Utjecaj polifenolna iz ekstrakta cvijeta trnine na dijabetes tipa 2 u C57BL/6 miša

Frančić, Tajana

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:865276

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Nutricionizam

TAJANA FRANČIĆ
6810/N

UTJECAJ POLIFENOLA IZ EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA DIJABETES TIPA 2 U C57BL/6 MIŠA

ZAVRŠNI RAD

Projekt: Ovo istraživanje financirano je sredstvima znanstvenog projekta Hrvatske zaklade za znanost – HRZZ (2014.-2018.), "Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane (IP-PE-FF).

Mentor: prof. dr. sc. *Irena Landeka Jurčević*

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno - biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Nutricionizam

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kemiju i biokemiju hrane

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

UTJECAJ POLIFENOLA IZ EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA DIJABETES TIPA 2 U C57BL/6 MIŠA

Tajana Frančić, 0058203833

Sažetak: Brojni dokazi sugeriraju da dijeta bogata polifenolnim spojevima ima mogućnost zaštite od dijabetesa. Ekstrak cvijeta *Prunus spinosa* L. je bio promatran zbog svog utjecaja na lipidnu peroksidaciju i antioksidativni status kod miševa kod kojih je dijabetes izazvan pomoću alloxana. Promatrani biomarkeri oksidativnog stresa u organima su bili malonilaldehid (MDA) i reducirani glutation (GSH). Primjena ekstrakta cvijeta *P. spinosa* L. u dozi od 100 mg/kg tjelesne mase na C57BL/6 dijabetičnim miševima tijekom 10 dana je uzrokovala značajnu redukciju povišenih MDA vrijednosti, istovremeno povećavajući aktivnost antioksidativnog enzima (GSH) na dijabetičnim miševima. Promatrano značajno povećanje razine MDA u tkivima jetre i bubrega, kod dijabetičnih miševa, sugerira da dijabetični miševi imaju povećanu koncentraciju slobodnih radikala u usporedbi s normalnim, zdravim miševima. Smanjena aktivnost GSH u jetri i bubrezima tijekom dijabetesa je vjerojatno zbog inaktivacija ili inhibicije enzima i to zbog povećanje proizvodnje aloksan povezanih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Rezultati ukazuju da ekstrakt cvijeta *Prunus spinosa* L. može reducirati slobodne radikale povezane s oksidativnim stresom u eksperimentalno izazvanom *diabetes mellitus*.

Ključne riječi: trnina, dijabetes tipa 2, malondialdehid (MDA), glutation (GSH)
Rad sadrži: 31 stranica, 6 slika, 0 tablice, 50 literaturna navoda
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničnom (pdf format) pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: prof. dr. sc. Irena Landeka – Jurčević

Rad predan: 02. srpanj, 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies Nutrition

Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Chemistry and Biochemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

INFLUENCE OF *Prunus spinosa* L. FLOWER EXTRACT POLYPHENOLS ON TYPE-2 DIABETES MELLITUS IN C57BL/6 MOUSE

Tajana Frančić, 0058203833

Abstract: Significant evidence suggests that polyphenol-rich diets have the ability to protect against diabetes. Extract flower *Prunus spinosa* L. was investigated for its effects on lipid peroxidation and antioxidant status in alloxan-induced diabetic mice. The investigated biomarkers of oxidative stress in the organs were malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH). Administration of extract of *P. spinosa* L. flower at a dose of 100 mg/kg body weight to C57BL/6 diabetic mice for 10 days caused significant reduction in the elevated MDA level, while increasing the activity of the antioxidant enzyme (GSH) in diabetic mice. The observed significant elevation in MDA level in liver and kidney tissues of alloxan-induced diabetic mice suggests an intensified free radical generation in diabetic mice compared to the normal mice. The lower activities of GSH observed in liver and kidney during diabetes may be due to the inactivation or inhibition of the enzymes by the increased production of alloxan-generated reactive oxygen species (ROS). Results indicate that the extract flower *Prunus spinosa* L. can reduce free radical mediated oxidative stress in experimental diabetes mellitus.

Key words: trnina, type-2 diabetes mellitus, malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH)
Thesis contains: 31 pages, 6 figures, 0 tables, 50 references
Original in: Croatian
Thesis is in printed and electronic form deposited in: the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: prof. dr. sc. Irena Landeka – Jurčević

Defence date: July 02, 2018

SADRŽAJ

1. UVOD **1**

2. TEORIJSKI DIO **2**
2.1. TRNINA **2**
2.1.1. Kemijski sastav trnine 3
2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI **3**
2.2.1. Flavonoidi 4
2.2.1.1. Kemijska obilježja flavonoida 4
2.2.1.2. Antioksidacijska aktivnost flavonoida 5
2.3. *Diabetes mellitus* 6
2.3.1. Inzulin i nuspojave šećerne bolesti 6
2.3.2. Tipovi šećerne bolesti 6
2.3.3. Dijagnosticiranje bolesti 7
2.3.4. Liječenje *diabetes mellitus* tip 2 8
2.4. OKSIDACIJSKI STRES, SLOBODNI RADIKALI I ANTIOKSIDANSI **8**
2.4.1. Oksidacijski stres 8
2.4.2. Slobodni radikali 9
2.4.3. Antioksidansi 10

3. EKSPERIMENTALNI DIO **12**
3.1. KEMIKALIJE **12**
3.2. POKUSNE ŽIVOTINJE **12**
3.2.1. Induciranje (izazivanje)dijabetesa sa Aloksan-monohidratom u C57BL/6 miša 13
3.2.2. Eksperimentalne grupe životinja 13
3.3.3. Priprema tkiva (jetra i bubreg) za određivanje antioksidacijskih enzima 13
3.3. MJERENJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE (MDA) **14**
3.3.1. Priprema otopina 14
3.3.2. Postupak 14
3.4. AKTIVNOST REDUCIRANOG GLUTATIONA (GSH) **15**
3.4.1. Postupak 15
3.5. ODREĐIVANJE PROTEINA METODOM PO Lowry-ju **16**
3.5.1 Priprema otopina 16
3.5.2. Postupak 16
3.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA **17**
3.6.1. Statističke metode 17

4. REZULTATI I RASPRAVA **18**
4.1. UTJECAJ POLIFENOLA IZ EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA LIPIDNU PEROKSIDACIJU U HOMOGENATU TKIVA JETRE I BUBREGA U DIJABETIČNIH C57BL/6 MIŠEVA 19
4.2. UTJECAJ POLIFENOLA IZ EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA AKTIVNOST REDUCIRANOG GLUTATIONA (GSH) U HOMOGENATU TKIVA JETRE I BUBREGA U DIJABETIČNIH C57BL/6 MIŠEVA 22

5. ZAKLJUČAK **26**

6. LITERATURA **27**

1.0. UVOD

Brojna istraživanja ukazuju na to da polifenolni spojevi pozitivno utječu na zdravlje. Njihov potpuni potencijal i uloga u metabolizmu se još uvijek istražuje. Sva istraživanja pokazuju da bi njihova dugotrajna konzumacija mogla uvelike spriječiti rizik od kroničnih nezaraznih bolesti. U doba kada ljudi užurbano žive i to pretežito sedimentarnim načinom života, potrebno je ljude osvijestiti o važnosti i utjecaju prehrane na zdravlje.

Polifenolni spojevi nisu esencijalni u našoj prehrani, ali ti sekundarni metaboliti, zbog svoje kemijske strukture i antioksidacijskog svojstva, vrlo su bitni u svakodnevnoj prehrani. Kod biljaka su bitni za zaštitu od herbiovora i mikrobne infekcije te sprječavaju preveliki utjecaj UV zraka na biljku. Neke od namirnica najbogatije polifenolnim spojevima su grožđe, crni i zeleni čaj, soja, bobičasto voće, orašati plodovi, brokula, kava, čokolada.

Flavonoidi, podskupina polifenola, pospješuju zdravstveni status ako ih se konzumira redovito i u dovoljnim količinama. Mnoga istraživanja ukazala su na to da flavonoidi smanjuju vjerojatnost nastanka raka i kroničnih bolesti (kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne bolesti, dijabetes tipa 2) (Del Rio i sur., 2013).

Diabetes mellitus jedan je od glavnih globalnih zdravstvenih problema. Svake godine tisućama ljudi se dijagnosticira bolest. Vrlo često se bolest ne dijagnosticira i oboljeli nisu u potpunosti svjesni ozbiljnosti bolesti i koje sve komplikacije mogu nastati. Važno je educirati oboljele i njihove obitelji o ozbiljnosti bolesti i važnosti pravilnog liječenja i praćenja bolesti (Zimmet i sur., 2016).

Trnina, samonikla biljka koja rase u našem podneblju, pokazuje veliki potencijal u liječenju dijabetesa tipa 2. Zbog svog kemijskog sastava utječe na prevenciju bolesti. Obilje polifenolnih spojeva u biljci pokazuju antioksidacijska svojstva i na taj način sprječavaju oksidacijski stres i eliminiraju slobodne radikale koji oštećuju stanice. EFSA je uvrstila trninu na listu funkcionalne hrane zbog povoljnog sastava i pozitivnog učinka na zdravlje. Preporučuju konzumaciju 1-2 g dnevno cvijeta trnine.

Cilj ovog rada bio je ispitati antioksidacijski utjecaj polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine (*Prunus spinosa L.*) na dijabetes tipa 2 u C57BL/6 miša.

2.0. TEORIJSKI DIO

2.1. TRNINA

Prunus spinosa L. je divlji šumski listopadni grm iz porodice ruža (*Rosaceae*). Prirodno raste u Europi, zapadnoj Aziji, sjeverozapadnoj Africi. Trnina je samonikla biljka koja raste u svijetlim hrastovim šumama, uz rubove šuma, po livadama i brežuljcima, uz ceste. Za nju je karakteristično da grančice i ogranci završavaju crnim trnovima. Cvjetovi trnine, koji su ugodna i blaga mirisa, najčešće se javljaju pojedinačno na grančicama (Slika 1.) (Tutin i sur., 1968).

U Europi je ova biljka poznata tisućama godina, prvo kao izvor hrane, a potom i zbog terapeutskih i medicinskih svojstava (Poonam i sur., 2011; Zohary i sur., 2012).

Za terapeutske i medicinske svrha koriste se plodovi, cvjetovi, lišće i mlade grančice (Olszewska, 2001.). U našem se podneblju najviše upotrebljava cvijet i to zbog svojih brojnih povoljnih svojstava.

Istraživanja su pokazala da ekstrakt cvijeta trnine ima vazoprotektivna, protuupalna, diuretska, kardioprotektivna i spazmolitička svojstva (Blumenthal i Busse, 1998).



