

Utjecaj bioaktivnih molekula iz ekstrakta cvijeta Prunus spinosa L. na hiperglikemiju u miša

Frančić, Tajana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:159:870065>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2020.

Tajana Frančić, 1208/N

**UTJECAJ BIOAKTIVNIH
MOLEKULA IZ EKSTRAKTA
CVIJETA *Prunus spinosa* L. NA
HIPERGLIKEMIJU U MIŠA**

Ovo istraživanje financirano je sredstvima znanstvenih projekta: Hrvatska zaklada za znanost – HRZZ (2014.-2018), "Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane" (IP-PE-FF) i IRI projekta Ulaganje u Znanost i inovacije Europski strukturni i investicijski fondovi (2019-2022) "Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi" (KK.01.1.1.04)

Rad je izrađen je u Laboratoriju za kemiju i biokemiju hrane Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Irene Landeka Jurčević sa Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ireni Landeka Jurčević što mi je omogućila i pružila priliku za sudjelovanje u iznimno zanimljivom istraživanju koje je rezultiralo ovim diplomskim radom. Veliko hvala i na svom utrošenom vremenu tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada, pomoći, mnogobrojnim savjetima i potpori tijekom pisanja te velikoj količini znanja koje je uvijek, s radošću, nesebično dijelila sa mnom tijekom cijelog procesa nastanka ovog rada. Sve naučeno ću s ponosom prenositi na ostale, u svim trenucima u životu i truditi se obogatiti druge znanjem kao što je i ona mene. Zahvaljujem joj se od srca što sam još više zavoljela znanost i hvala joj što mi je bila i što će mi i dalje biti veliki uzor. Zahvaljujem joj na svim prilikama i što je uvijek vjerovala u mene, te što mi je uljepšala fakultetsko obrazovanje.

Također, zahvalila bih se i prof. dr. sc. Domagoju Đikiću na pruženoj pomoći i savjetima tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada u Laboratoriju za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta.

Zahvaljujem se svim svojim prijateljima što su mi uljepšali vrijeme na fakultetu i što su uvijek bili spremni saslušati moje probleme. Hvala im na svakom smijehu, podršci, savjetu, ohrabrenju i najviše od svega prijateljstvu za koje znam da će trajati cijeli život.

Najviše se zahvaljujem moji bližnjima. Hvala mami i tati što su mi omogućili sve da završim ovaj fakultet i bavim se onime što toliko volim. Bez njihove podrške i neizmjerne ljubavi, neke stvari ne bi bile moguće i ne bi toliko značile. Zahvaljujem se i mojoj najdražoj seki bez koje ništa ne bi bilo isto. Hvala joj što je uvijek bila tu za mene, tješila me kad je bilo najgore i smijala se i slavila sa mnom sve uspjehe. Za kraj zahvaljujem mojoj ljubavi Domagoju na svojoj pruženoj beskonačnoj ljubavi, svim predviđanjima da ću proći sve ispite bez problema i neizmjernom strpljenju i razumijevanju za sve moje probleme. Zahvaljujem mu što me neprestano inspirira da budem bolja osoba, da težim nečemu većem i da se uvijek izborim za sebe. Bez svim njih ništa od ovog ne bi bilo moguće i isto i zato im neizmjereno, od srca hvala.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda

Laboratorij za kemiju i biokemiju hrane

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

UTJECAJ BIOAKTIVNIH MOLEKULA IZ EKSTRAKTA CVIJETA *Prunus spinosa* L. NA HIPERGLIKEMIJU U MIŠA

Tajana Frančić, 1208/N

SAŽETAK: Brojna istraživanja pokazuju da dijeta bogata polifenolnim spojevima pomaže u regulaciji hiperglikemije. Ekstrakt cvijeta *Prunus spinosa* L. promatran je zbog bogatog polifenolnog sastava, te utjecaja na razinu inzulina, glukoze u krvi (GUK), α -amilaze i nastalih produkata oksidacijskih proteina (AOPP) kod C57BL/6 miša. Kod miševa je izazvana hiperglikemija pomoću aloksana (150 mg kg^{-1} tjelesne mase) te su tretirani sa ekstraktom cvijeta *Prunus spinosa* L. u dozi od 25 mg kg^{-1} tjelesne mase koji je bogat bioaktivnim molekulama. Eksperiment je trajao 10 dana na miševima podijeljenima u četiri grupe. 1. grupa je kontrolna (K), 2. grupa je tretirana ekstraktom cvijeta *Prunus spinosa* L. (ECT), 3. grupa je aloksan grupa (AL), 4. grupa je aloksan grupa tretirana ekstraktom (AL+ECT). Polifenolni spojevi iz ekstrakta cvijeta *Prunus spinosa* L., u homogenatima jetre i bubrega, su statistički značajno smanjili aktivnost glukoze u krvi, inzulina i α -amilaze u skupini AL+ECT u odnosu na AL grupu. Statistički značajno smanjenje koncentracije AOPP u AL+ECT grupi ukazuje na antioksidacijski učinak ECT-a. Zaključno, ekstrakt cvijeta *Prunus spinosa* L. može pozitivno djelovati na hiperglikemiju i oksidacijski stres, te može poslužiti kao suportivna terapija u liječenju šećerne bolesti.

Ključne riječi: trnina (*Prunus spinosa* L.), oksidacijski stres, hiperglikemija, AOPP, inzulin

Rad sadrži: 58 stranica, 17 slika, 1 tablica, 95 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Irena Landeka Jurčević

Pomoć pri izradi: Irena Crnić, doktorant

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. red. prof. dr. sc. Verica Dragović Uzelac
2. red. prof. dr. sc. Irena Landeka Jurčević
3. red. prof. dr. sc. Domagoj Đikić, PMF, Zagreb
4. izv. prof. dr. sc. Ivana Kmetič, (zamjena)

Datum obrane: srpanj, 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Chemistry and Biochemistry
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

THE INFLUENCE OF BIOACTIVE MOLECULES FROM *Prunus spinosa* L. FLOWER EXTRACT ON HYPERGLYCAEMIA IN MICE

Tajana Frančić, 1208/N

ABSTRACT: Numerous studies show that a diet rich with polyphenolic compounds helps regulate hyperglycemia. *Prunus spinosa* L. flower extract was observed due to its rich polyphenolic composition, and its effect on insulin levels, blood sugar levels, α -amylase, and oxidation protein products (AOPP) in C57BL/6 mice. Hyperglycaemia was induced in mice by alloxan (150 mg kg⁻¹ bw) and treated with *Prunus spinosa* L. flower extract at a dose of 25 mg kg⁻¹ bw with total polyphenols. The experiment lasted 10 days on mice divided into four groups. Group 1 as control (C), group 2 as *Prunus spinosa* L. flower extract (PSE), group 3 as alloxan (AL) and group 4 as AL with PSE. Polyphenolic compounds from *Prunus spinosa* L. flower extract in liver and kidney homogenates showed a statistically significant decrease in blood sugar levels, insulin and α -amylase activity in the group AL with PSE compared to the AL group. A statistically significant decrease in AOPP concentration in the group AL with PSE indicates the antioxidant effect of PSE. In conclusion, *Prunus spinosa* L. flower extract can have a positive effect on hyperglycemia and oxidative stress, and can serve as a supportive therapy in the treatment of diabetes.

Key words: blackthorn (*Prunus spinosa* L.), oxidative stress, hyperglycemia, AOPP, Insulin

Thesis contains: 58 pages, 17 figures, 1 table, 95 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: PhD, Irena Landeka Jurčević, Full professor

Technical support and assistance: Irena Crnić, PhD student

Reviewers:

1. PhD. Verica Dragović Uzelac, Full professor
2. PhD. Irena Landeka Jurčević, Full professor
3. PhD. Domagoj Đikić, Full professor, PMF, Zagreb
4. PhD. Ivana Kmetič, Associate Professor (substitute)

Thesis defended: July 2020.

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
2.	TEORIJSKI DIO.....	2
2.1.	Trnina (<i>Prunus spinosa</i> L.).....	2
2.1.1.	Opće karakteristike biljke.....	2
2.1.2.	Kemijski sastav trnine.....	3
2.1.3.	Konzumacija i ljekovita svojstva.....	4
2.2.	Polifenolni spojevi.....	5
2.2.1.	Flavonoidi.....	6
2.2.2.	Fenolne kiseline.....	7
2.3.	Hiperglikemija.....	8
2.4.	Inzulin.....	11
2.4.1.	Kemijska struktura i sinteza inzulina.....	11
2.4.2.	Izlučivanje inzulina i inzulinski receptor.....	12
2.4.3.	Uloga inzulina u metabolizmu.....	13
2.5.	α -amilaza.....	15
2.6.	Produkti oksidiranih proteina.....	17
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	19
3.1.	Kemikalije.....	19
3.2.	Određivanje sadržaja ukupnih polifenola u ekstraktu cvijeta trnine primjenom UPLC MS/MS detekcije (ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometer).....	19
3.3.	Analiza šećera u ekstraktu cvijeta trnine HPLC metodom.....	21
3.4.	Pokusne životinje.....	22
3.4.1.	Indukcija (izazivanje) hiperglikemije u C57BL/6 miša.....	23
3.4.2.	Eksperimentalne grupe životinja.....	23
3.4.3.	Priprema tkiva (jetra, bubreg) za određivanje glikemijskih učinaka.....	23
3.5.	Određivanje proteina metodom po Lowry-u.....	24
3.6.	Određivanje produkata oksidacijskih proteina (AOPP) u homogenatu tkiva jetre i bubrega.....	24
3.6.1.	Priprema otopina.....	26
3.6.2.	Postupak.....	26
3.7.	Određivanje α -amilaze u serumu.....	27
3.7.1.	Priprema otopina.....	27
3.7.2.	Priprema uzorka (serum).....	28
3.7.3.	Postupak.....	28
3.8.	Određivanje inzulina u serumu.....	28
3.8.1.	Priprema otopina.....	29
3.8.2.	Postupak.....	30
3.9.	Određivanje glukoze u krvi (GUK).....	30
3.9.1.	Priprema otopina.....	31
3.9.2.	Postupak.....	31
3.10.	Statistička obrada podataka.....	31
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	32
4.1.	Fiziološka regulacija glukoze u krvi (GUK) nakon konzumacije ekstrakta cvijeta trnine u normalnom metabolizmu i hiperglikemiji (aloksanski model).....	33
4.2.	Fiziološka regulacija inzulina u serumu nakon konzumacije ekstrakta cvijeta trnine u normalnom metabolizmu i hiperglikemiji (aloksanski model).....	37
4.3.	Fiziološka regulacija α -amilaze u serumu nakon konzumacije ekstrakta cvijeta trnine u normalnom metabolizmu i hiperglikemiji (aloksanski model).....	41
4.4.	Redoks status (prooksidacijsko / antioksidacijsko djelovanje) tkiva nakon konzumacije ekstrakta cvijeta trnine u normalnom metabolizmu i hiperglikemiji (aloksanski model).....	44
5.	ZAKLJUČCI.....	49

