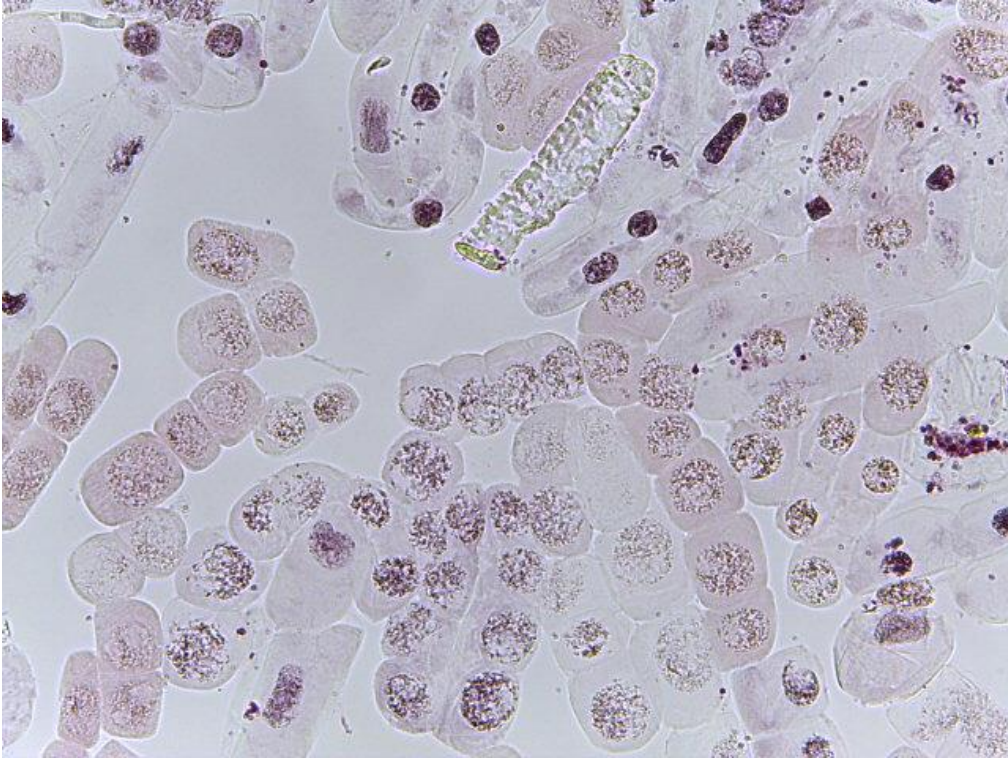
Slike 25-28. Celice koreninskega vršička čebule obarvane s karmin očetno. Čebulice so rastle v ekstraktu cimeta kasija z koncentracijo $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Povečava $400\times$.