Slika 1. Trnina cvijet (Anonymous 1, 2018).

2.1.1 Kemijski sastav trnine

Farmakološka istraživanja pokazuju da je trnina visoko vrijedna biljka zbog sastava aktivnih tvari prvenstveno flavonoida (Makarov, 1972.). Osim flavonoida, iz cvijeta su izolirani i kamferol, kvercentin, kamferol 3-O-α-L-arabinofuranozid, kvercentin 3-O-α-L-arabinofuranozid, kamferol 3-O-α-L-arabinofuranozid-7-O-α-L-ramnopiranozid, fenolna kiselina, antocijani te A-tip proantocijanidini (Olszewska and Wolbiś, 2001, 2002a,b). Flavonoid pentozidi (arabinozidi, ramnozidi) i A-tip procijanidin dimeri sa dvostruko vezanom strukturom, poprilično su rijetki u prirodi i biljnome svijetu (Pinacho i sur., 2015).

Upravo taj jedinstveni kemijski sastav ostavlja prostora za primjenu u medicinske i terapeutske svrhe. Istraživanja su pokazala da frakcija flavonoida iz cvijeta trnine značajno smanjuje kapilarnu permeabilnost i pokazuje protuupalno djelovanje na unutarnje organe životinja, snižava povišene razine kolesterola u krvi kod zečeva i povećava amplitudu kontrakcije srca kod žaba (Marchelak i sur., 2010).

2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI

Polifenoli su česti konstituenti hrane biljnog podrijetla. Jabuke, grožđe, kruške, trešnje i bobičasto voće sadrže oko 200-300 mg polifenola na 100 g svježeg voća. Polifenolni spojevi imaju veliki značaj za zdravlje jer pokazuju antioksidacijska svojstva. Epidemiološke studije ukazuju na to da dugotrajna konzumacija namirnica bogatih polifenolnim spojevima mogu pridonijeti u prevenciji nastanka raka, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, osteoporoze i neurodegenerativnih bolesti.

Polifenolni spojevi su pokazali veliki utjecaj na liječenje dijabetisa tipa 2. Djeluju protektivno na pankreatičke β-stanice uslijed visokih i toksičnih koncentracija glukoze, protuupalno i antoksidativno, inhibiraju α-amilazu i α-glukozidazu koje su odgovorne za razgradnju škroba, te smanjuju rezistenciju na inzulin (Xiao i Högger, 2015).

Na metabolizam ugljikohidrata djeluju i tako što inhibiraju apsorpciju glukoze u probavnom sustavu preko glukoznog transportera ovisnog o natriju (SGLT1), stimuliraju izlučivanje inzulina, te aktiviraju 5´ adenozin monofosfat aktiviranu protein kinazu (AMPK).

Postoji više od 8000 identificiranih polifenolnih spojeva. Sve fenolne strukture potječu od istog prekursora fenilalaninina ili šikiminske kiseline. Primarno su u konjugiranoj formi, sa

jednim ili više šećernih nastavaka (monosaharidi, polisaharidi) vezanih na hidroksilnu grupu (Pandey i Rizvi, 2009). Dva glavna tipa polifenolnih spojeva su flavonoidi i fenolne kiseline (Scalbert i sur., 2005).

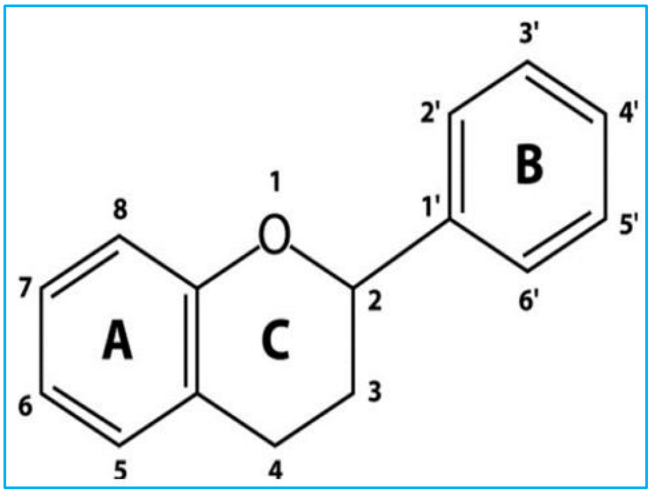
2.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi su jedan od glavnih i zastupljenijih polifenolnih spojeva koji se nalaze u biljkama. Najkoncentriraniji su u koži ili kori voća, sjemenkama, lišću i cvijeću (Rice-Evans i sur., sur., 1995.). Identificirano ih je oko 6400, a mnogi od njih daju boju cvijeću, lišću i plodovima (Nijveldt i sur., 2001).

2.2.1.1. Kemijska obilježja flavonoida

Flavonoidi su derivati benzo-γ-pirona, sastavljeni od fenolnih i piranskih prstenova. Njihova struktura obuhvaća tri aromatska prstena (A,B,C) (Slika 2.). Različiti članovi porodice flavonoida se prepoznaju po varijacijama u C prstenu i vrsti supstituenta. Prsteni mogu biti hidroksilirani, metilirani i glikozidirani s monosaharidima ili oligosaharidima (Heim i sur., 2002).

Flavonoidi su podijeljeni u nekoliko razreda: flavoni, flavonoli, flavanoli, flavanoni, izoflavoni, proantocijanidini, antocijani. Neki od najčešćih flavonoida su: kvarcentin, katehin, cijanidin, daidzein (Scalbert i sur., 2005).



Slika 2. Struktura benzo-γ-pirona (Anonymous 2, 2013).

Flavonoidi su reaktivne tvari i poznate su po tome što lako oksidiraju. Dokazana je njihova sposobnost fluorescencije, ali za sada nema dovoljno dokaza o tome sudjeluju li u procesima fotosinteze (Heim i sur., 2002).

2.2.1.2. Antioksidacijska aktivnost

Flavonoidi, a i polifenoli općenito, poznati su po antioksidacijskoj aktivnosti. Brojna istraživanja su pokazala da vitamin C, vitamin E i brojni drugi sintetski preparati imaju manju antioksidacijsku aktivnost nego flavonoidi. Struktura samog spoja je presudan faktor vezan za antioksidacijsku aktivnost flavonoida i njegovih metabolita (Heim i sur., 2002).

Najvažnija uloga flavonoida je da djeluju kao hvatači slobodnih radikala te na taj način zaustavljaju kontinuitet reakcija slobodnih radikala. U tim reakcijama slobodni radikali oksidiraju flavonoide (FI) te nastaju manje reaktivni i stabilniji flavonoidni fenoksidni radikali ((Nijveldt i sur., 2011)):

$$ROO\bullet + FI\text{-}RO \rightarrow OH + FI\text{-}O\bullet \qquad [1]$$

$$HO\bullet + FI\text{-}OH \rightarrow H_2O + FI\text{-}O\bullet \qquad [2]$$

Kod metabolizma flavonoida promatra se kakav je metabolizam u tkivima tankog crijeva, jetre, bubrega, te u kolonu. Neki flavonoidi se ne mogu apsorbirati u tankom crijevu, dok postoje neki flavonoidi koji su apsorbirani i potom izlučeni putem žuči i dopremljeni do kolona. Tamo ih razgrađuju mikroorganizmi razbijajući cikličku strukturu. Tom razgradnjom nastaje fenolna kiselina koja se potom apsorbira. Njezina koncentracija se može mjeriti u urinu i krvnoj plazmi. Još uvijek nije u potpunosti poznat utjecaj žučne sekrecije, ali kod štakora oko 40% apsorbiranog katehina je izlučeno pomoću žuči u tanko crijevo (Hollman, 2004.)

Brojna istraživanja su ukazala na povezanost flavonoida i smanjenja rizika od nastanka degenerativnih bolesti. Flavonoidi djeluju protuupalno, antialergeno, antimikrobno, kardioprotektivno, antidijabetski, antikancerogeno, antiviralno (Huxley i sur., 2003).

Posebna se pažnja pridaje na njihovo svojstvo da štite lipoproteine plazme od oksidacijskog oštećenja te na povećanju aktivnosti lipaze. Na taj način se smanjuje vjerojatnost nastanka hiperkolesterolemije, a dugoročno i ateroskleroze koja nastaje kao posljedica

hiperkolesterolemije. Istraživanja su pokazala da unosom flavonoida kroz hranu tijekom duljeg perioda, dolazi do smanjena ukupnog nivoa kolesterola i LDL-a u plazmi (Zern i sur., 2003).

2.3. DIABETES MELLITUS

Šećerna bolest (*diabetes mellitus*) je kronični metabolički sindrom koji nastaje zbog nedovoljnog ili u potpunosti izostalog lučenja i djelovanja inzulina. Zbog toga dolazi do poteškoća u metabolizmu ugljikohidrata, masti i proteina.

2.3.1. Inzulin i nuspojave šećerne bolesti

Inzulin je hormon kojeg proizvodi gušterača. On omogućuje transport glukoze iz krvotoka u stanice tkiva gdje se glukoza pretvara u energiju. Nedostatak inzulina ili nemogućnost stanice na odgovor dovodi do visokih koncentracija glukoze u krvi ili hiperglikemiju. Zbog nedjelotvornosti inzulina, šećeri se ne oksidiraju i transportiraju u stanice, već zaostaju u krvi u većoj koncentraciji nego što bi trebali. Energija potrebna tijelu nastaje iz masti što dovodi do hiperglikemije. Osim hiperglikemije dolazi do povećanog žeđanja, češćeg mokrenja, povećanog apetita, gubitka na tjelesnoj masi, a u kompliciranijim slučajevima i do poremećaja acidobazne ravnoteže, ketoze i dijabetične kome.

Hiperglikemija može, kroz dulji vremenski period, uzrokovati promjene na krvnim žilama, retinopatiju i nefropatiju. Hiperglikemija uzrokuje i nastanak kroničnih problema na ostalim organskim sustavima, a to se događa zbog smanjenog lučenja inzulina iz β-stanica gušterače, smanjenja iskorištenja glukoze i porasta proizvodnje glukoze u jetri (pojačana glikogenoliza i glukoneogeneza).

2.3.2. Tipovi šećerne bolesti

Postoje dvije grupe šećerne bolesti. Dijabetes tipa 1 (ovisan o inzulinu) koji obično nastaje prije 30. godine, ali se može javiti u bilo kojoj dobi. Osobe obolje od dijabetisa tipa 1 često imaju velike genetske predispozicije za oboljenje. Ovaj tip bolesti obilježava potpuni manjak inzulina i osobe su doživotno ovisne o inzulinskoj terapiji. Dijabetes tipa 2 (neovisan o inzulinu) najčešće nastaje u odraslih pretilih osoba.