6.	LITERATURA.....	50
-----------	------------------------	-----------

1. UVOD

Hiperglikemija je stanje u kojem je koncentracija glukoze u krvi veća od 125 mg dL^{-1} tijekom posta, odnosno veća od 180 mg dL^{-1} 2 sata nakon obroka. Ovo stanje je karakteristično za pacijente sa šećernom bolesti, ali je primijećeno i kod kritično bolesnih pacijenata. Smanjena sekrecija inzulina, smanjena upotreba glukoze, te povećano oslobađanje i proizvodnja glukoze su faktori koji doprinose stanju hiperglikemije. Hiperglikemija, ukoliko se ne liječi, može dovesti do oštećenje očiju, bubrega, živaca, srca i perifernog krvožilnog sustava (Hammer i sur., 2019).

Polifenolni spojevi su biološki aktivne komponente koji zbog svoje kemijske strukture pokazuju antioksidacijska i brojna druga svojstva. Njihova redovita konzumacija pokazuje pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje. Mnoga istraživanja ukazuju na činjenicu da flavonoidi smanjuju incidenciju nastanka raka i kroničnih nezaraznih bolesti poput neurodegenerativnih bolesti, kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa tipa 2. Pravilna prehrana bogata polifenolnim spojevima može pozitivno utjecati na naše zdravlje i smanjiti vjerojatnost razvitka navedenih bolesti. Namirnice koje su bogate polifenolnim spojevima su grožđe, bobičasto voće, kava, zeleni i crni čaj, čokolada (Del Rio i sur., 2013).

Trnina je samonikla biljka prisutna u našem podneblju, a njena posebnost je u njenom kemijskom sastavu koji obiluje polifenolnim spojevima. Upravo ti spojevi imaju antioksidacijska svojstva te sprječavaju oksidacijski stres, nastanak slobodnih radikala koji oštećuju stanice. Osim što se u narodnoj medicini koristi za probavne probleme i probleme s bubrezima, novija istraživanja na *Prunus spinosa* L. pokazuju njen potencijal za liječenje hiperglikemije, odnosno šećerne bolesti. EFSA je uvrstila trninu na listu funkcionalne hrane, u preporučenoj dozi od 1-2 g cvijeta trnine dnevno. Ova informacija dodatno ide u prilog tome da trnina ima povoljan kemijski sastav koji pozitivno utječe na zdravlje.

Cilj ovog rada je bio ispitati utjecaj bioaktivnih molekula iz ekstrakta cvijeta *Prunus spinosa* L. na *in vivo* modelu normalnog i hiperglikemijskog C57BL/6 miša. Ispitivano je antioksidacijsko svojstvo ekstrakta cvijeta *Prunus spinosa* L. na biomarkere oksidacijskog stresa. Promatrani biomarkeri su bili razina inzulina u serumu, α -amilaza, razina glukoze u krvi (GUK) i produkti oksidacije proteina (AOPP) koji služi kao pokazatelj oštećenja proteina kod hiperglikemije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TRNINA (*Prunus spinosa* L.)

2.1.1. Opće karakteristike biljke

Trnina (*Prunus spinosa*, L.) je višegodišnja listopadna biljka koja je na našem području poznata i pod imenima trlinka, crni trn, trnjina, trnula, trnavka, divlja šljiva, trn, grmulja ili kukinja. Za trninu je karakteristično da raste u obliku grma koji ima bodlje, a u prosjeku naraste 1-2 metra (slika 1) (Anonymous 1, 2020). Brojnim izdancima i zamršenim granama može tvoriti živicu, a neki je koriste i na klizištima jer zbog dugih korijena sprječava eroziju tla. Raste uz rubove šuma i na padinama neobrađenih područja (Popescu i Caudallo, 2016).

Trnina pripada rodu *Prunus*, potporodici *Prunoideae* i porodici *Rosaceae* (Tutin i sur, 1968). Kora drveta je crno-smeđe boje, a grane završavaju trnovima. Listovi su zelene boje i ovalnog oblika, ali nazubljeni te dugi 2-5 cm i široki 1-2 cm. Prilikom pupanja i rasta listovi su s donje strane dlakavi, a nakon što izrastu su goli. Cvjetovi trnine su ugodnog i blagog mirisa, bijele su boje i javljaju se nasumično na granama. Cvjetovi se pojavljuju neposredno prije pupanja listova, a formiraju se dva-tri cvjeta zajedno. Svaki cvijet sadrži oko 20 prašnika, najčešće žute ili crvene boje (Popescu i Caudallo, 2016).



Slika 1. Trnina cvijet (Anonymous 1, 2020)

Plod je okruglast, ljubičaste do tamnoplave boje, promjera 1-1,5 cm. Pulpa ploda trnina je zelenkaste boje i vrlo se teško odvaja od endokarpa. Meso je trpkasto i kiselo, te se vrlo teško odvaja od koštice. Za meso bismo mogli reći da ima adstrigentno djelovanje jer u ustima izaziva osjet stezanja. Plodovi sazrijevaju u kasno ljeto, ali se često drže cijelu zimu na granama. Plod tek nakon višestrukih mrazova gubi svoj trpak okus i postaje slađi.

U svijetu trnina prirodno raste u zapadnoj Aziji i sjeverozapadnoj Africi (Tutin i sur., 1968), a uvezena i lokalno uzgajana u Sjevernoj Americi i na Novom Zelandu. U Europi je prirodno prisutna u južnom i centralnom dijelu Europe, osim na južnom dijelu Pirinejskog poluotoka i Skandinaviji. Prisutna je i u Maloj Aziji, Kavkazu i uz Kaspijsko jezero. Trnina je u Hrvatskoj rasprostranjena jer se u potpunosti prilagodila našoj kontinentalnoj klimi. Većinom raste uz rubove šuma, jako dobro preživljava na neplodnom tlu i najčešće na vapnenačkom tlu. Voli sunčana područja, ali će uspješno rasti i u djelomičnom hladu (Popescu i Caudallo, 2016).

2.1.2. Kemijski sastav trnina

Svi dijelovi trnina (plod, cvijet, listi i kora) su bogati biološki aktivnim komponentama, a neke od njih su polifenolni spojevi, uključujući flavonoide, proantocijanidine A, antocijanine, kumarine i fenolne kiseline (Marchelak i sur., 2017). Od polifenolnih spojeva u cvijetu najzastupljeniji su flavonoidi, odnosno flavanoli. Među flavonoidima koji su izolirani iz cvijeta zastupljeni su kamferol, kvercetin, kamferol 3-O- α -L-arabinofuranozid, kvercetin 3-O- α -L-arabinofuranozid, kvercetin 3-O- β -D-ksilopiranozid, kamferol 3-O- α -L-arabinofuranozid-7-O- α -L-ramnospiranozid. Kvantitativne studije su pokazale da je cvijet trnina bogat flavonoidima, gdje ima 2,7% aglikona i 3,8% glikozida (Olszewska i Wolbiś, 2001).

Fenolne kiseline koje su zastupljene u trnini su galna kiselina, kafeinska i protokatehinska kiselina. Cvjetovi trnina u manjim koncentracijama sadrže sterole i triterpene. Od triterpenskih kiselina, kvantificirane su ursolična i oleinska kiselina. S obzirom na sterole, koncentracijski je najviše β -sitosterola, dok u manjim količinama ima γ -sitosterola, sterol glikozida i stigmasterola (Pinacho i sur., 2015).

Plodovi trnina su također bogati polifenolnim spojevima, od kojih najveću zastupljenost imaju flavonol glikozidi, odnosno kvercetin i kamferol i fenolne kiseline, odnosno kafeinska kiselina i derivati neoklorogenske kiseline. Osim navedenog, sadrže i derivate kumarina, antocijanine te proantocijanidini A (Pinacho i sur., 2015).

Uspoređujući antioksidativni kapacitet, Andronie i suradnici (2019) pokazali su da uspoređujući trninu, brusnicu, šipak i crveni drijen, šipak ima najveći antioksidativni kapacitet ($105,6 \pm 1,38 \mu\text{g mg}^{-1}$ ekvivalenta askorbinske kiseline), a potom trnina ($49,89 \pm 1,92 \mu\text{g mg}^{-1}$ ekvivalenta askorbinske kiseline). Brusnica je imala niži antioksidativni kapacitet od trnine ($34,15 \pm 1,82 \mu\text{g mg}^{-1}$ ekvivalenta askorbinske kiseline), a crveni drijen je imao najniži ($25,15 \pm 1,65 \mu\text{g mg}^{-1}$ ekvivalenta askorbinske kiseline).