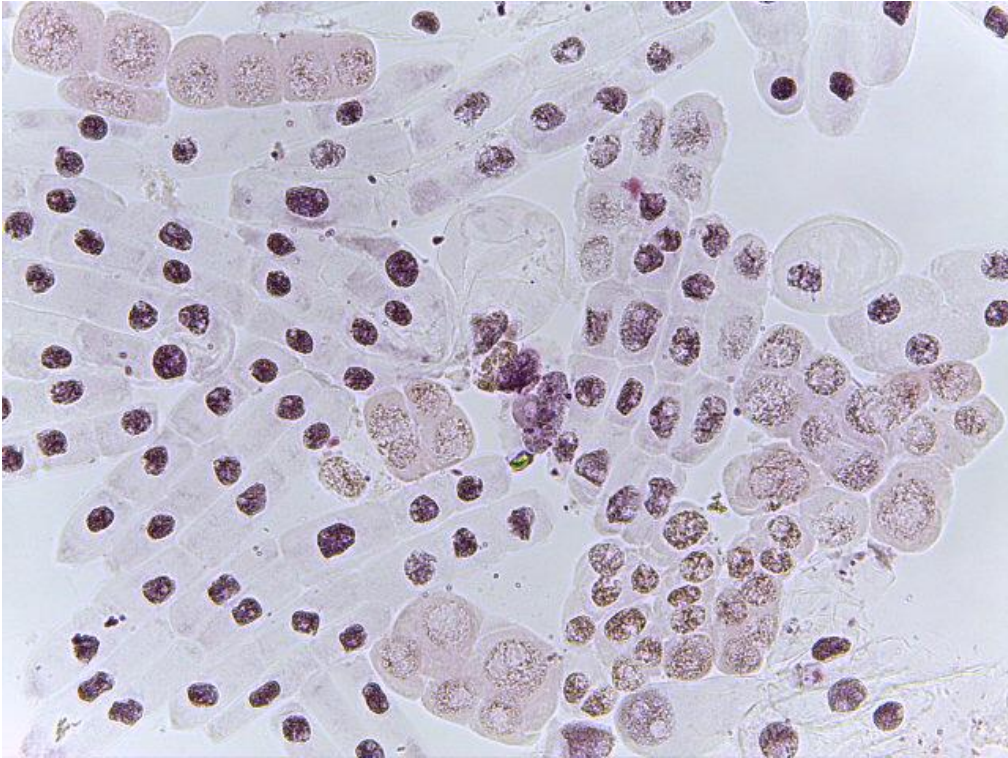
Slika 25



Slika 26



Slika 27

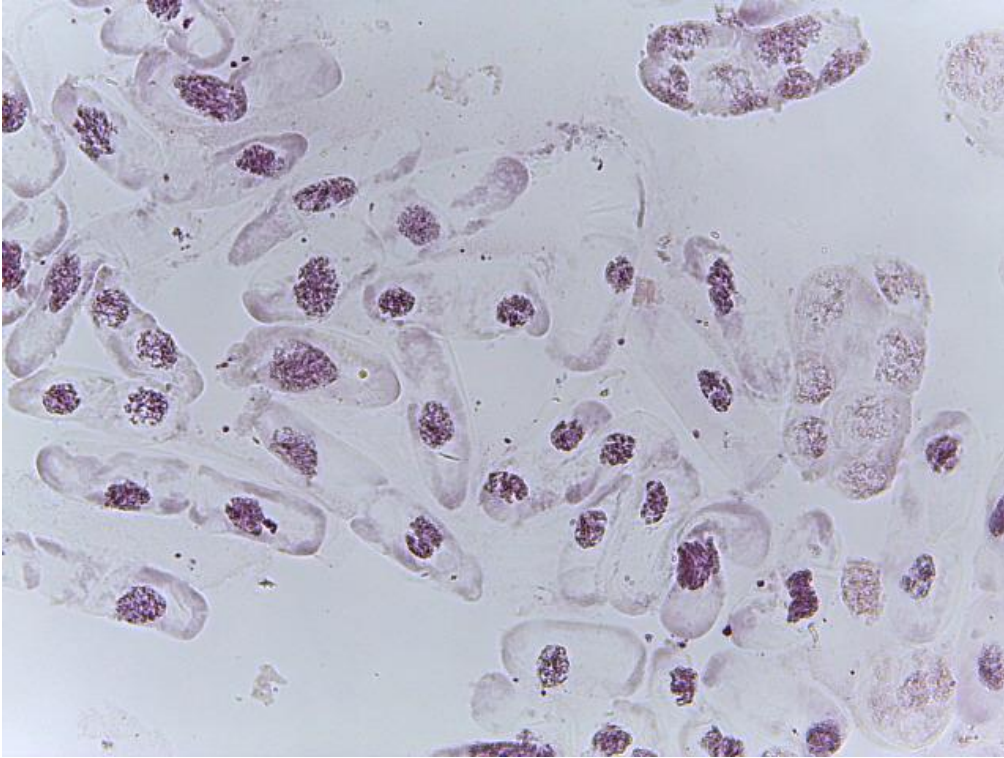


Slika 28

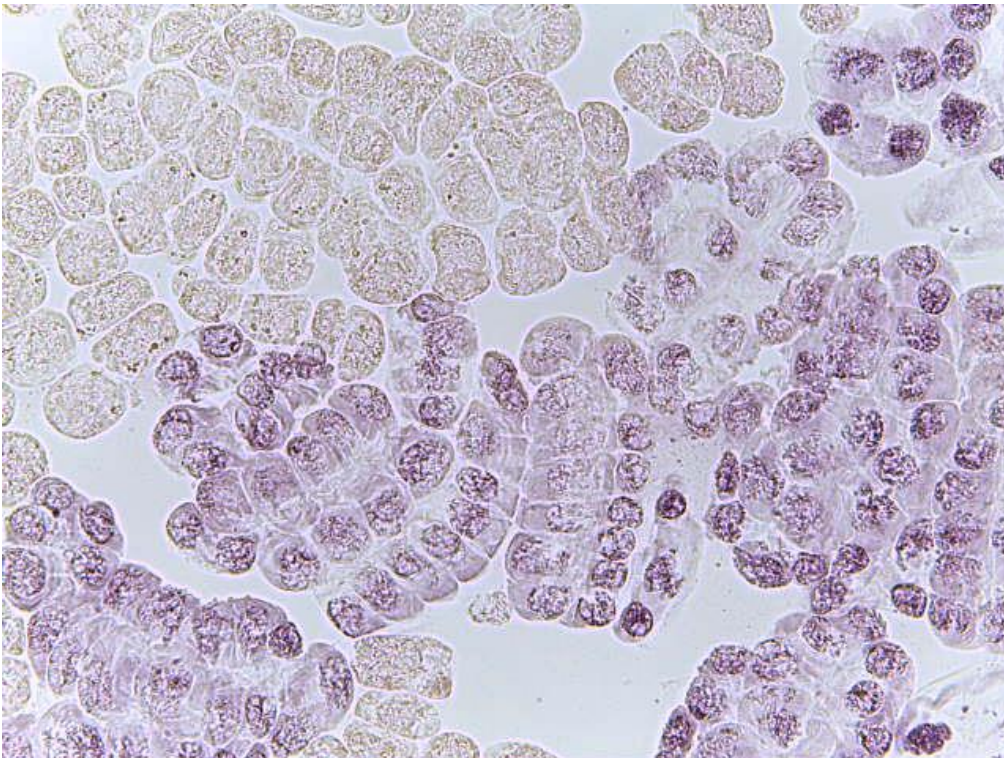


Slika 29: Celice koreninskega vršička čebule obarvane s karmin očetno. Čebulice so rastle v ekstraktu cimeta kasija z koncentracijo $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Povečava $1000\times$.

Sliki 30 in 31. Celice koreninskega vršička čebule obarvane s karmin očetno. Čebulice so rastle v ekstraktu cimeta kasija s koncentracijo $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Povečava $400\times$.