2000. godine u Republici Hrvatskoj započelo je prikupljanje podataka u registar oboljelih, a 2004. godine prijava podataka je obavezna na nacionalnoj razini. Cilj je unaprijediti zdravstvenu zaštitu oboljelih te pratiti epidemiološke i kliničke pokazatelje na nacionalnoj razini jer prema registru je 2016. godine bilo registrirano 284 185 oboljelih. Pretpostavka je da preko 40% slučajeva uopće nije dijagnosticirano, a samim time ni adekvatno liječeno.

Tip 2 je najčešći oblik šećerne bolesti i čini čak oko 90% svih dijagnosticiranih slučajeva. Kod ovog tipa dolazi do smanjene ili nedovoljne proizvodnje inzulina ili nemogućnost tijela da reagira na inzulin (stanični receptori su neosjetljivi te nastaje rezistencija na inzulin).

Ono što je zabrinjavajuće zadnjih godina je da se sve više dijagnosticira kod djece, adolescenata i mlađih osoba i to ponajviše zbog porasta pretilosti, smanjenja tjelesne aktivnosti i povećanja sedimentarnog načina života, te neadekvatne prehrane.

Nastanak bolesti pospješuju višak adipoznog tkiva, loša prehrana, tjelesna neaktivnost, pušenje, učestala konzumacija zaslađenih pića.

Neki od simptoma dijabetesa tipa 2 su povećano žeđanje, suha usta, učestale pojave gljivičnih infekcija, učestalo i obilno mokrenje, umor i manjak energije, trnci u rukama i nogama, rane koje sporo zarastaju, zamućen vid.

2.3.3. Dijagnosticiranje bolesti

Šećerna bolest se dijagnosticira pomoću razine glukoze u krvi i to tijekom nekoliko dana. Promatra se razina šećera u krvi na tašte ili se provodi OGTT test.

U OGTT testu se natašte popije 75 g glukoze otopljene u 2,5 dL vode, a vrijednost glukoze u krvi mjeri se neposredno prije (0 min) i nakon 120 min. Šećerna bolest se dijagnosticira ako je ispunjen jedan ili više kriterija:

1. Glukoza natašte iznosi >7,0 mmol/L (126 mg/dL)
2. Razina glukoze u plazmi je ≥11,1 mmol/L (200 mg/dL) tijekom OGTT testa – 2h nakon opterećenja s 75 g glukoze
3. Nasumičan uzorak glukoze u krvi >11,1 mmol/L (200 mg/dL) ili HbA1c >6,5% (ekvivalent 48 mmol/mol)

2.3.4. Liječenje *diabetes mellitus* tip 2

Osnovni principi liječenja bolesti su pravilna prehrana, redovita tjelesna aktivnost, samokontrola bolesti, edukacija bolesnika, te ako je potrebno farmakološko liječenje.

Potrebno je dijagnosticirati i pravilno liječiti dijabetes jer dugoročno uzrokuje bolesti srca i krvnih žila, oštećenje živaca (neuropatiju), oštećenje bubrega (nefropatiju), oštećenje vida, probleme sa kožom i stalnim infekcijama, probleme sa sluhom, neurodegenerativne bolesti (Vrca Botica i Rebar-Pavlić, 2012).

2.4. OKSIDACIJSKI STRES, SLOBODNI RADIKALI I ANTIOKSIDANSI

2.4.1 Oksidacijski stress

Oksidacijski stres se najčešće definira kao stanje u kojem dolazi do poremećaja ravnoteže prooksidansa (npr. slobodnih radikala, reaktivnih kisikovih spojeva – ROS) i antioksidansa (vitamini C, E i antioksidacijski enzimi) u korist prooksidansa. U tom stanju dolazi do prekomjernog stvaranja slobodnih radikala kisika. Potom dolazi do gubitka ravnoteže u nastanku slobodnih radikala i mogućnosti stanice da ih eliminira. Slobodni radikali u takvom obliku uzrokuju oksidacijsko oštećenje koje utječe na funkcioniranje biomolekula (ugljikohidrati, lipidi, protein, nuleinske kiseline) i njihovu strukturu. Oštećenja se održavaju na razini stanica, tkiva, organa (Sies, 1991).

U stanjima oksidacijskog stresa dolazi do porasta ROS-a u organizmu ili tkivima, te dolazi do oštećenja DNA, proteina i lipida stanične membrane. Oštećenje DNA uzrokuje mutacije, oksidacijom proteini gube svoju funkciju, a lipidi podliježu lipidnoj peroksidaciji čiji su konačni produkti reaktivni aldehidi. Oštećenje DNA može za posljedicu imati mutacije na razini stanice. Ako se daljnja mutacija ne zaustavi, potencijalno mogu nastajati kancerogene stanice što dovodi do razvoja tumora. Slobodni radikali najviše utječu na mitohondrijsku DNA (Yu, 1994).

Tijekom oštećenja proteina dolazi do nastanka oksidiranih oblika proteina. Oni se u pravilu brzo eliminiraju, ali problem može nastati ako se počnu postepeno akumulirati. Akumulacija može pridonijeti nastanku kroničnih nezaraznih bolesti kao što su dijabetes, neurodegenerativne bolesti, kardiovaskularne bolesti (Kehrer, 2000).

Slobodni radikali često oštećuju lipide u našem tijelu. U tim procesima slobodni radikali puno više napadaju polinezasićene masne kiseline u usporedbi sa zasićenim masnim kiselinama i masnim kiselinama koje sadrže jednu dvostruku vezu. Proces napada slobodnih radikala na lipide zove se lipidna peroksidacija i odvija se u tri stupnja (inicijacija, propagacija, terminacija). Lipidna peroksidacija stvara mnogobrojne razgradne produkte, a neki od njih su aldehidi, ketoni, ugljikovodici (etan, eten, pentan), epoksidi, aktivni radikali. U procesu nastaje i malonildialdehid (MDA) koji, iako nastaje u malim količinama, je jedan od glavnih pokazatelja peroksidacije. MDA napada gvanin u DNA što dovodi do mutagenih oštećenja. U organizmu se metabolizira do malonatne kiseline koja je kompetitivni inhibitor mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze. Ukoliko je lipidna peroksidacija učestala, dolazi do izostanka fluidnosti u staničnim membranama, opadanja vrijednosti membranskoga potencijala, povećanja permeabilnosti prema H^+ i drugim ionima, te do mogućeg uništenja stanice i otpuštanja njena sadržaja (Štefan i sur., 2007).

2.4.2. Slobodni radikali

Slobodni radikali su kemijski spojevi koji su vrlo nestabilni i za koje je karakteristično da u vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona. Nastaju tako što dolazi do homolitičkog cijepanja kovalentne veze. Nakon cijepanja svaki elektron ostaje vezan u susjednom atomu. Upravo to je razlog zašto su slobodni radikali vrlo reaktivni (Štefan i sur., 2007).

Bez obzira na njihovu nisku koncentraciju u organizmu (10^{-5} – 10^{-9} M) pokazuju toksičan učinak. S obzirom da su vrlo reaktivni, lako stupaju u reakcije s drugim molekulama ili međusobno. Pri tome dolazi do stvaranja kovalentne veze između nesparenih elektrona i oslobađanje energije. Osim što mogu stvarati kovalentne veze, mogu ulaziti i u reakcije s drugim biomolekulama (Halliwell i Gutteridge, 1999).

Slobodni radikali mogu imati pozitivan, negativan i neutralan naboj. Reakcije vezane za slobodne radikale se odvijaju u fazama, gdje je prva faza inicijacije u kojoj nastaje slobodni radikal, a druga faza je faza propagancije u kojoj dolazi do niza lančanih reakcija i reagira s drugim, manje reaktivnim vrstama.

Kada slobodni radikali počnu sudjelovati u reakcijama, prvo doniraju elektron s reducirajućeg radikala, potom oduzimaju vodik pa nastupaju reakcije adicije. Nakon toga dolazi

do reakcija poništavanja i reakcije disproporcionalnosti. Najčešći slobodni radikali kisika su hidroksilni radikal, superoksidni anion, vodikov peroksid, singletni kisik, peroksi radikal, superoksidni anion, alkoksi radikal, perhidroksi radikal. Neki od enzima koji u tijelu stvaraju reaktivne kisikove vrste su citokrom P450, razilčite oksidaze, dehidrogenaze, peroksidaze.

Najveća koncentracija slobodnih radikala se stvara prilikom izlaganja zračenju i raznim kemikalijama, pušenju, intenzivnoj tjelesnoj aktivnosti, čestim upalama i oštećenju tkiva. Lobo i suradnici (2010) navode da su upravo slobodni radikal glavni izvor starenja stanica organizma. Rak i ateroskleroza su najvećim dijelom uzrokovane promjenom i mutacijom stanica i tkiva koje s druge srane uzrokuju slobodni radikali.

2.4.3. Antioksidansi

Antioksidans je molekula koja je dovoljno stabilna da donira elektron reaktivnom slobodnom radikalu i na taj način ga neutralizira i smanjuje oštećenja. Zbog tih reakcija se odgađaju ili inhibiraju stanična oštećenja. Preduvjet aerobnog života je upravo u održavanju homeostaze oksidacijskog/antioksidacijskog stanja.

Antioksidacijska zaštita dijeluje na principu dva mehanizma. Prvi je kada antioksidans donira elektron slobodnom radikalu i na taj način prekida lančanu reakciju. Drugi mehanizam uključuje eliminaciju reaktivnih kisikovih vrsta tako što uključuje katalizatore koji spriječavaju lančanu reakciju. Svoju efektivnost mogu pokazati kroz i neke druge mehanizme koji uključuju kelaciju metalnih iona, regulaciju putem ekspresije gena (Lobo i sur., 2010).

Naše tijelo je u stanju proizvoditi enzimske antioksidanse, a neki od njih su: glutation reduktaza, glutation peroksidaza, glutation-S-transferaza, superoksid dismutaza, katalaza. Ovi enzimi održavaju koncentraciju radikala niskom i tako spriječavaju oštećenje stanica. Njihovi mehanizmi i aktivnost su precizno regulirani na molekularnom nivou.

Glutation je tripeptid (cistein, glicin i glutaminska kiselina) koji se u vrlo velikim koncentracijama (5 mmol) nalazi u svim stanicama. U stanicama postoji u reduciranom obliku (GSH) i oksidiranom obliku (GSSG). Status stanice ovisi o omjeru GSH/GSSG. Ako je omjer veći od 100 tada je stanica izložena oksidacijskom stresu. Glutation se proizvodi u citosolu gdje se nakon toga, aktivnim trasportom, transportira u mitohondrij.