2.1.3. Konzumacija i ljekovita svojstva

Trnina je ekonomski isplativa biljka. Vrlo malo je potrebno intervenirati tijekom njenog uzgoja, a gotovo svi njeni dijelovi (plod, list, cvijet i kora) imaju primjenu u prehrambenoj industriji i medicini. Plodovi su većinom upotrijebljeni za izradu džemova, želea, sokova, vina, octa i ostalih alkoholnih pića. Adstringentno svojstvo daje posebnost okusu svim proizvodima od trnine. Listovi, cvjetovi i kora se mogu koristiti za pripravu raznih ekstrakata, tinktura ili za pripremu čaja (Popescu i Caudallo, 2016).

U narodnoj medicini čaj od trnine se preporučuje kao blagi purgativ i sredstvo za jačanje želuca jer pospješuje tek i otklanja želučane grčeve. Čaj se još koristi za čišćenje kože i liječenje kožnih osipa. Također se preporučuje i kod problema s mokrenjem, bolesti bubrega i bubrežnih kamenaca. Sok od trnine ima blago laksativno djelovanje. Marmelada od trnine se preporučuje starijim osobama za poboljšanje i otvaranje teka jer pogodno djeluju na lučenje želučane kiseline (Ašič, 1991).

Brojna istraživanja navode da trnina ima potencijalna vazoprotektivna, protuupalna, dijuretska i detoksificirajuća svojstva. Za ekstrakte cvijeta trnine se smatra da imaju pozitivan utjecaj na probavni sustav i respiratorne probleme, razne kardiološke probleme kao što su miokarditis i ateroskleroza. Flavonoidi iz trnine poboljšavaju kapilarnu permeabilnost i smanjuju upalne procese prisutne u unutarnjim organima. Osim toga, normaliziraju razinu kolesterola u krvi i pokazuju spazmolitički efekt na intestinalnim segmentima. Polifenolni spojevi imaju antioksidativnu aktivnost i smanjuju oksidativni stres u organizmu i upalne procese uzrokovane slobodnim radikalima. Kao hvatači slobodnih radikala, kelatori prijelaznih metala, inhibitori proupalnih enzima, modifikatori signalnih staničnih puteva, polifenoli imaju zaštitnu ulogu za stanici i funkcionalne elemente stanice. Sprječavaju lipidnu peroksidaciju, kronične upale i oksidativno oštećenje DNK. Upravo zbog toga polifenoli koji se u trnini nalaze u velikim količinama, imaju vazoprotektivno, antiaterogensko, antitrombotičko i antiapoptičko djelovanje (Marchelak i sur., 2017).

Zbog izraženog antioksidativnog djelovanja polifenola, trnina bi potencijalno mogla imati kemoprotektivan učinak. Smanjenjem koncentracije slobodnih radikala, kroničnih upala, lipidne peroksidacije, oštećenja proteina i signalnih puteva između stanica, smanjuje se vjerojatnost nastanka neželjenih mutacija i nastanak kancerogenih stanica (Guimarães i sur., 2013).

2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI

Polifenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti prisutni u svim biljnim tkivima (voće, povrće, žitarice, čajevi, začini itd.). Uloga u biljnim vrstama im je zaštita biljke od UV zračenja, zaštita biljke od biljojeda i mikrobne infekcije. Također privlače kukce koji vrše oprašivanje i sudjeluju kao signalne molekule u formaciji korijenskih nodula koje vežu i učvršćuju dušik (Del Rio i sur., 2013).

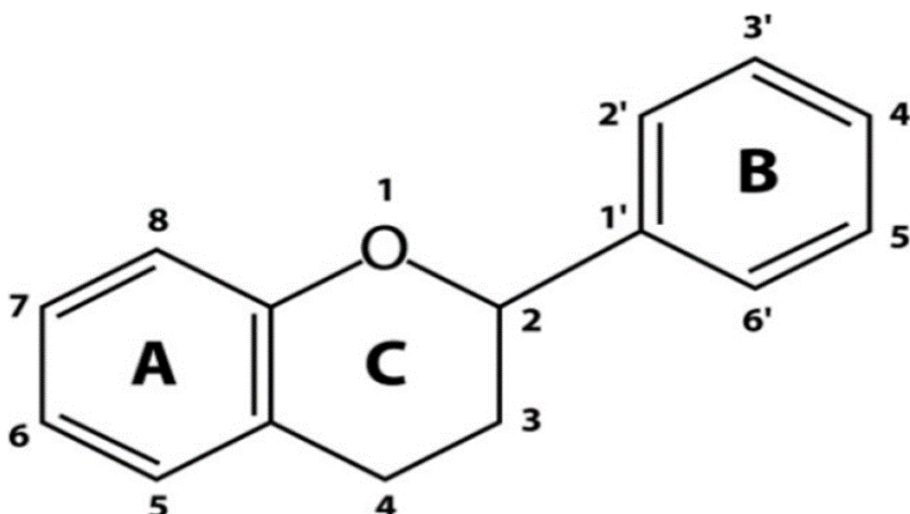
U hrani, polifenoli doprinose mirisu, gorčini, astrigenciji, boji, okusu i oksidativnoj stabilnosti. Krajem 20. stoljeća, brojne epidemiološke studije i meta-analize sugeriraju da kontinuirani unos hrane bogate polifenolima pruža zaštitu od razvijanja raznih vrsta rakova, kardiovaskularnih bolesti, osteoporoze, neurodegenerativnih bolesti i dijabetesa. Najveći utjecaj na organizam pokazuju kroz antioksidativnu aktivnost i mogućnost doniranja protona slobodnom radikalu čime se on neutralizira. Polifenoli izravno pokazuju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje i zbog toga je svoju svakodnevnu prehranu potrebno obogatiti namirnicama bogatima polifenolima (Pandey i Rizvi, 2009).

Polifenoli se mogu naći u rasponu od malih molekula do visoko polimeriziranih spojeva. Imaju barem jedan aromatski prsten sa jednom ili više hidroksilnih skupina. S obzirom na kemijske strukture, polifenoli se mogu podijeliti u nekoliko skupina koje obuhvaćaju flavonoide, fenolne kiseline, lignane i stilbene. Flavonoidi i fenolne kiseline čine 60%, odnosno 30% svih polifenolnih spojeva (Li i sur., 2018).

2.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi su polifenolni spojevi koji sadrže 15 ugljikovih atoma u dva aromatska prstena povezana mostom s tri ugljikova atoma. Struktura obuhvaća A, B i C aromatski prsten (slika 2) (Anonymous 2, 2020). Članovi flavonoida se razlikuju po drugačijim supstituentima u prstenu C. Klasifikacija flavonoida se vrši s obzirom na supstituentne. Prstenovi mogu proći

kroz različite reakcije prilikom metaboliziranja kao što su hidroksilacija, metilacija i glukozidacija s monosaharidima i oligosaharidima (Heim i sur., 2001).



Slika 2. Struktura flavonoida (Anonymous 2, 2020)

Flavonoidi se s obzirom na klasifikacije mogu podijeliti na flavone, flavonole, flavan-3-ole, izoflavone, flavanone i antocijanidine. Ostale vrste flavonoida su manje zastupljene komponente u prehrani, a neki od njih su halkoni, dihidrohalkoni, dihidroflavonoli, flavan-3,4-dioli, kumarini i auron. Flavonoidi se najčešće prirodno nalaze u obliku glikozida, a ne u obliku aglikona (Del Rio i sur., 2013). Nastajanje flavonoida u biljnim vrstama je uvjetovan svjetlošću, uvjetima u okolišu, gentici biljke, stupnju zrelosti i vrsti biljke (Fruhbeck, 1996).

Dvostruka veza u centralnom aromatskom prstenu omogućuje flavonoidima planarnu strukturu. Najistraživaniji predstavnik flavonoida je kvercetin koji je prirodno prisutan u brokuli, luku, jabukama i bobičastom voću. Flavanoni se najčešće nalaze u agrumima. Antocijanini se najviše nalaze u jagodama, ostalom bobičastom voću, grožđu, vinu i čaju. Katehini, predstavnik flavan-3-ola, se nalazi u zelenom i crnom čaju i crnom vinu.

Najvažnije obilježje flavonoida je neutraliziranje slobodnih radikala kisikove vrste (ROS). *In vitro* istraživanja su pokazala da flavonoidi imaju protuupalna, antialergijska, antiviralna i antikancerogena svojstva (Nijveldt i sur., 2001). U hrani se flavonoidi primarno nalaze u obliku 3-O-glikozidi i polimeri. Postoji nekoliko vrsta veće strukture i polimera. Enzimska oksidacija listića zelenog čaja tijekom fermentacije u crni čaj rezultira polimerizacijom flavanola u tanine i druge kompleksnije strukture. Kondenzirani tanini i proantocijanidini u svojoj strukturi sadrže jedinice flavanola (Heim i sur., 2001).

Flavonoli su rasprostranjeni u biljnom svijetu osim u svijetu algi i gljiva. Imaju nezasićenu vezu između C2 i C3 atoma C prstena, a uz to imaju hidroksilnu skupinu vezanu na C3 atomu istog prstena. Neki od najzastupljenijih flavonola su kaemferol, kvercetin, isoramentin i miricetin koji su primarno u glikozidnoj formi. Najčešće se vežu s glukozom i ramnozom, ali mogu i s galaktozom, arabinozom i ksilozom. Iako je limitiran broj aglikona, postoji oko 200 šećernih konjugata s kaemferolom. S obzirom na uzgoj, uvjeti uzgoja, sezonske promjene i razlike u povrću, koncentracija flavonola u namirnici može varirati.