Slika 30

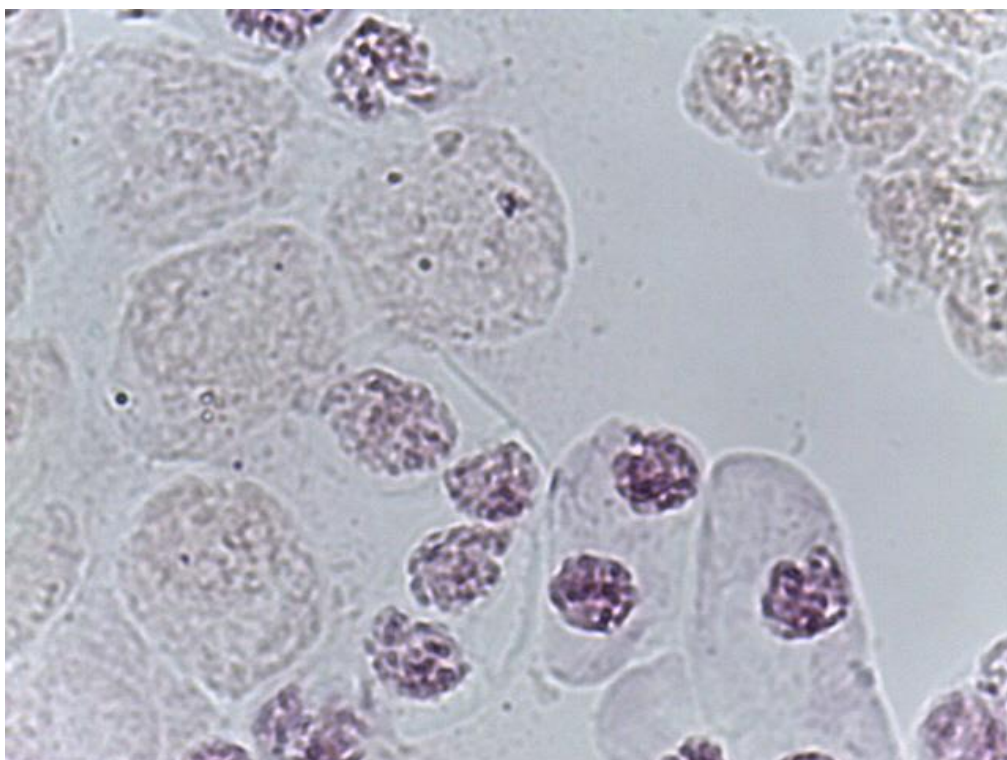


Slika 31

Sliki 32 in 33. Celice koreninskega vršička čebule obarvane s karmin očetno. Čebulice so rastle v ekstraktu cimeta kasija s koncentracijo $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$. Povečava $1000\times$.