Kritične uloge glutationa baziraju se na: neutralizaciji slobodnih radikala, regeneraciji vitamina C i E, neutralizaciji slobodnih radikala nastalih iz toksičnih metabolite u jetri, transportu

žive iz stanica i mozga, regulaciji stanične proliferacije i apoptoze, te očuvanju mitohondrija i mitohondrijske DNA. Niska razina glutationa često ukazuje na izloženost toksinima ili alkoholu, izlaganju kadmiju, AIDS/HIV, nastanku neurodegenerativnih bolesti.

Trošenje GSH, uslijed oksidacijskog stresa, često dovodi do razvoja kroničnih nezaraznih bolesti. Manjak GSH dovodi do povećane vjerojatnosti nastanka neurodegenerativnih bolesti (Alzheimerova bolest, Parkinsova bolesti), pulmonarnih bolesti (kronična opstruktivna bolest pluća, astma), bolesti imunološkog sustava (HIV, autoimune bolesti), kardiovaskularnih bolesti (hipertenzija, oksidacija kolesterola), bolesti jetre, cistična fibroza (Pizzorno, 2014).

Neenzimski radikali obuhvaćaju prirodne endogene produkte stanice, hranjive egzogene tvari i sintetičke produkte. Neki od njih se unose hranom, a to su vitamin C, vitamin E, vitamin A, koenzim Q10, polifenolni spojevi, likpen, lutein, neki vitamin B kompleksa, itd.

3.0. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. KEMIKALIJE

- NaH_2PO_4 - Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Na_2HPO_4 - Kemika, Zagreb, Hrvatska
- HCl – Kemika, Zagreb, Hrvatska
- SDS – Merck, Darmstadt, Njemačka
- Tiobarbiturna kiselina (TBA) – Sigma, St. Louis, SAD
- NaOH – Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Etanol (99.9%) - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- DTNB (Ellman-ov reagens) - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- NTB (2-nitro-5-tiobenzoatne kiseline) - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- Na_2CO_3 - Kemika, Zagreb, Hrvatska
- $CuSO_4x5H_2O$ - Kemika, Zagreb, Hrvatska
- K, Na – tartarat - Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Folin-Ciocalteu reagens - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- Aloksan-monohidrat - Sigma Chemical, St. Louis, SAD

3.2. POKUSNE ŽIVOTINJE

Pokusi su provedeni na životinjama iz jedinice za uzgoj laboratorijskih životinja Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Pokusne životinje bile su C57BL/6 miševi, u dobi od tri mjeseca. Životinje su hranjene tijekom 10 dana. Po osam životinja je bilo smješteno u kavezu, na temperaturi od 22°C, uz neograničen pristup hrani i vodi.

Životinje su hranjene komercijalno dostupnom hranom koja je životinjama bila dostupna *ad libitum*. Životinje su držane u slijedećim uvjetima: 12 sati svijetla i 12 sati tame pri 60% vlažnosti.

Hrana kojom su hranjeni miševi je standardna hrana za miševe 4RF21 (Mucedola, Italija, oblik 12 mm), a sadrži pšenicu, kukuruz, soju, riblji ekstrakt, dikalcijev fosfat, kalcijev karbonat, natrijev klorid, sojino ulje, kvasac i ljuske lješnjaka.

Održavanje i njega svih pokusnih životinja provedena je u skladu sa smjernicama koje su na snazi u Republici Hrvatskoj (Zakon o dobrobiti životinja, NN #135, 2006 i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u pokusima ili druge znanstvene svrhe, NN #47, 2011), a provodi se u skladu s Uputama za njegu i korištenja laboratorijskih životinja, DHHS Publ. #(NIH) 86-123.

3.2.1. Indukcija (izazivanje) dijabetesa sa Aloksan-monohidratom u C57BL/6 miša

Aloksan-monohidrat injektiran je intraperitonealno u dozi od 150 mg kg^{-1} tjelesne težine. Indukcija dijabetesa izazvana aloksanom potvrđena je mjerenjem razine glukoze u krvi. Miševi s razinom glukoze iznad 140 mg dl^{-1} odabrani su za daljnje istraživanje.

3.2.2. Eksperimentalne grupe životinja

Eksperimentalne grupe su činile četiri grupe životinja (muški miševi težine 30 ± 2,51 g) i to:

- KO – Kontrolna grupa (0,3 mL fiziološke otopine)
- ECT – ekstrakt cvijeta trnine – *Prunus spinosa* L. (100 mg/kg/dan)
- T2DM – dijabetes melitus tip 2
- ECT + T2DM – ekstrakt cvijeta trnine + dijabetes melitus tip 2

Životinje su žrtvovane 10.-ti dan pokusa te su uzeti organi jetre i bubrega za daljnju analizu. Životinje su anestezirane eterom te su iskrvarene punkcijom iz srca bez antikoagulansa. Bubrezi i jetre su izolirani iz životinja odmah nakon skupljanja uzorka krvi, izvagani te pohranjeni na -80ºC za daljnju analizu.

Analize vezane uz organe nakon ovog koraka provedene su isključivo na ledu i u roku od tjedan dana nakon što su prikupljeni uzorci.

3.2.3. Priprema tkiva (jetra i bubreg) za određivanje antioksidacijskih enzima

Svježe tkivo homogenizira se u 50 mM fosfatnom puferu pH 7 u omjeru 1:10 (w/v). Fosfatni pufer (50 mM, pH 7): pripremi se otopina (a) 0,2 M NaH_2PO_4 x 2 H_2O i otopina (b) 0,2

M Na_2HPO_4 x 7 H_2O; 17 ml otopine (a) pomiješa se s 183 ml otopine (b), uskladi pH i doda H_2O do 800 ml.

Organi se potom homogeniziraju na ultrazvučnom homogenizatoru u 3 ciklusa od po 30 sekundi uz stanku od 10 sekundi između ciklusa. Uzorke je potrebno cijelo vrijeme držati na ledu.

Homogenate bubrega i jetre potom je potrebno centrifugirati pri 20 000 x g tijekom 15 min na 4^oC.

3.3. MJERENJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE (MDA)

3.3.1. Priprema otopina

- 1.15 g HCl-a razrijedi se u 100 ml H_2O; 0,81 g natrij dodecil sulfata (SDS) razrijedi se u 10 mL dH2O; 20 mL octene kiseline i 2,31 mL HCl pomiješa se i dopuni do 50 mL sa dH_2O. pH vrijednost se podesi na 3,5 dodavanjem 17 mL 5M NaOH i dopuni se sa dH_2O do konačnog volumena od 100 mL.
- 0,8 % TBA priprema se otapanjem 0,4 g TBA-e u 40 mL dH_2O uz zagrijavanje. Na taj volumen dodaje se 500 µl 5M NaOH i dopuni do konačnog volumena od 50 mL sa dH_2O. Otopina treba biti svježe pripremljena na dan pokusa.

3.3.2. Postupak

Prisutnost lipidne peroksidacije smo određivali modificiranom metodom koju su opisali Jayakumar i sur., 2008. Ova metoda se temelji na mjerenju koncentracije malondialdehida (MDA) koji je jedan od glavnih produkata lipidne peroksidacije. Malondialdehid reagira sa tiobarbiturnom kiselinom i stvara kromogen koji je moguće mjeriti spektrofotometrijski.

Uzorkcima jetre i bubrega mase 100 mg dodali smo 1 mL 50 mM fosfatnog pufera (pH 7.0) i homogenirali ultrazvučnim homogenizatorom Bandelin Sonoplus HD2070 (Bandelin, Njemačka) upotrebom sonde MS73 (Bandelin, Njemačka), snagom od 10%. Homogenate smo centrifugirali centrifugom Mikro 200R (Hettich, Njemačka) 15 minuta pri brzini od 10 000 rpm.

200 µL supernatanta pomiješali smo sa 200 µL 8,1%-tne vodene otopine SDS-a, 1,5 mL 20%-tne vodene otopine octene kiseline (pH 3.5) i 1,5 mL 0.81%-tne vodene otopine

tiobarbiturne kiseline. Smjesu smo zagrijavali 60 minuta pri temperaturi od 95 ºC.

Ohlađenim uzorcima izmjerili smo apsorbanciju pri 532 nm i 600 nm spektrofotometrom Libro S22 (Biochrom, Ujedinjeno Kraljevstvo).

Ukupnu apsorbanciju određivali smo prema formuli $A_{uk} = A_{532} - A_{600}$. Koncentraciju smo izračunali prema formuli:

$$C\ (MDA) = A \times V_{uzorka}\ (mL) / \varepsilon \times V_{reakcijske\ smjese}\ (mL) \times C_{proteina}\ (mg\ mL^{-1}) \qquad [3]$$

gdje ε iznosi $1{,}56 \times 10^5\ M^{-1}cm^{-1}$, a duljina kivete / iznosi 1 cm.

Koncentraciju lipidnih peroksida izrazili smo kao nmol MDA mg^{-1} proteina.

3.4. AKTIVNOST REDUCIRANOG GLUTATIONA (GSH)

3.4.1. Postupak

Aktivnost reduciranog glutationa (GSH) – postupak određivanja koncentracije GSH se temelji na reakciji GSH i DNTB-a (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina). DNTB je poznat i kao Ellmanov reagens, a koristi se pri kolorimetrijskom određivanju tiolnih skupina u biološkim uzorcima.

Ellmanov reagens uzrokuje oksidaciju GSH pri čemu dolazi do stvaranja veće količine 2-nitro-5-tiobenzoatne kiseline (NTB) i male količine glutation disulfida (GSSG). NTB je žuto obojeni produkt koji se mjeri na Plate Reader-u pri 412 nm, a na temelju čega indirektno dobivamo podatak o koncentraciji GSH (Eyer i sur. 2003). Koncentraciju smo izračunali prema formuli:

$$C = \Delta A \times V_{uzorka}\ (mL) / \varepsilon \times V_{reakcijske\ smjese}\ (mL) \times C_{proteina}\ (mg\ mL^{-1}) \qquad [4]$$

gdje ε (DTNB) iznosi $8{,}22\ mM^{-1}cm^{-1}$, a duljina kivete / iznosi 0,6 cm. Koncentraciju proteina u uzorku izmjerili smo metodom Lowryju (Lowry i sur., 1951).

Aktivnost enzima reduciranog glutationa (GSH) izražena je kao mU mg^{-1} proteina (nmol/min/mg proteina).