Flavanoli su vrlo zastupljena skupina flavonoida, a često su prepoznati pod nazivom katehini. Ova vrsta flavonoida ima zasićenu vezu između C2 i C3 atoma u C prstenu. Iako je većina flavonoida u voću obliku glikozida, flavan-3-oli su prisutni u slobodnom obliku. Povezivanjem flavan-3-ola nastaju procijanidini (Del Rio i sur., 2013).

Proantocijanidini se još nazivaju i kondenzirani tanini. To je skupina flavonoida koji u svome sastavu imaju flavanolske podjedinice povezane u dimere, trimere ili oligomere, a glavne podjedinice su (-)-epikatehin i (+)-katehin. U hrani su odgovorni za osjećaj trpkosti i osjećaj stezanja u ustima. Svojstva variraju ovisno o stupnju polimerizacije, a najtrpkiji su tetrameri. Najzastupljeniji procijanidini u biljkama su dimeri procijanidini B skupine (B₁, B₂, B₃, B₄) (Heim i sur., 2001).

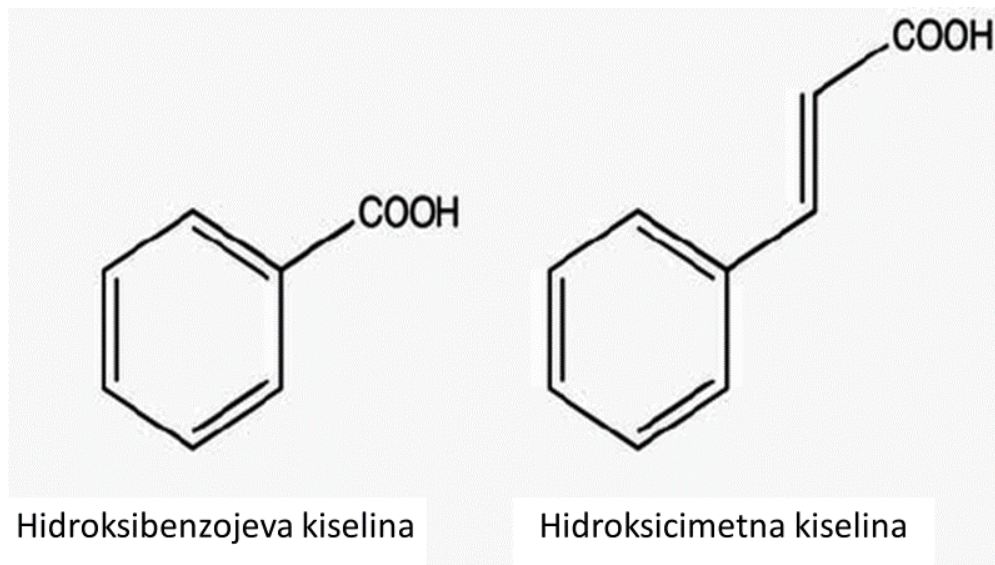
Antocijani su derivati 2-fenilbenzopirilijevih soli, najčešće su u obliku 3- glikozida i 3,5-diglikozida. Njihovi aglikoni se nazivaju antocijanidini. Najčešći aglikoni antocijanidini su pelargonidin, cijanidin, delfinidin, peonidin, petunidin i malvidin. Nakon konjugacije ovih spojeva sa šećerima i organskim kiselinama, nastaju brojni antocijani različitih boja od narančaste i crveno do plave i ljubičaste (Del Rio i sur., 2013).

2.2.2. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su podskupina polifenolnih spojeva i čine trećinu svih fenolnih spojeva u biljkama. Mogu se pronaći u slobodnom i vezanom obliku, dok su u prirodi najčešće u konjugiranim oblicima ili kao esteri. S obzirom na strukturu mogu se podijeliti u dvije podskupine: hidroksicimetnu (C6-C3) i hidroksibenzojevu (C6-C1) kiselinu (slika 3) (Khoddami i sur., 2013). Stupanj hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena uzrokuje razliku u strukturi između nekih hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina (D'Archivio i sur., 2010).

Najvažniji derivati hidroksicimetne kiseline su p-kumarinska, kafeinska, ferulinska, sinapinska kiselina. Najpoznatiji ester hidroksicimetne kiseline je klorogenska kiselina. Sve

navedene kiseline su najčešće u trans konfiguraciji. Najvažniji derivati hidroksibenzojeve kiseline su galna, protokatehinska, vanilinska i siringinska kiselina. U prirodi su prisutnije u slobodnom obliku ili konjugirane šećerima, odnosno organskim kiselinama (Bravo, 1998).



Slika 3. Struktura hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Khoddami i sur., 2013)

2.3. HIPERGLIKEMIJA

Pojam hiperglikemija dolazi od grčke riječi *hyper* (visoko), *glykys* (sladak, šećer) i *haima* (krv). Hiperglikemija je stanje u kojem je razina glukoze u krvi veća od 125 mg dL^{-1} tijekom posta i veća od 180 mg dL^{-1} 2h nakon obroka. Pacijenti s predijabetičnim stanjem, tijekom posta imaju razinu glukoze u krvi između 100 mg dL^{-1} i 125 mg dL^{-1} . Pacijentu se dijagnosticira dijabetes kad na tašte ima veću koncentraciju glukoze u krvi od 125 mg dL^{-1} . Ukoliko se hiperglikemija ne liječi, može dovesti do brojnih komplikacija koje uključuju oštećenje očiju, bubrega, živaca, srca i perifernog krvožilnog sustava (Hammer i sur., 2019).

Stanju hiperglikemije pridonose faktori kao što su smanjena sekrecija inzulina, smanjena upotreba glukoze i povećana proizvodnja i oslobađanje glukoze. Koncentracija glukoze u krvi varira ovisno o oralnom unosu glukoze, proizvodnji glukoze u jetri i iskorištavanju glukoze kao izvoru energije. U metabolizmu glukoze i njejoj koncentraciji u krvi, najveću ulogu ima hormon inzulin (Yari i sur., 2019; Simon i Witmann, 2019).

Glavni faktori rizika za hiperlipidemiju:

- prekomjerna tjelesna masa i pretilost
- prisutnost dijabetesa tipa 2 u obiteljskoj anamnezi

- hiperlipidemija i hipertenzija
- gestacijski dijabetes
- prisutnost policističkih jajnika

Neki od sekundarnih uzročnika hiperlipidemije su:

- disfunkcija gušterače uslijed kroničnog pankreatitisa, hemokromatoza, rak gušterače i cistična fibroza
- endokrini poremećaji poput Cushingov sindrom, akromegalija, feokromocitom koji uzrokuju rezistenciju na inzulin
- upotreba lijekova poput estrogena, glukokortikosteroida i fenitoina
- gestacijski dijabetes
- totalna parenteralna prehrana i infuzija s dekstrozom
- postoperativni i kritično bolesni pacijenti

Kod pacijenata s dijabetesom tip 1, hiperglikemija je rezultat genetičkih, okolišnih i imunskih faktora. U ovoj bolesti dolazi do razaranja beta stanica gušterače i insuficijencije inzulina. Kod pacijenata s dijabetesom tip 2 hiperglikemiji prethodi rezistencija na inzulin i abnormalna sekrecija inzulina (Seino i sur., 2010).

Hiperglikemija je primjećena i kod kritično bolesnih pacijenata kod kojih je organizam u stanju izrazitog stresa. U proupalnoj fazi kritičnih bolesnika, metabolički stres vodi do raspada glikogena, kateholamina, sinteze adenokortikotropnih hormona, sinteze glukagona i inzulinske rezistencije čime se povećava vjerojatnost razvijanje sepse, sindroma sustavnog upalnog odgovora i traumatske ozljede mozga (Bar-Or i sur., 2019).

Neki od simptoma hiperglikemije obuhvaćaju poliuriju, polidipsiju i gubitak tjelesne mase. Kako razina glukoze u krvi raste, pacijenti mogu postati letargični, nefokusirani i izmijenjenog mentalnog statusa. Ukoliko se stanje odmah ne tretira, pacijenti mogu pasti u komatozno stanje (Shakya i sur., 2020).

Ukoliko se hiperglikemija ne tretira, nastupaju oštećenja u organizmu. Dolazi do smanjenjeg cerebralnog protoka krvi, intracelularne acidoze i niske razine ATP-a. Stanice koje su oštećene zbog hiperglikemije ne mogu efektivno kontrolirati intracelularnu koncentraciju glukoze. U tome su obuhvaćene i neuralne stanice, stanice kapilarnog endotela i renalne stanice. Povećana koncentracija glukoze u stanicama rezultira aktiviranje Krebsovog ciklusa i povećanu proizvodnju redukcijskih ekvivalenata ATP-u, nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) i sukcinat. Povećanom proizvodnjom NADH i sukcinata, dolazi do

povećane proizvodnje superoksidnog radikala koji potom direktno oštećuje mitohondrijske komplekse.

Superoksid može oštetiti DNA što rezultira aktivacijom poli-ADP ribeza polimeraza (PARP) koja inhibira gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH), a samim time i glikolizu. Inhibicija GAPDH može aktivirati četiri oštećujuća puta u metabolizmu.