Slika 32

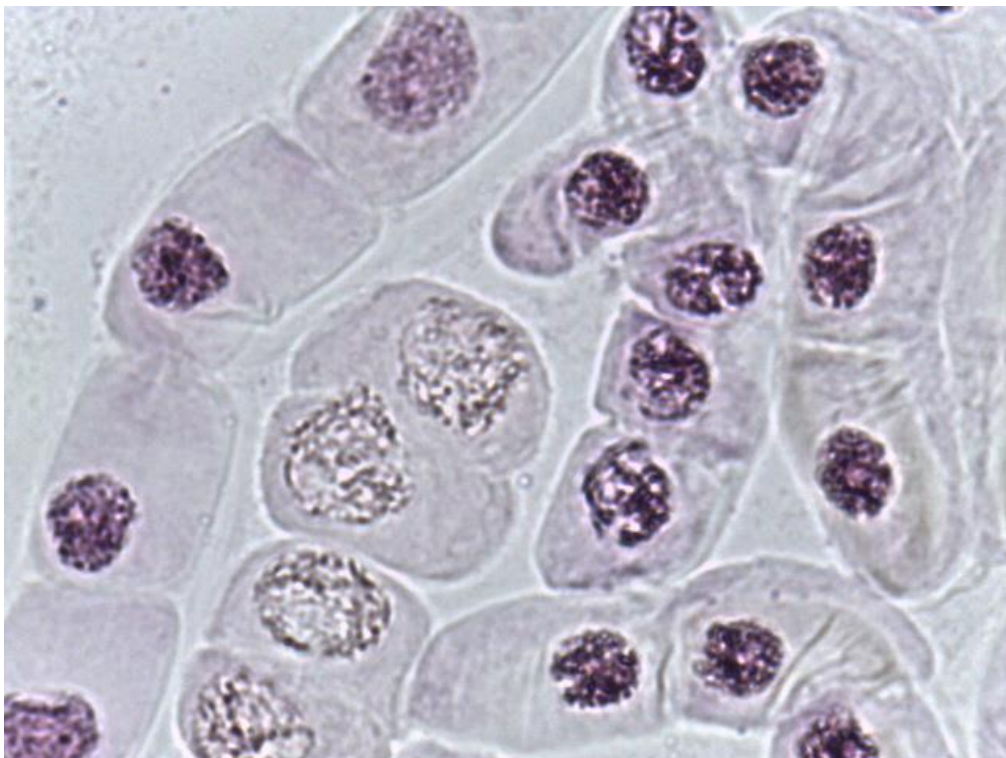


Slika 33

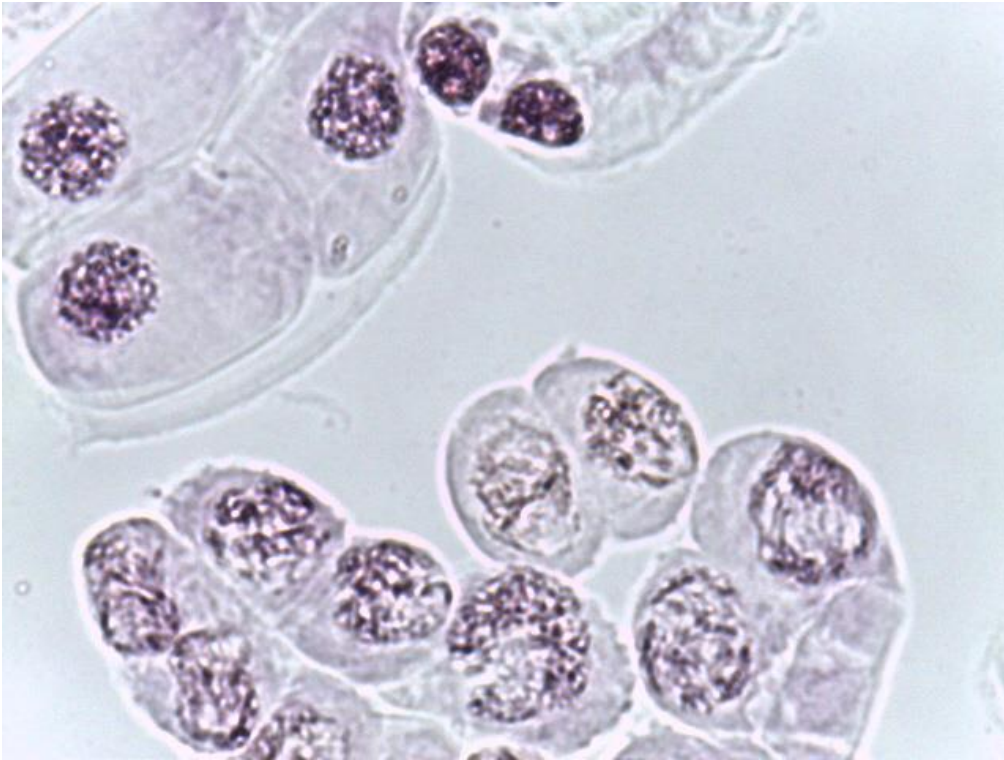
Slike 34-38. Celice koreninskega vršička čebule obarvane s karmin očetno. Čebulice so rastle v ekstraktu cimeta kasija z koncentracijo $7,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Povečava $1000\times$.