3.5. ODREĐIVANJE PROTEINA METODOM PO Lowry-ju

Sadržaj proteina u homogenatima bubrega i jetre određen je metodom po Lowryju (1951), a izražen je u miligramima proteina po mililitru (mg mL^{-1}).

Metoda se zasniva na reakciji peptidnih veza sa ionima bakra (Cu^{2+}) u alkalnoj sredini (biuretska reakcija) i redukciji fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline (Folin-Ciocalteau reagens) sa aromatičnim aminokiselinama proteina.

3.5.1. Priprema otopina

- Reagens A: 2% Na_2CO_3 u 0.1 M NaOH;
- Reagens B: 0.5 % $CuSO_4$ x $5H_2O$ u 1% K,Na– tartaratu;
- Reagens C: 50 ml reagensa A + 1 ml reagensa B;
- Folin-Ciocalteu reagens: komercijalni reagens razrijeđen sa destiliranom vodom u omjeru 1:2

3.5.2. Postupak

Kako bi se mogla odrediti koncentracija proteina, potrebno je konstruirati baždarni dijagram, tj. dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina. Prema niže opisanom postupku provedeno je mjerenje sa različitim koncentracijama proteina u rasponu od 5 do 100 mg ml^{-1}.

U epruvete dodati 0,1 mL otopine proteina sa 2 mL reagensa C i promiješati protresivanjem, inkubirati na sobnoj temperaturi 10 do 15 minuta, naglo dodati 0,2 mL Folin-Ciocalteu reagensa uz snažno miješanje (vortex) i inkubirati na sobnoj tempperaturi 40 do 60 minuta. Slijepa proba umjesto otopine proteina sadrži 0,1 mL destilirane vode.

Nakon što se izmjeri vrijednost A=600 nm koncentracija proteina odredi se pomoću baždarnog dijagrama.

3.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

3.6.1. Statističke metode

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti $(\bar{x})$ uzoraka u skupini:

$$\bar{x} = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N} x_i \qquad [5]$$

s pripadajućim standardnim pogreškama $S_{\bar{x}}$:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}} \qquad [6]$$

N = ukupan broj uzoraka u skupini

x_i = pojedinačne vrijednosti uzoraka

Statistička analiza podataka napravljena je koristeći Microsoft Excel 2011 (Redmond, Sjedinjenje Američke Države) i StatSoft Statistica 7.0 (Tulza, Sjedinjenje Američke Države). Dobiveni podaci izraženi su u obliku srednja vrijednost ± standardna devijacija srednje vrijednosti. Višestruka usporedba kontrolne i tretiranih skupina miševa izvršena je ANOVA analizom varijance. Interval pouzdanosti namješten je na $p \leq 0.05$. Post-hoc analize izvršene su koristeći Newman-Keuls test (Newman, 1939.; Keuls, 1952) kako bi se ustanovile razlike između pokusnih grupa.

4.0. REZULTATI I RASPRAVA

Oksidacijski stres, kao stanje poremećene ravnoteže između stvaranja ROS i sposobnosti antioksidansa da ih neutraliziraju, ima za posljedicu nastanak oksidacijski oštećenih proteina, lipida i DNA. Kao posljedica, dolazi do promjena u staničnoj strukturi i funkciji, što doprinosi razvoju kardiovaskularnih i degenerativnih bolesti, osteoporoze, dijabetesa, karcinoma i drugih patoloških stanja (Scalbert i sur., 2005).

Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) i Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO), nezarazne kronične bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti (KVB), pretilost, dijabetes, hipertenziju i neke tipove karcinoma, postaju sve značajniji uzročnik invaliditeta i preuranjene smrtnosti u svijetu, i to kako u razvijenim tako i zemljama u razvoju. Gotovo polovina od ukupne smrtnosti uslijed kroničnih bolesti pripisuje se KVB, a rastući trend dovodi se, između ostalog, u vezu sa neadekvatnom prehranom, nedovoljnom fizičkom aktivnošću i pušenjem.

Način prehrane se smatra najznačajnijom promjenljivom determinantom kroničnih bolesti, te se stoga adekvatna dijeta ističe kao važan faktor u prevenciji dijabetesa.

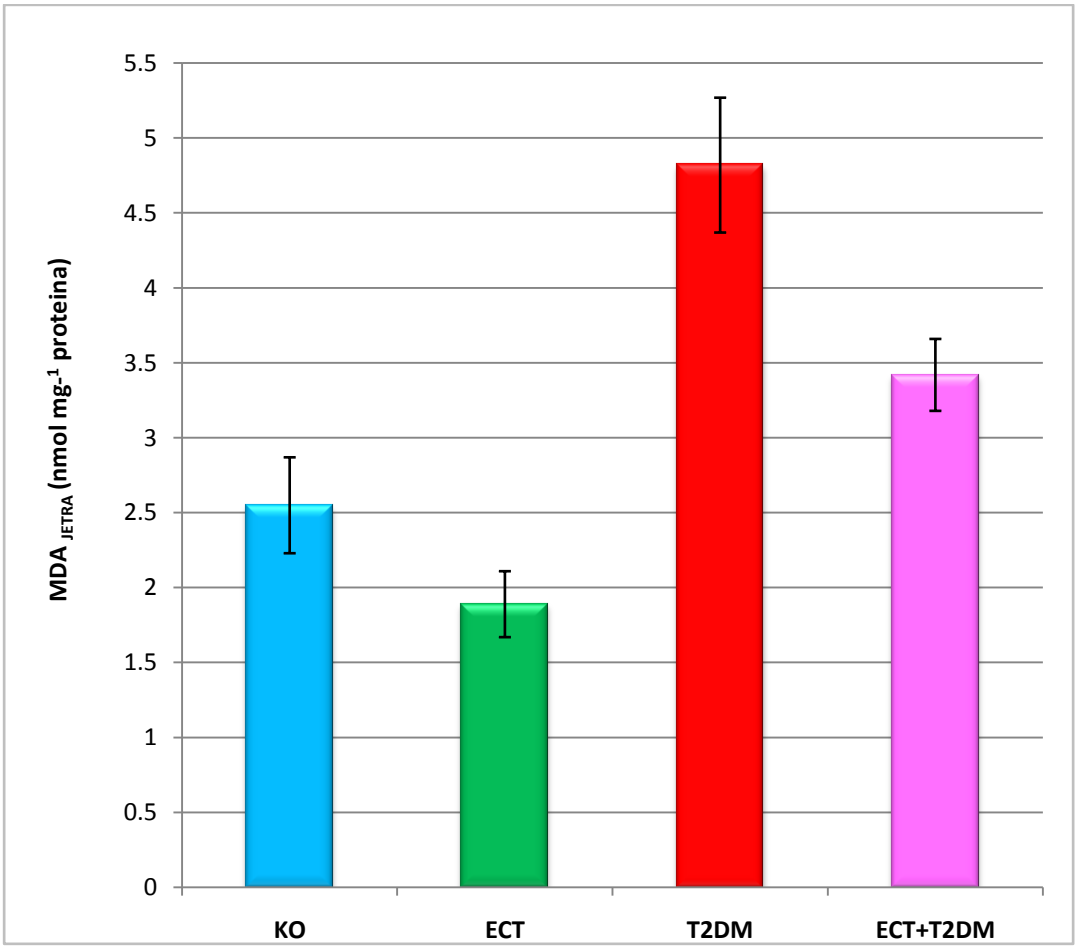
Uloga namirnica biljnog porijekla u prevenciji dijabetesa pripisuje se ne samo njihovim nutritivnim sastojcima, već i biološki aktivnim sekundarnim metabolitima biljaka, polifenolima. Polifenoli predstavljaju najznačajnije antioksidanse s obzirom da su visoko zastupljeni u namirnicama biljnog porijekla i imaju visok antioksidacijski kapacitet (Scalbert i sur., 2005).

Prema Dotanu i sur. (2004) različita patološka stanja povezana su sa različitim tipovima oksidacijskog stresa, odnosno praćena su izmijenjenim vrijednostima različitih markera prooksidacijskog/antioksidacijskog balansa. Otuda i potreba da se oksidacijski status procjenjuje različitim metodama. Dalje ovi autori navode da su samo u najozbiljnijim patološkim stanjima svi indeksi oksidacijskog stresa povišeni i u međusobnoj su korelaciji. Iako se veća efikasnost dijetetskih antioksidansa očekuje kod ljudi sa prisutnim faktorima rizika ili već razvijenim bolestima, njihova dugotrajna konzumacija može ispoljiti povoljne efekte na pojedine markere oksidacijskog stresa i u slučaju zdravih ispitanika (Zamora-Ros i sur., 2013).

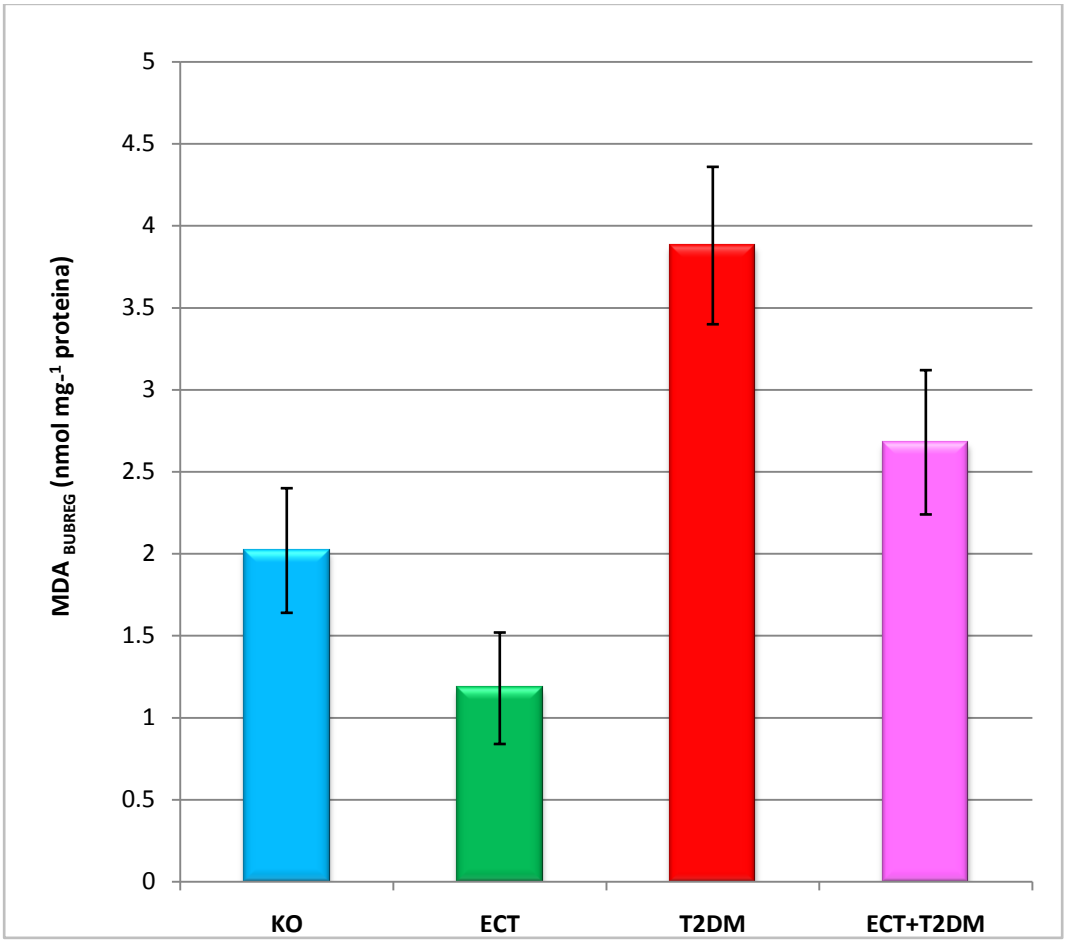
Uzimajući u obzir navedeno, u ovom radu ispitivan je utjecaj polifenola izoliranih iz cvijeta trnine na markere oksidacijskog stresa u jetri i bubregu miša. U ovom istraživanju antioksidacijsko djelovanje ekstrakta cvijeta trnine istraženo je na laboratorijskim životinjama (C57BL/6 miš) kojima je induciran dijabetes.