Prvi put je povećanje aktivnosti protein kinaze C. Protein kinaza C regulira NF- κ B, transkripcijski faktor koji kontrolira proizvodnju mnogih proupalnih gena. Prilikom kratkih epizoda hiperglikemije dolazi do povećanje proizvodnje NF- κ B čime se povećava upalni odgovor u tijelu. Osim toga, protein kinaza C smanjuje proizvodnju endotelnog NOS-a (eNOS).

Drugi put je povećanje proizvodnje heksamina, odnosno N-acetil glukozamina koji utječe na promjenu transkripcijskih faktora i ekspresiju gena.

Treći put je povećana glikacija određenih molekula koje mogu promijeniti proteine uključene u transkripciju gena i ekstracelularni matriks. Četvrti put uključuje povećanje koncentracije šećernih alkohola. Kada je razina glukoze u stanici visoka, dio glukoze se reducira u sorbitol pomoću aldoza reduktaze. Taj enzim ima afinitet za NADPH koji je kofaktor glutation reduktaze zbog čega dolazi do smanjene koncentracije glutationa koji je vrlo važan antioksidans (Brealey i Singer, 2009).

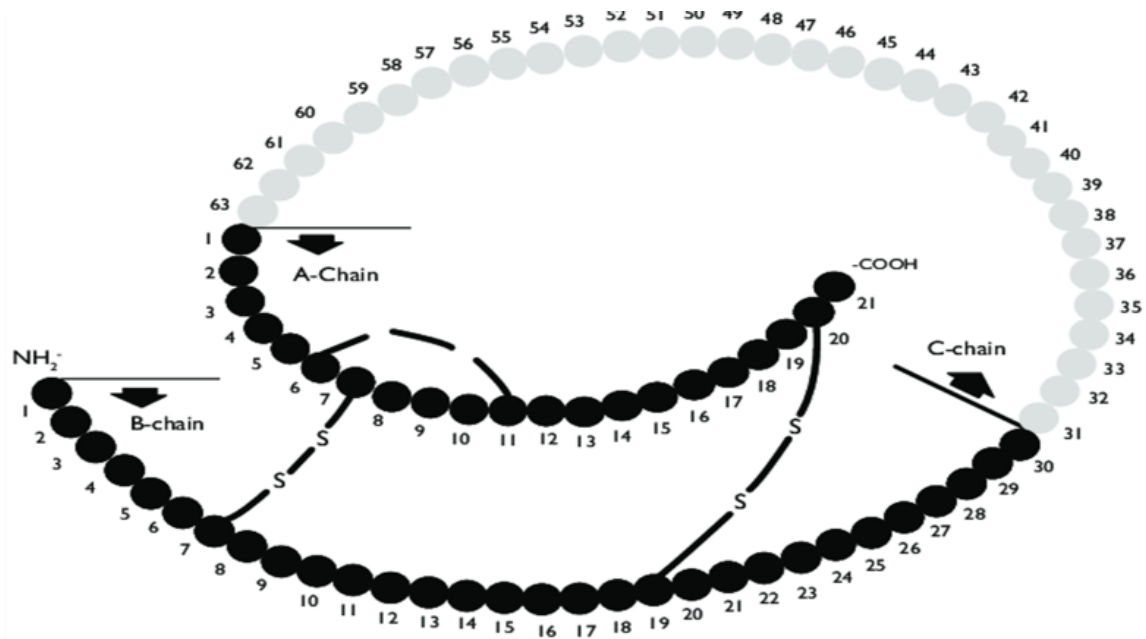
Neliječena i ne tretirana hiperglikemija kroz određeni period vremena uzrokuje mikrovaskularne komplikacije (retinopatija, nefropatija, neuropatija) i makrovaskularne komplikacije (kardiovaskularne, cerebrovaskularne bolesti, bolesti perifernog krvotoka) (Seino i sur., 2010).

2.4. INZULIN

Inzulin je anabolički, peptidni hormon koji se luči iz β stanica sadržanih u Langerhansovim otočićima u pankreasu. Potom se izlučuje kroz portalnu venu i jetru u krvotok. S obzirom na koncentraciju glukoze, aminokiselina, ketonskih tijela i masnih kiselina u plazmi, β stanice reguliraju proizvodnju inzulina. Generalna uloga inzulina je očuvanje i kontrola energije tijekom unosa energije i tijekom perioda posta (Zhao i sur., 2017; Wilcox, 2005).

2.4.1. Kemijska struktura i sinteza inzulina

Promatrajući kemijsku strukturu, inzulin je peptidni hormon sastavljen od 51 aminokiseline raspoređene u dva peptidna lanca, gdje A lanac sadrži 21 aminokiselinu, a B lanac 30 aminokiselina (slika 4) (Joshi i sur., 2007).



Slika 4. Struktura inzulina (Joshi i sur., 2007)

Lanci su povezani pomoću tri disulfidna mosta preko cisteinskog ostatka i tvore monomer. Monomerni oblik je aktivan oblik inzulina, ali molekule inzulina mogu stvarati dimere zbog uspostavljanja vodikovih veza između C-terminalnih krajeva B-lanca. Kada su u tijelu prisutni cinkovi ioni, inzulinski dimeri se vežu i tvore oblik heksamera koji se potom pohranjuje. U heksameru se nalazi šest molekula inzulina u obliku 3 dimera sa 2 iona cinka. Razlike između struktura su da monomeri i dimeri lako difundiraju u krvotok, a heksameri se šire sporije. Na ovome se temelji razvoj brojnih preparata inzulina, odnosno rekombinativnih analoga inzulina za dijabetičare (Fu i sur., 2013).

Inzulin se sintetizira u β -stanicama Langerhansovih otočića u gušterači. INS gen kodira za transkripciju preproinzulina koji sadrži hidrofobni N-terminalni signalni protein koji je u interakciji sa citosolnom ribonukleoproteinskom česticom za prepoznavanje signala (SRP). SRP olakšava translokaciju preproinzulina kroz membranu endoplazmatskog

retikuluma u lumen. Ovaj proces se odvija preko kanala za transport peptida gdje se signalni peptid na preproinzulinu cijepa pomoću signalne peptidaze i nastaje proinzulin. Proinzulin se preslaguje i nastaju tri disulfidne veze (Egea i sur., 2005).

Nakon nastanka trodimenzionalne konformacijske strukture, proinzulin se transportira iz endoplazmatskog retikuluma u Golgijevo tijelo gdje proinzulin ulazi u sekrecijske vezikule gdje dolazi do cijepanja na inzulin i C-peptid. Oni se pakiraju u sekrecijske vezikule zajedno s amilinom i drugim, manje zastupljenim sekrecijskim produktima β -stanica (Nishi i sur., 1990).

2.4.2. Izlučivanje inzulina i inzulinski receptor

Povećana koncentracija glukoze u krvi je prvi okidač u glukozno posredovanoj sekreciji inzulina iz sekrecijskih granula β -stanica. Glukoza ulazi u β -stanicu i dolazi do fosforilacije glukoze u glukoza-6-fosfat uz utrošak ATP-a i aktivaciju enzima glukokinaza. Potom dolazi do oksidacije glukoze-6-fosfat i proizvodnje ATP-a koji zatim inhibira ATP-osjetljive kalijeve kanale. Zatvaranjem tih kanala dolazi do depolariziranja stanične membrane i otvaranja kalcijevih kanala zbog promjene napona membrane. Time nastaje priljev iona kalcija i stapanje vezikula sa inzulinom, te izlučivanje inzulina u izvanstaničnu tekućinu egzocitozom. Uz to dolazi do aktivacije fosfolipaze i protein kinaze C, te stimulacije aktivnosti adenilil ciklaze i aktivacije protein kinaze A u β -stanicama čime se dodatno potiče sekrecija inzulina (Wilcox, 2005).

Vežanjem inzulina na inzulinski receptor započinje niz aktivacijskih kaskadnih reakcija. S obzirom na kemijsku strukturu, inzulinski receptor je heterotetramer koji se sastoji od dvije α i dvije β glikoproteinske podjedinice vezane disulfidnom vezom locirane na membrani stanice. Inzulin se veže na aktivno mjesto na ekstracelularnu α podjedinicu i potom dolazi do konformacijske promjene i omogućuje vežanje ATP-a na intracelularnu komponentu β podjedinice. Vežanjem ATP-a aktivira se fosforilacija β podjedinice, odnosno tirozin kinazna aktivnost. Reakcija fosforilacije β podjedinice je zapravo autofosforilacija katalizirana enzimom tirozin kinaza čime dolazi do aktivacije katalitičkog djelovanja receptora (Kido i sur., 2001).

Aktivacijom inzulinskog receptora posljedično dolazi do fosforilacije brojnih drugih unutarstaničnih proteina, među kojima su najzastupljeniji inzulinski receptorski supstrati (IRS) koji posreduju učinku inzulina na pojedina tkiva. Dva su glavna postreceptorska signalna puta. U prvom signalnom putu dolazi do fosforilacije IRS-1 i IRS-2, te aktivacije

fosfatidilinozitol (PI) 3-kinaze koji je potreban za aktivaciju metaboličkih učinika inzulina. Glukozni transporter ovisni o inzulinu su regulirani pomoću signalnog puta PI 3-kinaza. GLUT2 transportira glukozu u stanice jetre i β -stanice gušterače, dok je GLUT4 glavni transporter glukoze u masno tkivo i mišićne stanice. U drugom signalnom putu dolazi do aktivacije protein kinaze aktivirane mitogenom (MAP) i dolazi do mitogenog učinka inzulina, rasta i proliferacije stanice, kao i prokoagulatno djelovanje (Falkoll i sur., 2004; Low Wang i sur., 2004).