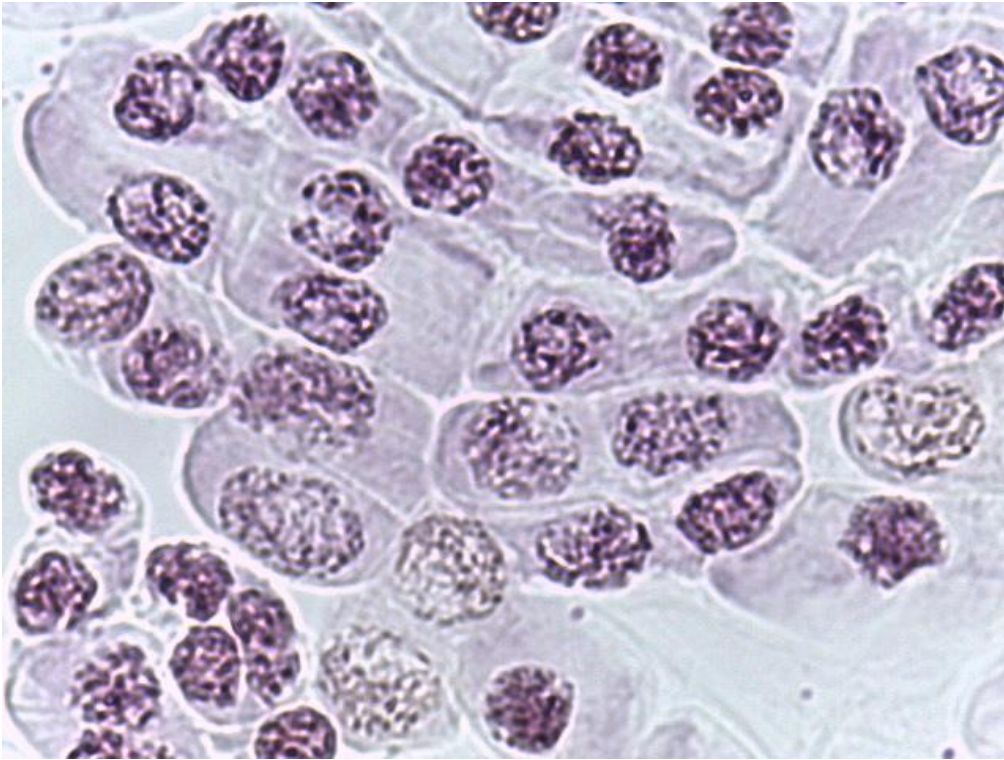
Slika 34



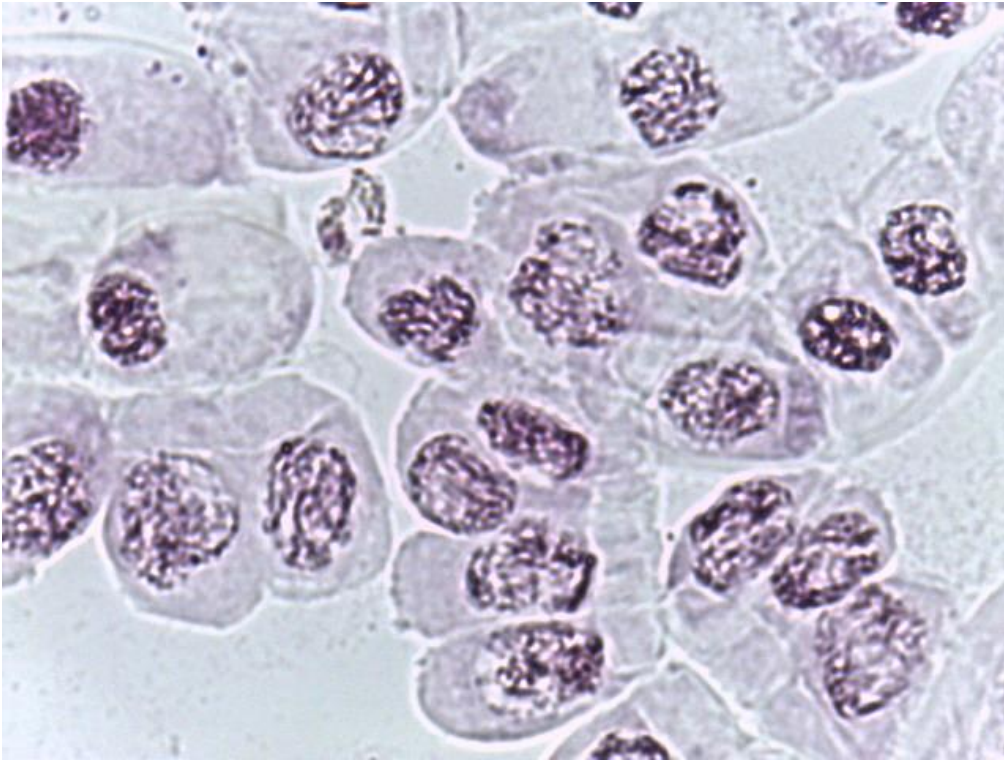
Slika 35



Slika 36



Slika 37



Slika 38