4.1. UTJECAJ POLIFENOLA IZ EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA LIPIDNU PEROKSIDACIJU U HOMOGENATU TKIVA JETRE I BUBREGA U DIJABETIČNIH C57BL/6 MIŠEVA

Proces lipidne peroksidacije je oblik oksidacijske promjene polinezasićenih masnih kiselina koji rezultira nastankom citotoksičnih produkata, a jedan od njih je malondialdehid (MDA). MDA je prihvaćeni biljeg lipidne peroksidacije te se koristi u evaluaciji oksidacijskog stresa (Bukan *i sur.*, 2003).



Slika 3. Koncentracija MDA (nmol mg^{-1} proteina) u homogenatima tkiva jetre kod tretiranih skupina životinja u odnosu na kontrolu. Broj životinja po skupini (n=8). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD. $p<0.05$ (ANOVA)



Slika 4. Koncentracija MDA (nmol mg^{-1} proteina) u homogenatima tkiva bubrega kod tretiranih skupina životinja u odnosu na kontrolu. Broj životinja po skupini (n=8). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD. $p<0.05$ (ANOVA).

Analizom podataka zapaženo je statistički značajno smanjenje koncentracije MDA (ANOVA, *P*>0,05) u tkivu jetre i bubrega 10. dana tretmana kod skupine tretirane ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (KO). Također je zapaženo statistički značajano smanjenje koncentracije MDA u tkivu jetre i bubrega dijabetičnih miševa tretiranih ekstraktom cvijeta trnine (ECT+T2DM) u odnosu na dijabetičnu skupinu (T2DM).

Višestruko nezasićene masne kiseline su često meta stvorenih slobodnih radikala. Ustanovljeno je da tkiva poremećena rada brže ulaze u lipidnu peroksidaciju, a razlog veće peroksidabilnosti uključuje inaktivaciju, odnosno manjak antioksidacijskih mehanizama (Štefan i sur, 2007).

Slobodni radikali, zbog induciranog dijabetesa, izazivaju oksidacijski stres u stanicama. Sve stanice su zaštićene od takvog oštećenja antioksidacijskim sustavom koji provodi detoksikaciju reaktivnih tvari. Lipidi koji su prisutni u membrani stanice sadrže veliki broj polinezasićenih masnih kiselina koje su sklone lipidnoj peroksidaciji.

Kemijska modifikacija aminokiselina u proteinima tijekom lipidne peroksidacije rezultira formiranjem lipooksidacijskih produkata koji služe kao markeri oksidacijskog stresa *in vivo*. MDA reagira s proteinima krvnih žila npr. s kolagenom i dovodi do promjena u njegovoj strukturi (Tiku i sur., 2003.).

Mnoge su studije pokazale da je njegova koncentracija znatno povišena kod dijabetesa (Slatter i sur., 2000.). U radu Faure i sur. (1993.) je opisano da je kontrola glikemije neophodna za smanjenje lipidne peroksidacije, odnosno koncentracije MDA.

Istraživanje Armstronga i sur. (1996.) pokazalo je da već i strogo nadziran način prehrane kod osoba sa dijabetesom dovodi do sniženja koncentracije MDA.

Rezultati većeg broja istraživanja podupiru pretpostavku o povezanosti LPO i nastanka karcinoma bubrega te svrstavaju karcinom bubrega u skupinu sa znatnim promjenama u ravnoteži oksidacijsko /antioksidacijskog sustava. Gago-Dominguez (2006) je predložio lipidnu peroksidaciju (LPO) kao jednu od ključnih čimbenika u razvoju karcinoma bubrega. Naime, reaktivne kisikove vrste (RKV) koje uzrokuju LPO oštećuju i DNA izazivajući genetske mutacije, aktiviraju protoonkogene i/ili inaktiviraju tumor supresorske gene te mogu dovesti do preobrazbe zdrave u zloćudnu stanicu. Opisani proces karakterističan je za sporo proliferirajuća tkiva (npr. jetra, bubreg). Zdravo tkivo bubrega u čovjeka sadrži veliki broj peroksisoma. U stanicama karcinoma bubrega peroksisomi su potpuno odsutni. Posljedica nedostatka peroksisoma je narušeni metabolizam masnih kiselina (Grabacka i Reiss, 2008.).

Sličan pad MDA u jetri pronađen je i kod zdravih štakora koji su tretirani prehranom bogatom polifenolima iz voća poput jagoda ili šljiva u usporedbi s kontrolnom grupom životinjama (Mateos i sur., 2005).

U istraživanjima kada je MDA mjeren kao biomarker lipidne peroksidacije prije i nakon konzumacije praha pokožice crnog grožđa, prah je uzrokovalo značajan pad aktivnosti MDA što ukazuje na značajno smanjenje lipidne peroksidacije (Rajesh i sur., 2013).

Sličan pad MDA u jetri je pronađen u istraživanju Meral i suradnika (2001) u kojem je kod zečeva izazvan dijabetes te su trenirani ekstraktom crnog kima (*Nigella sativa).* Zečevi su oralno tetirani ekstraktom kroz 2 mjeseca, nakon izazivanja dijabetesa. Rezultati istraživanju su bila snižena koncentracija MDA, glukoze i povećanje glutationa (GSH). Zaključak je bio da bi ekstrakt crnog kima mogao spriječiti lipidnu peroksidaciju i povećati antioksidativnu zaštitu kod dijabetičnih pacijenata zbog svog kemijskog sastavu, u kojem je naglasak stavljen na polifenolne spojeve.

U skladu s prethodnim istraživanjima, u ovom istraživanju, snižena razina MDA u homogenatu tkiva jetre i bubrega kod grupe životinja koja je uz normalnu prehranu dobivala i ekstrat cvijeta trnine pokazuje značajan pad lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolnu grupu životinja što ukazuje na antioksidacijski učinak trnine koja je bogata polifenolima. Kod dijabetične grupe životinja koja je tretirana ekstraktom cvijeta trnine također nije izazvan oksidacijski stres. Ovi se rezultati mogu objasniti činjenicom da polifenoli štite stanice od lipidne peroksidacije, ne samo u situacijama oksidacijskog stresa, nego i u normalnim uvjetima.

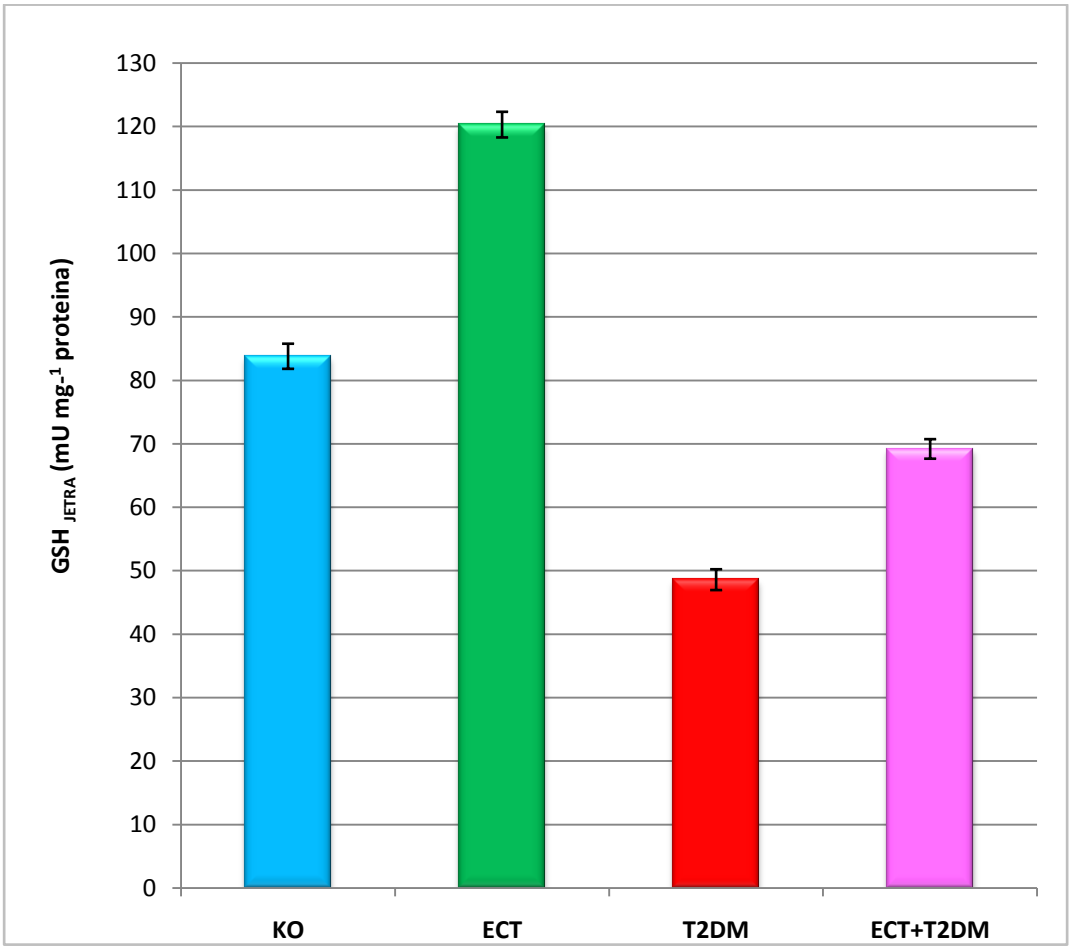
4.2. UTJECAJ POLIFENOLA IZ EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA AKTIVNOST REDUCIRANOG GLUTATIONA (GSH) U HOMOGENATU TKIVA JETRE I BUBREGA U DIJABETIČNIH C57BL/6 MIŠEVA

Želio se istražiti i potencijalni utjecaj antioksidansa *in vivo* te je zbog toga izmjerena razina glutationa (GSH) kao glavnog intracelularnog antioksidansa. Reducirani glutation je jedan od najzastupljenijih antioksidansa u stanici. Njegova zadaća je degradacija vodikovog peroksida uz pomoć glutation peroksidaze. Tom reackcijom dolazi do njegove oksidacije (GSSG), nakon čega se uz pomoć glutation reduktaze ponovo vraća u svoj oksidirani oblik.