2.4.3. Uloga inzulina u metabolizmu

Sintezu i sekreciju inzulina reguliraju nutritivni i ne-nutritivni čimbenici i to s obzirom na okolišne čimbenike i stimulanse, te interakcije drugih hormona. Promatrajući nutrijente iz hrane, na sekreciju inzulina, utjecaj imaju makronutrijenti (masti, proteini, ugljikohidrati).

Uloga inzulina u metabolizmu glukoze je regulacija glukoznih transportnih kanala GLUT-2 i GLUT-4. Ulaskom glukoze u stanicu može započeti fosforilacija glukoze u glukoz-6-fosfat katalizirano heksakinazom. Time je započeta prva reakcija glikolize i metabolizam glukoze do acetyl-CoA.

Uloga inzulina u metabolizmu glikogena je stimulacija same sinteze glikogena. Aktivirani inzulinski receptor ima enzimsku aktivnost te katalizira fosforilaciju inzulinske ovisnu protein kinazu B (PKB). PKB katalizira fosforilaciju protein fosfataze 1 (PP1). Aktivirana PP1 uzrokuje defosforilaciju glikogen sintaze, čime ona postaje aktivna i započinje sintezu glikogena. Kada organizam nema dovoljno energije i nije prisutan inzulin, dolazi do inaktivacije PP1 i zaustavljena je sinteza glikogena, te može započeti njegova razgradnja. U glukoneogenezi, inzulin inhibira ekspresiju gena za enzime fosfoenolpiruvat karboksilazu, fruktoza-1,6-bisfosfatazu i glukoz-6-fosfatazu.

Uloga inzulina u metabolizmu masti se manifestira kroz ekspresiju lipogeničkih enzima. Višak glukoze se skladišti u obliku masti u adipoznim stanicama. Inzulin također regulira defosforilaciju i inhibiciju hormon-senzitivnih lipaza, što dovodi do inhibicije lipolize. Osim navedenog, inzulin povećava serumske vrijednosti slobodnih masnih kiselina.

Uloga inzulina u metabolizmu proteina se manifestira kroz sintezu proteina. Inzulin stimulira sintezu proteina na način da povećava intracelularni unos alanina, arginina i glutamina. Također povećava ekspresiju gena za sintezu albumina i miozina u mišićnim vlaknima.

Uloga inzulina u upalnim reakcijama i vazodilataciji se odvija u makrofagima i endotelnim stanicama gdje inzulin ima protuupalno djelovanje. Inzulin stimulira ekspresiju

endotelne NO sintaze (eNOS). eNOS otpušta dušikov oksid koji uzrokuje vazodilataciju. Osim toga, inzulin vrši supresiju NF- κ B koji je prisutan u endotelnim stanicama i uzrokuje sintezu upalnih spojeva. Antioksidativna svojstva inzulina se očituju kroz supresiju nastanka reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Inzulin inhibira ekspresiju NADPH oksidaze koja generira kisikove radikale (Wilcox, 2005).

Poremećaji u metabolizmu inzulina rezultiraju određenim bolestima. Najčešće su dijabetes tip 2 kod kojeg dolazi do smanjene ili nedovoljne proizvodnje inzulina ili nemogućnost tijela da reagira na inzulin ili dijabetes tip 1 kod koje dolazi do potpunog manjka inzulina i gdje su osobe doživotno ovisne o inzulinskoj terapiji. Dijabetes tip 2 se najčešće javlja kod pretilih osoba sa ostalim metaboličkim poremećajima, dok dijabetes tip 1 nastaje kod mlađe populacije i kod osoba koje imaju genetsku preispoziciju.

Rezistencija na inzulin je bolest vezana za neodogovarajući metabolizam inzulina. Kako je organizam neosjetljiv na inzulin, glukoza nedovoljno ulazi u stanice i zaostaje u krvotoku čime dolazi do neiskorištavanja glukoze za energiju i potencijalnih oštećenja u organizmu. Vrlo često, kada stanica nastoji prevladati inzulinsku rezistenciju u masnom i mišićnom tkivu i održati normalnu koncentraciju glukoze u krvi, nastaje kompenzacijska hiperinzulinemija zbog pojačanog rada β -stanica. Inzulinska rezistencija može dovesti i do razvijanja drugih bolesti kao što su arterijska hipertenzija, nealkoholna masna jetra, nealkoholni steatohepatitis, sindrom policističnih jajnika, poremećaji koagulacije i fibrinolize, razne kronične upale, endotelna disfunkcija, maligne bolesti (Smirčić-Duvnjak, 2004).

2.5. α -AMILAZA

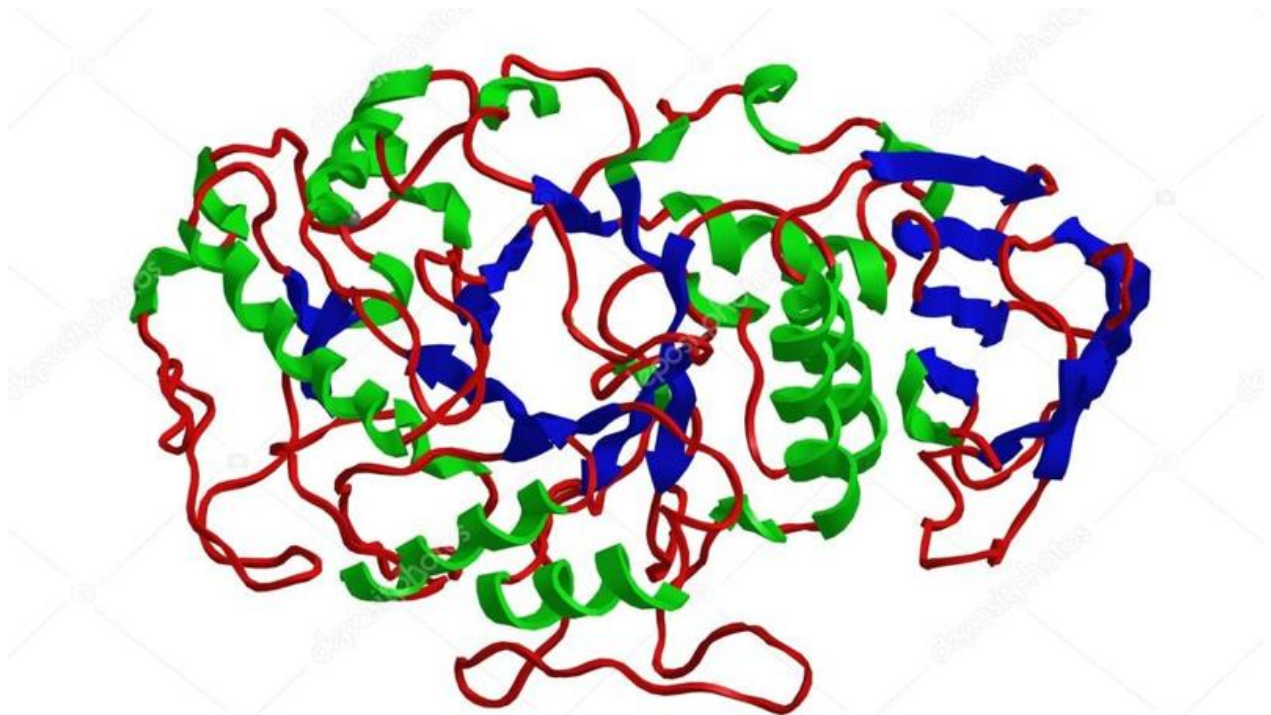
α -amilaza (1,4- α -D-glukan-4 glukanohidrolaza) je vrlo bitan enzim u metabolizmu ugljikohidrata (slika 5) (Anonymous 3, 2020).

Amilaza koja je endoglukozidaza cijepa α -1,4 glikozidnu vezu u amilozi, osim terminalne veze na reducirajućem kraju, te ju tako rastavlja na maltozu i glukozu, ali ne djeluje na maltozu, disaharid sastavljen od dvije jedinice glukoze povezane 1,4 vezom. Osim djelovanja na amilozu, α -amilaza djeluje i na glikogen, te amilopektin gdje dolazi do oslobađanja jedinica glukoze nakon cijepanja 1,4-glikozidne veze. Amilazu izlučuju žlijezde slinovnice (nalazi se u slinu), gušterača i jednim malim dijelom jetra.

Probavu ugljikohidrata započinje amilaza sline. Nakon gutanja, amilaza nastavlja djelovati pola sata do sat vremena nakon što stigne u želudac. Inaktivira se uslijed niskog pH u želučanom mediju. Amilaza sline može probaviti i do 50% škroba u hrani. Probavni sokovi

gušterače sadrže drugu α -amilazu koja se izlučuje u duodenumu kada je probavljena hrana iz želuca prisutna u probavnom sustavu. Pankreasna amilaza, koje ima u većoj koncentraciji nego amilaze sline, nastavlja probavu škroba i glikogena u tankom crijevu (Smith i Morton, 2010).

Izoenzimi amilaze sline i gušterače pokazuju različite afinitete prema supstratu škroba i oligosaharida. Izoenzimi amilaze u slini mogu bolje probaviti škrob iz krumpira, nego škrob iz kukuruza, dok amilaza iz gušterače brže probavlja škrob iz kukuruza, nego škrob iz krumpira. Također se navodi da je izoenzim iz sline aktivniji kod supstrata škroba koji su topljivi u vodi, dok izoenzimi iz gušterače su aktivniji kod netopljivih oblika škroba (Zakowski i Bruns, 1985).



Slika 5. Struktura α -amilaze (Anonymous 3, 2020)

Kod čovjeka i drugih sisavaca pronađena su dva različita, ali usko povezana gena koji kodiraju za amilazu u slini i amilazu u gušterači. Gen u slini, AMY1, proizvodi amilazu u slini i žlijezdama slinovnicama dok AMY2 proizvodi enzime amilaze koji se sintetiziraju u gušterači i izlučuju u duodenum zajedno s probavnim sokovima (Groot i sur., 1989).