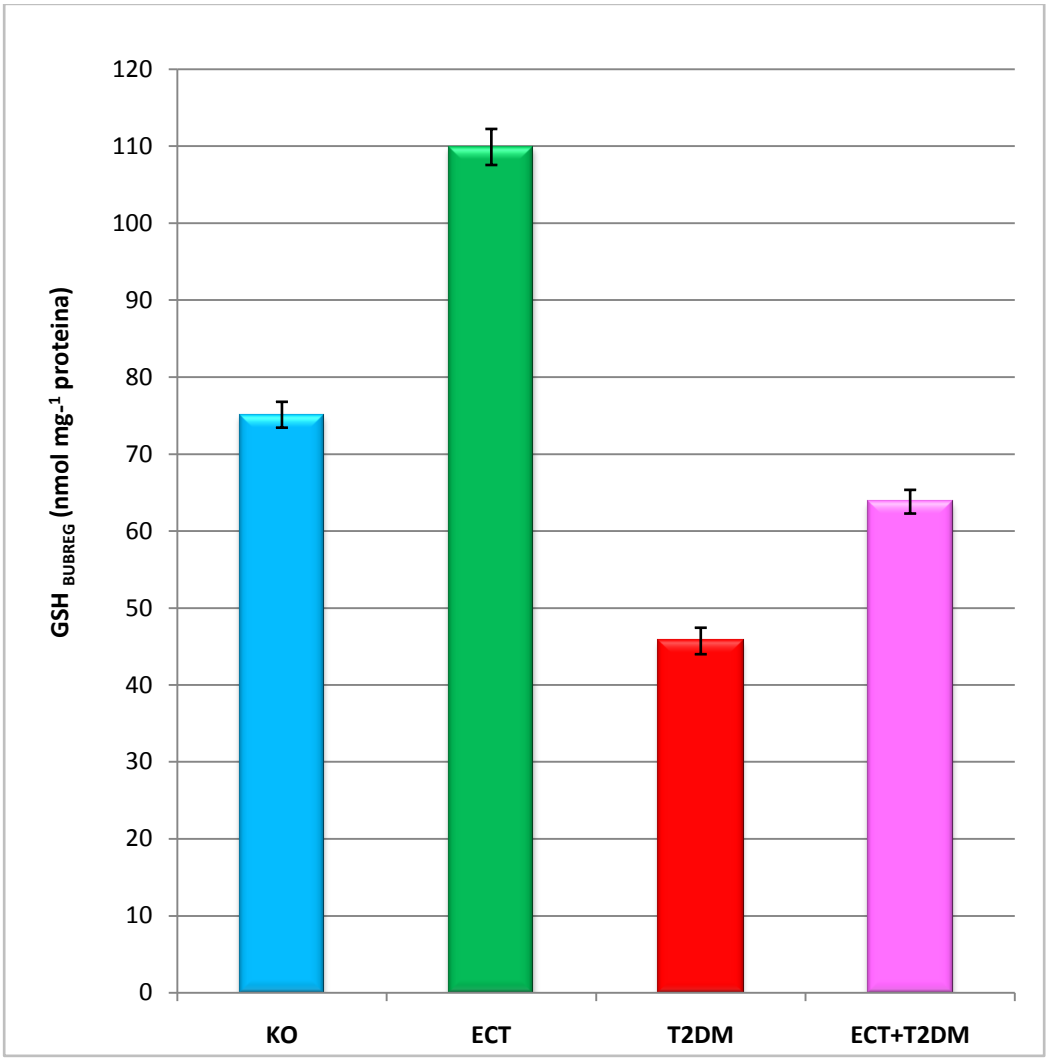
Glutation (GSH) je glavni topljivi antioksidans u stanicama te je prisutan u velikim količinama u citosolu (1-11 mM), mitohondrijima (5-11 mM) i jezgrama (3-15 mM) (Flohe, 2001).

Glutation je izuzetno važan unutarstanični neenzimski antioksidans zahvaljujući aminokiselini cistein koja sadrži tiolnu skupinu. Sadržaj glutationa ovisi o okolišnim čimbenicima i funkcionira kao ravnoteža između sinteze glutationa i njegova iskorištenja. Povećanjem brzine sinteze GSH, kao posljedica izlaganja reaktivnim spojevima kisika/spojevima koji stvaraju ROS, može se povećati sadržaj glutationa (Valko i sur., 2006).

Prehrambeni antioksidansi, posebice polifenoli, korisni su u zaštiti protiv štetnog djelovanja reaktivnih kisikovih vrsta te u sprječavanju raznih bolesti povezanih sa oksidacijskim stresom kao što su rak, starenje i neurodegenerativne bolesti (Sanchez-Rodriguez i sur., 2016). Rezultati studije koju su proveli Sanchez-Rodriguez i suradnici pokazuju statistički značajno povećanje aktivnosti superoksid dismutaze i glutation peroksidaze nakon tretmana polifenolima u štakora. Također, tretman polifenolima smanjio je razine ROS, RNS i superoksidnih aniona.



Slika 5. Koncentracija GSH (mU mg^{-1} proteina) u homogenatima tkiva jetre kod tretiranih skupina životinja u odnosu na kontrolu. Broj životinja po skupini (n=8). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD. $p<0.05$ (ANOVA).



Slika 6. Koncentracija GSH (mU mg^{-1} proteina) u homogenatima tkiva bubrega kod tretiranih skupina životinja u odnosu na kontrolu. Broj životinja po skupini (n=8). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD. $p<0.05$ (ANOVA).

Podatci dobiveni analizom jetre i bubrega pokazuju statistički značajno višu koncentraciju GSH kod ECT skupine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (P<0,05) 10. dana tretmana, kao i ECT+T2DM u odnosu na T2DM skupinu nakon 10. dana tretmana (P<0,05).

Sličan porast GSH u jetri su dobili Sikandar i suradnici (1992), u svojem istraživanju u kojem su miševe tretirani zelenim čajem tijekom 30 dana. Rezultati istraživanja su pokazali da konzumacija zelenog čaja, koji je bogat polifenolnim spojevima, povećava razinu GSH i katalaze u koži, tankom crijevu, jetri i plućima u odnosu na kontrolnu skupinu kojoj je davana samo

voda. Znanstvenici su došli do zaključka da se konzumacijom zelenog čaja smanjuje oksidativni stres, a samim time i vjerojatnost nastanka tumora.

Kadmij je vrlo otrovan okolišni i industrijski zagađivač koji negativno utječe na mnoge organe, posebice jetru. Hamden i suradnici proveli su studiju koja je osmišljena kako bi se procijenio antioksidativni učinak polifenola zelenog čaja na kadmijem induciranu jetrenu disfunkciju i oksidativni stres u štakora. Odraslim štakorima oralno je davan kadmij svaka 3 dana tijekom 6 mjeseci. Rezultati studije pokazali su statistički značajni ($p<0.05$) porast lipidne peroksidacije i pad funkcije jetre i aktivnosti jetrenih enzima u štakora tretiranih kadmijem u odnosu na kontrolnu grupu štakora. Također, aktivnost antioksidacijskih enzima kao što su superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPx) te katalaza bila je značajno ($p<0.05$) smanjena u jetri štakora tretiranih kadmijem. Oralna primjena 5% vodenog esktrakta zelenog čaja, uz oralnu primjenu kadmija tijekom šest mjeseci, izazvala je statistički značajan porast aktivnosti enzimskih biljega jetrene disfukncije (LDH, GGT, PAC, PAL, razina bilirubina) što ukazuje na smanjenje toksičnosti izazvane kadmijem. Također, ekstrakt zelenog čaja rezultirao je statistički značajan porast aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, CAT, GPx). Može se zaključiti kako je oralna konzumacija polifenola zelenog čaja, uz konzumaciju kadmija, značajno poboljšala kadmijem induciranu jetrenu disfukncju i smanjila štetne učinke oksidativnog stresa (Hamden i sur., 2008).

Razlog smanjenja koncentracije GSH u organima kod dijabetičnih životinja vjerojatno je zbog povećanog iskorištenja glutationa od strane hepatocita u pokušaju suzbijanja nastanka lipidnih peroksida (Shyamala i sur. 2003). Ne-enzimski antioksidans GSH, supstrat glutation-S-transferaze, omogućuje detoksikaciju jetre od mnogih štetnih spojeva (Hazelton i Lang 1980). Koncentracije GSH izražene preko aktivnosti reduciranog glutationa (GSH) u jetri i bubregu statistički su značajno povećane u grupi miševa koji su tretirani sa ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na kontrolnu grupu miševa, što kazuje na antioksidacijski učinak ECT. U našim istraživanjima uočena je razlika u aktivnosti GSH između grupa životinja koje su hranjene sa ili bez dijete, što se poklapa sa dosadašnjim istraživanjima u kojima je dokazano da polifenoli potiču stvaranje jetrene GSH (Yeh i Yen, 2006).

5.0. ZAKLJUČAK

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacija (WHO) 2014. godine bilo je 422 milijuna oboljelih od dijabetesa što predstavlja veliki globani problem. Na pojavu dijabetesa tipa 2 možemo uvelike utjecati pravilnom prehranom, redovitom tjelesnom aktivnošću i održavanjem adekvatne tjelesne mase. Međutim, pacijenti često nisu dovoljno educirani i loše provode samokontrolu bolesti. Edukacija je bitna stavka u liječenju bolesti, ali pitanje je koliko pacijent u stvarnosti nauči što je dijabetes, kako se nositi s bolešću i pravilno je liječiti.

U ovom radu promatrao se utjecaj i antioksidacijsko djelovanje ekstrakta cvijeta trnine na laboratorijskim životinjama (C57BL/6 miš) kojima je induciran dijabetes tipa 2 pomoću Aloksan-monohidrata. Parametari koji su promatrni bili su MDA i glutation (GSH).

Analizom rezultata opaženo je značnajno smanjnje koncentracije MDA u tkivima bubrega i jetre 10. dana tretmana (ANOVA, p>0,05)u skupini koja je tretirana ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosnu na kontrolnu skupinu (KO). Sukladno tome, zapaženo je statistički značajno smanjenje koncentracije MDA u tkivima jetre i bubrega kod skupine dijabetičnih miševa tretiranih ekstraktom cvijeta trnine (ECT+T2DM) u odnosu na netretirane dijabetične miševe (T2DM).

Analizirala se koncentracija glutationa (GSH) u jetri i bubregu životinja gdje je zapaženo statistički značajno povećana vrijednost GSH kod ECT skupine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (KO). Također je statistički značajno povećana koncentracija GSH u ECT+T2DM skupini u odnosu na T2DM skupinu nakon 10. dana tretmana (p>0,05).

Dobiveni rezultati su potvrdili pretpostavke kako polifenolni spojevi ekstrakta cvijeta trnine blagotvorno djeluju na dijabetes. Zbog svog antioksidacijskog svojstva djeluju kao jaki antioksidans i uvelike smanjuju koncentraciju oksidiranih spojeva u organizmu C57BL/6 miševa. Ekstrakt cvijeta trnine je u svim segmentima pokazao najbolje rezultate te nas takav ishod istraživanja uvodi u potpuno novi svijet prevencije dijabetesa.

6.0. LITERATURA

- Armstrong A.M., Chestnutt J.E., Gormley M., Young I. (1996) The effect of dietary treatment of lipid peroxidation and antioxidant status in newly diagnosed non-insulin dependent diabetes. *Free Radical Biology and Med*icine **21:** 719-726.
- Anonymous 1, (2018) <http://www.katinger-watt-virtual.de/pflanzen/rosa-usw.htm> Pristupljeno: 29. Svibnja 2018.
- Anonymous 2, (2018) <https://www.researchgate.net/figure/Basic-chemical-structure-of-flavonoids_fig2_259355504> Pristupljeno: 02. Lipnja 2018.
- Blumenthal M., Busse W. R. (1998) The Complete German Commission E monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines. Austin, TX: The American Botanical Council
- Bukan, N., Sancak, B., Yavuz, O., Koca, C., Tutken, F., Ozcelikay, A.T., Altan, N. (2003) Lipid peroxidation and scavening enzyme levels in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian Journal of Biochemistry* **40:** 447-450.
- Del Rio D., Mateos-Rodriguez A., Spencer P.E.J., Tognolini M., Borges G., Crozier A. (2013) Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* **18**: 1818-1892.
- Eyer P., Worek F., Kiderlen D., Sinko G., Stuglin A., Simeon-Rudolf V., Reiner E. (2003) Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Analytical Biochemistry* **312:** 224-227.
- Faure P., Corticelli M. (1993) Lipid peroxidation and trace element status in diabetic ketotic patients: Influence of insulin therapy. *Clinical Chemistry* **39:** 789-793.
- Gago-Dominguez M., Castelao J.E. (2006) Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: further supportive evidence and new mechanistic insights. *Free Radical Biology and Medicine* **40:** 721-733.
- Grabacka M., Reiss K. (2008) Anticancer Properties of PPAR alpha-Effects on Cellular Metabolism and Inflammation. *PPAR Research* **28:** 1-9.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (1999) Ascorbic acid. In: Free radicals in biology and medicine, 3rd ed. Oxford Press, Oxford, str 200-208.

- Hamden, K., Carreau, S., Marki, F.A., Masmoudi, H., El Feki, A. (2008) Positive effects of green tea on hepatic dysfunction, lipid peroxidation and antioxidant defence depletion induced by cadmium. *Biological Research* **41:** 331-339.
- Hazelton, G.A., Lang, C.A. (1980) Glutathione contents of tissues in the aging mouse. *Biochemical Journal* **188:** 25–30.
- Heim E.K., Tagliaferro R.A., Bobilya J.D. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry. Metabolism and structure – activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemestry* **13**: 572-584.
- Hollman C.H.P. (2004) Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. *Pharmaceutical Biology* **42**: 74-88.
- Huxley R.R., Neil H.A.W. (2003) The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: A meta-analysis of prospective cohort studies. *European Journal of Clinical Nutritio* **57:** 904–908.
- Jayakumar T., Sakthivel M., Thomas P.A. i Geraldine P. (2008) Pleurotus ostreatus, an oyster mushroom, decreases the oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rat kidneys, heart and brain. *Chemico-Biological Interactions* **176**: 108-120.
- Kehrer J.P. (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **149**: 43-50.
- Keuls M. (1952) The use of the "studentized range" in connection with an analysis of variance. *Euphytica* **1:** 112-122.
- Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Review* **4**: 118-126.
- Lowry D.H., Rosebrough N.J. i Farr A.L. (1951) Protein measurement with the Folin–phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. **19:** 265–275.
- Marchelak A., Owczarek A., Matczak M., Pawlak A., Kolodziejczyk-Czepas J., Nowak P., Olszewska A. M., (2017) Bioactivity Potential of ***Prunus spinosa*** L. Flower Extracts: Phytochemical Profiling, Cellular Safety, Pro-inflammatory Enzymes Inhibition and Protective Effects Against Oxidative Stress *In Vitro*. *Frontiers in Pharmacology* **8**: 1-15.
- Mateos R., Goya L., Bravo L. (2005) Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *Journal of Chromatografy B.* **827:** 76-82.

- Meral I., Yener Z., Kahraman T., Mert N. (2001) Effect of *Nigella sativa* on Glucose Concentration, Lipid Peroxidation, Anti-Oxidant Defense System and Liver Damage in Experimentally – Induces Diabetic Rabbits. *Journal of veterinary medicine*. *A, Physiology, pathology, clinical medicine*. **48**: 593-599.
- Newman D. (1939) The distribution of range in samples from a normal population, expressed in terms of an independent estimate of standard deviation. *Biometrika* **31:** 20-30.
- Nijveldt J. R., Nood van E., Hoorn van EC. D., Boelens G.P., Klaske van N., Leeuwen van AM. P. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* **74:** 218-225**.**
- Pandey B.K., Rizvi I. S. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2:** 270-278**.**
- Pinacho R., Cavero R. Y., Astiasarán I., Ansorena D., Calvo M. I. (2015) Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of *in vitro* digestion on their antioxidant capacity*. Journal of Functional Foods* **19:** 49–62.
- Pizzorno J. (2014) Glutathione! *Integrative Medicine* **13:** 8-12.
- Poonam V., Raunak Kumar G., Reddy L. C. S., Jain R., Sharma S. K., Parmar V. S. (2011) Chemical constituents of the genus *Prunus* and their medicinal properties. *Current Medicinal Chemistry* **18**: 3758–3824.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* **20:** 933-956**.**
- Sanchez-Rodriguez, C., Martin-Sanz, E., Cuadrado, E., Granizo, J.J., Sanz-Fernandez, R. (2016) Protective effect of polyphenols on presbycusis via oxidative/nitrosative stress suppression in rats. *Experimental Gerontology* **83**: 31-36.
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C., Jimenez L. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **45:** 287-306.
- Sies H., (1991) Oxidative stress: introducton. U: Sies H (ur.), Oxidative stress, Oxidants and Antioxidants. Academic Press, San Diego, CA, 15-22.
- Sikandar G.K., Santosh K.K., Rajesh A., Mukhtar H. (1992) Enhancement of Antioxidant and Phase II Enzymes by Oral Feeding of Green Tea Polyphenols in Drinking Water to

SKH-1 Hairless Mice: Possible Role in Cancer Chemoprevention. *Cancer Research* **52:** 4050-4052.

- Shyamala, M.P., Venukumar, M.R., Latha, M.S. (2003) Antioxidant potential of the syzygium aromaticum (GAERTIN) Linn. (Cloves) in rats fed with high-fat diet. *Indian Journal of Pharmacology* **35**: 99–103.
- Slatter D.A., Bolton C.H., Bailey A.J. (2000) The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia* **43**: 550-557.
- Štefan L., Tepšić T., Zavidić T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R. (2007) Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina* **43:** 84-93.
- Tiku M.L., Allison G.T., Naik K., Karry S.K. (2013) Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage* **11**: 159-166.
- Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore D. H., Walters S. M., Webb D. A. (1968) Flora Europea. Vol. 2 Cambridge: Cambridge University Press
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur,M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* **160:** 1-40.
- Varga E., Domokos E., Fogarasi E., Steanesu R., Fülöp I., Croitoru M.D., Laczkó-Zöld E. (2017) Polyphenolic compounds analysis and antioxidant activity in fruits of *Prunus spinosa* L. *Acta Pharmaceutica Hungarica* **87:** 19-25.
- Vrca Botica M., Rebar-Pavlić I. (2012) Šećerna bolest u odraslih, 7.izd. Školska knjiga. Str. 2-17.
- Xiao J.B., Högger P. (2015) Dietary polyphenols and type 2 diabetes: current insights and future perspectives. *Current Medicinal Chemistry* **22**: 23-38.
- Yeh, C.T., Yen, G.C. (2006) Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistanceassociated protein 3 mRNA expression. *Journal of Nutrition* **139**: 11–15.
- Yu B.P. (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews* **74**: 139-162.
- Zamora-Ros, R., Serafini, M., Estruch, R., Lamuela-Raventós, R.M., Martínez-González, M.A., Salas-Salvadó, J., Fiol, M., Lapetra, J., Arós, F., Covas, M.I., Andres-Lacueva, C. (2013) PREDIMED Study Investigators. Mediterranean diet and non enzymatic

antioxidantcapacity in the PREDIMED study: evidence for a mechanism of antioxidant tuning. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **23**: 1167-1174.

- Zern T.L., West K.L., Fernandez M.L. (2003) Grape polyphenols decrease plasma triglycerides and cholesterol accumulation in the aorta of ovariectomized guinea pigs. *Journal of Nutrition* **133**: 2268–2272.
- Zimmet P., Alberti K.G., Magliano D.J., Bennett P.H. (2016) Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies. *Nature Reviews Endocrinology* **12**: 616-622.
- Zohary D., Hopf M., Weiss E. (2012) Domestication of Plants in the Old World, 4. izd. Oxford University Press. Str. 1-9.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Tajana Franić

Student/ica