AMY1 gen i aktivna amilaza se mogu pronaći u slini i želučanom lavatu nedonoščadi, a razina dodatno raste s gestacijskom dobi od 26 do 42 tjedna. Koncentracija pankreasne amilaze je minimalna dok god se dijete doji (Hodge i sur., 1983).

Rengenska kristalografija se koristi za dobivanje 3D strukture enzima i pokazala je da su amilaza u slini i amilaza u gušterači vrlo slični. Amilaze sisavaca se sastoje od 3 strukturalne domene od kojih je najveća domena A i koja sadrži važna aktivna mjesta koja uključuju dva aspartatna i jedan glutamatni ostatak. A domena sadrži kloridni ion koji je potreban za aktivaciju amilaze. Domena B graniči s aktivnim mjestom i sadrži vezan Ca^{2+} ion koji je bitan za održavanje konformacije proteina u području aktivnog mjesta. Domena C u području N-terminalnog kraja ima direktnu ulogu u katalitičkim mehanizmima. Katalitički događaji u amilazi su primjeri mehanizma dvostrukog istiskivanja, dok karboksilne skupine aspartata i glutamata djeluju kao acido/bazni katalizatori i kao nukleofilni reaktanti za formiranje kovalentnog intermedijera tijekom katalitičkog niza (Butterworth i sur., 2010).

Kod osoba koje su pretile, visoke koncentracije glikogena su hidrolizirane amilazom slin i gušterače zbog čega dolazi do povećane koncentracije glukoze u krvi. Studije su pokazale da i jetrena amilaza ima potencijalnu ulogu u metabolizmu glikogena s obzirom da ima visoki afinitet prema njemu. U dijabetesu tipa 2 i metaboličkim bolestima kao što su pretilost, dolazi do povećane koncentracije glukoze u krvi. Razmišljajući o tome dolazimo do zaključka da inhibicija amilaze može sprječati hidrolizu škroba i oligomera. Inhibitori amilaze na taj način mogu odgoditi apsorpciju glukoze u probavnom sustavu, a time i povećanje razine glukoze u krvi. S obzirom na navedeno, inhibitori amilaze mogu poslužiti kao metoda kontroliranja postprandijalne razine glukoze u krvi, a time i regulaciji šećerne bolesti i ostalih metaboličkih poremećaja (Afsartala i sur., 2016).

Brojna istraživanja se bave otkrivanjem na koji način polifenoli mogu imati utjecaja u liječenju šećerne bolesti. Jedan od mehanizama polifenola je inhibicija α -amilaze čime se smanjuje apsorpcija glukoze, a time i povećana koncentracija glukoze u krvi.

Rasouli i suradnici (2017) su proveli istraživanje kojim su htjeli pokazati na koji način polifenoli mogu inhibirati α -amilazu. Kao metodu su koristili metodu molekularnog pristajanja koja se vrlo često koristi u farmaceutskoj industriji za dizajniranje lijekova zbog toga što ima sposobnost vrlo precizno predvidjeti mjesto vezanja i niskomolekularne ligande koji će se vezati na to mjesto. Potvrđeno je da se polifenoli iz hrane vežu na α -amilazu na određenim mjestima i na taj način sprječavaju cijepanje škroba na glukoze jedinice koje se potom apsorbiraju u krvotok. Algoritam molekularnog pristajanja otkrio je da kafeinska kiselina (hidroksicimentna kiselina), kurkumin, cijanidin (antocijanidini), daidzein (izoflavoni), epikatehin (flavan-3-oli), eriodictiol (flavanoni), ferulinska kiselina (hidroksicimetna kiselina), hesperetin (flavanon), narenginin (flavanon), pinosresinol (lignan), kvercetin (flavonol), resveratrol (stilben) i siringinska kiselina (hidroksibenzojeva kiselina)

pokazuju visoki afinitet za vezanje i interakciju sa aktivnim mjestom α -amilaze. Istraživanje je pokazalo da navedene komponente imaju veliki potencijal za inhibiranje α -amilaze i kao pomoć u regulaciji povišene koncentracije glukoze u krvi.

2.6. PRODUKTI OKSIDIRANIH PROTEINA (AOPP)

Kronična hiperglikemija kod dijabetesa inducira oksidaciju i glikozilaciju mnogih biološki važnih molekula. Glikozilacija i oksidacija su procesi poznatiji pod nazivom glikooksidacija. Glikooksidacijski proteinski produkti uzrokuju oštećenja lipida, DNA, membrana i endotela (Piwowar i sur., 2008).

Sve te strukturalne promjene uzrokuju abnormalnosti u funkcijama makromolekula, te dolazi do njihovog nakupljanja. Pretpostavka je da produkti glikooksidacije su glavni uzrok nastanka vaskularnih komplikacija kod dijabetesa (Abou-Seif i Youssef, 2004).

Napredni oksidirani proteinski proizvodi (AOPP) su otkriveni 1996. godine i oni su biomarkeri oksidativnog stresa, odnosno proteini koji su oštećeni zbog oksidacijskog stresa. U tome procesu najviše oštećeni bivaju albumini i njegovi agregati. AOPP-i sadrže velike količine ditirozina, koji omogućuje mrežno povezivanje sa disulfidnim mostovima i karbonilnim skupinama. AOPP-ovi primarno nastaju od radikala koji sadrže klor, uključujući hipokloritnu kiselinu i kloramine koji su rezultat mijeloperoksidazne aktivnosti (Krokmaz i sur., 2013).

Korelacija između AOPP-a i monocita je pokazala da AOPP nije samo marker oksidativnog stresa, već i marker upalnog odgovora zbog indukcije proupalnih citokina i adhezivnih molekula uslijed prisutnosti AOPP-a (Kural i sur., 2011).

Albumin je multifunkcionalni protein koji održava odgovarajući onkozni tlak i transport bilirubina, kolesterola, masnih kiselina, aminokiselina, hormona, metalnih iona i ostalih liganda i lijekova koji se unose. On je također vrlo bitan ekstracelularni antioksidans, predominantan antioksidans u krvnoj plazmi. Više od 70% slobodnih radikala u serumu se neutralizira posredstvom albumina (Bourdon i Balche, 2001).

Povišene razine AOPP-a su identificirane kod pacijenata s koronarnom arterijskom bolesti, nedonoščadi, hipoksične dojenčadi, pacijenata s dijabetesom i sistemskom sklerozom, kod pacijenata koji su kritično bolesni, reumatske bolesti, prvom i drugom tromjesječu trudnoće, kolorektalnom raku i akutnoj mijeloičnoj leukemiji (Selmeçi, 2011).

Podaci su pokazali da jetra i slezena imaju veliku ulogu u eliminaciji AOPP-a (Iwao i sur., 2006).

Descamps-Latscha i suradnici (2005) su zamijetili statistički značajnu korelaciju između AOPP u plazmi i koncentracije fibrinogena kod pacijenata s kroničnim zatajenjem bubreg.

Strugala i suradnici (2019) su ispitali kako ekstrakt plavog krumpira (blue congo), odnosno polifenolni spojevi iz ekstrakta, utječu na oksidativni stres i razinu AOPP-a. Zaključili su da je korištenjem polifenola iz ekstrakta plavog krumpira došlo do povećanja koncentracije GSH i aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, CAT, GPx) u leukocitima. Također je zamijećeno da se smanjila koncentracija AOPP-a kao i modificiranih oksidacijskih proteina u krvnoj plazmi štakora nakon administracije ekstrakta plavog krumpira. Ove aktivnosti su bile povezane s antidijabetičnim učincima, što se dokazalo i smanjenom koncentracijom glukoze u krvi i koncentracijom gliciranog hemoglobina kod dijabetičnih štakora, nakon primjene ekstrakta.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. KEMIKALIJE

- NaOH – Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Na₂CO₃ - Kemika, Zagreb, Hrvatska
- CuSO₄·5H₂O - Kemika, Zagreb, Hrvatska
- K, Na – tartarat - Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Folin-Ciocalteu reagens - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- Aloksan-monohidrat - Sigma Chemical, St. Louis, SAD
- KIT za određivanje α -amilaze (Plate Reader) - ab102523 Amylase Assay kit, Colorimetric, Abcam, SAD
- KIT za određivanje inzulina (Plate Reader) - Mouse INS(Insulin) ELISA Kit, Elabscience, SAD
- KIT za određivanje oksidacije proteina AOPP (Plate Reader) - Mouse Advanced oxidation protein products (AOPP), ELISA Kit, My Biosource, San Diego, SAD

3.2. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH POLIFENOLA U EKSTRAKTU CVIJETA TRNINE PRIMJENOM UPLC UZ MS/MS DETEKCIJE (ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY - TANDEM MASS SPECTROMETER)

Izvor biljnog materijala, priprema vodenog ekstrakta cvijeta trnine, proces mikrovalne detekcije, mjerenje ukupnih i pojedinačnih koncentracija polifenola detaljno su opisani u radu Lovrić i sur. (2017).

Za analizu kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja ukupnih polifenola, volumenu od 250 μ L razrijeđenog uzorka ekstrakta je dodano 0,25 mL HCl-a ($1,0 \text{ g L}^{-1}$) i 4,55 mL HCl-a ($2,0 \text{ g L}^{-1}$). Apsorbancija smjese mjerena je pri $\lambda = 360 \text{ nm}$.

Mjerenje koncentracija pojedinačnih polifenolnih spojeva opisana su u prethodno navedenim radovima uz promjenu korištenja metode mjerenja. U ovom istraživanju korištena je sofisticiranija metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (UPLC) uz MS/MS detekciju (Ganguly i sur. 2016).

Tablica 1. UPLC MS/MS analiza polifenolnih spojeva u ekstraktu cvijeta trnine primjenjenih u prehrani miša C57BL/6

Polifenoli iz ekstrakta cvijeta trnine (ECT)				Ukupni polifenoli (mg 100 g ⁻¹) suhog cvijeta trnine	
Br.	Ime spoja	RT	m/z	m/z (prod.)	Koncentracija pojedinih polifenolnih spojeva (mg100 g ⁻¹) u suhom cvijetu trnine
1	kafeinska kiselina	4,387	179	135	34,32
2	3- <i>O</i> -kafeoil kininska kiselina (neoklorogenska kiselina)	3,979	353	191	192,00
3	4- <i>O</i> -kafeoil kininska kiselina	4,444	353	173	24,04
4	klorogenska kiselina	3,776	353	191	55,47
5	<i>p</i> -kumarinska kiselina	5,764	163	119	23,67
6	3- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	3,507	337	163	216,00
7	4- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	5,181	337	173	61,53
8	ferulinska kiselina	6,427	193	134	8,69
9	3- <i>O</i> -feruloil kininska kiselina	4,043	367	193	132,2
10	galna kiselina	1,245	169	125	1,75
11	(+)-katehin	3,796	291	139	85,67
12	(-)-epikatehin	4,829	291	139	70,16
13	(-)-epikatehin-3-galat	6,583	443	139	0,51
14	(-)-epigalokatehin-3-galat	4,98	459	139	0,15
15	izoramnetin-3-rutinozid	7,355	625	317	4,68
16	kampferol-3-rutinozid	6,216	595	287	51,84
17	kampferol-acetil-rutinozid	9,402	637	287	0,68
18	kampferol-pentozil-heksozid	7,291	581	287	50,27
19	kampferol-pentozid	8,234	419	287	494,94
20	kampferol-ramnozid	7,166	433	287	436,62
21	kampferol-acetil-heksozid	11,29	491	287	0,92
22	kampferol-ramnozil-heksozid	8,064	595	287	49,79
23	kampferol-3-glukozid	7,489	449	287	0,60
24	apigenin	11,16	271	153	3,23
25	luteoiln	9,8	287	153	6,68
26	kvercetin-3-rutinozid (rutin)	6,448	611	303	82,35
27	kvercetin-acetil-rutinozid	8,596	653	303	3,18
28	kvercetin-3-glukozid	6,737	465	303	31,29
29	kvercetin-pentozid	7,396	435	303	226,75
30	kvercetin-acetil-heksozid	5,096	507	303	2,34
31	kvercetin-ramnozid	7,557	449	303	81,15
32	kvercetin-pentozil-heksozid	6,605	597	303	56,81

3.3. ANALIZA ŠEĆERA U EKSTRAKTU CVIJETA TRNINE HPLC METODOM

Šećeri su istovremeno analizirani izravnim ubrizgavanjem ekstrakta, prethodno filtriranog kroz membranski filter veličine 0,45 μm (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Njemačka). Kromatografsko odvajanje izvedeno je HPLC analizom s Agilent 1260 četverokutnim LC Infinity sustavom (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD)

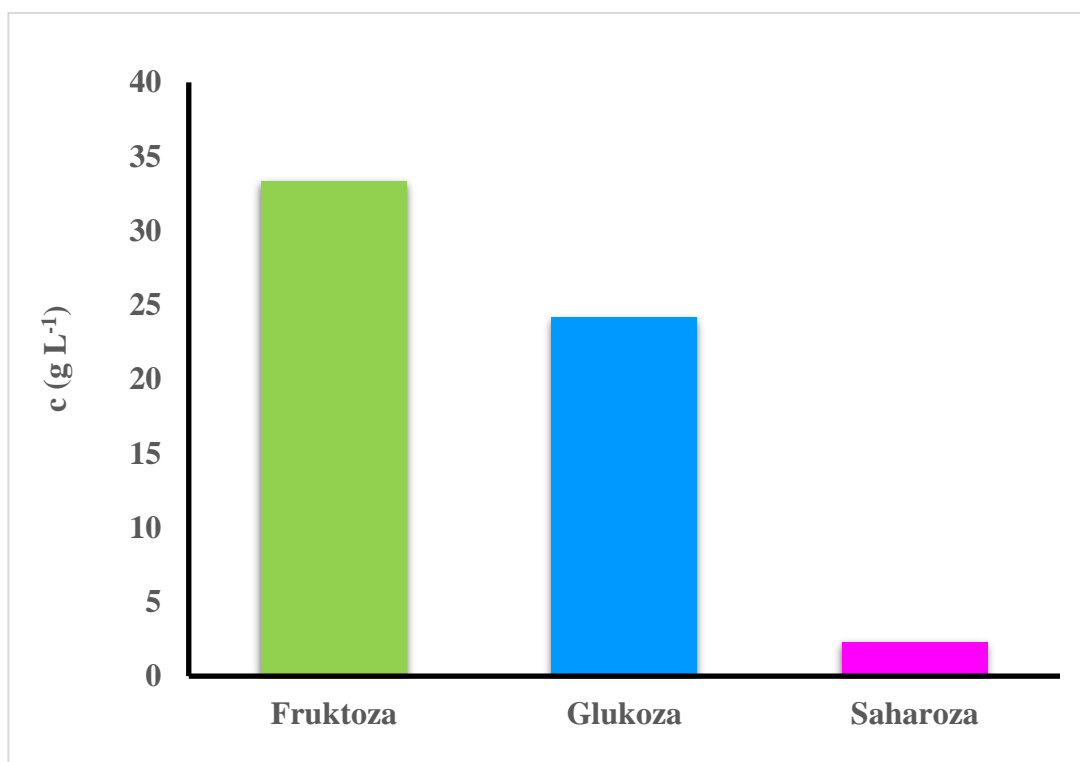
opremljenim detektorom refrakcije indeksa (RI), automatskim ubrizgavačem i softverom ChemStation.

Razdvajanje šećera (fruktoza, glukoza i saharoza) provedeno je na Cosmosil-5C18, Sugar-D (250 × 4,6 mm i.d.) stupcu (Naclai Tesque, Inc., Kyoto, Japan). Sastav otapala i korišteni gradijentni uvjeti prethodno su opisali Bogdanov i Baumann (1988). Za izokratsku eluciju, pokretna faza A sadržavala je 80% acetonitrila u vodi. Radni uvjeti su bili: konstantna brzina protoka 1,3 ml / min u 20 minuta, temperatura stupca 30 ° C, volumen ubrizgavanja bio je 10 µL i vrijeme ravnoteže 2 minute.

Detekcija je provedena pomoću detektora refrakcije. Identifikacija šećera izvršena je usporedbom retencijskih vremena autentičnih normi (fruktoza, glukoza i saharoza).

Kvantifikacija šećera izrađena je metodom vanjskog standarda. Svi standardi za šećer su otopljeni metanol u koncentraciji od 50 mg L⁻¹. Standardne otopine za radni šećer pripremljene su razrjeđivanjem početne otopine, čime se dobivaju prve koncentracije u rasponu od 1 do 50 mg / L.

Kvantitativno određivanje provedeno je korištenjem kalibracijskih krivulja standarda fruktoze: $y = 70684x + 4030$, $R^2 = 0,99$; glukoze: $y = 72170x + 6655,3$, $R^2 = 0,99$; i saharoze: $y = 71630x + 1199,3$, $R^2 = 0,99$



Slika 6. HPLC analiza šećera u ekstraktu cvijeta trnine (ECT)

Na slici 6 je prikazana HPLC analiza šećera u ekstraktu cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.). Analiza šećera je pokazala da je sastav ekstrakta cvijeta trnine kako slijedi: Fruktosa: $c = 33.322 \text{ g L}^{-1}$; Glukoza: $c = 24.144 \text{ g L}^{-1}$; Saharoza: $c = 2.306 \text{ g L}^{-1}$.

3.4. 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 držane u slijedećim uvjetima: 12 sati svijetla i 12 sati tame pri 22°C i 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. Životinje su hranjene komercijalno dostupnom hranom koja je životinjama bila dostupna *ad libitum*.

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

3.4.1. Indukcija (izazivanje) hiperglikemije u C57BL/6 miša

Aloksan-monohidrat za indukciju hiperglikemije u C57BL/6 miša 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.

3.4.2. Eksperimentalne grupe životinja

Eksperimentalne grupe su činile četiri grupe životinja:

- K – Kontrolna grupa ($0,3 \text{ mL}$ fiziološke otopine),
- ECT – ekstrakt cvijeta trnine – *Prunus spinosa* L. ($25 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dan}^{-1}$),
- AL – aloksan (Aloksan-monohidrat 150 mg kg^{-1} tjelesne mase),

- AL+ECT – ekstrakt cvijeta trnine + aloksan

Životinje su žrtvovane 10.-ti dan pokusa te su uzeti krv i organi jetre i bubrega za daljnju analizu. Životinje su anestetizirane eterom te su iskrvarene punkcijom iz srca bez antikoagulansa. Bubrezi i jetre su izolirani iz životinja odmah nakon skupljanja uzorka krvi. Izvagani su, zabilježena je masa i potom su pohranjeni na -80°C za daljnju analizu.

3.4.3. Priprema tkiva (jetra, bubreg) za određivanje glikemijskih učinaka

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 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ i otopina (b) 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 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°C .

3.5. ODREĐIVANJE PROTEINA METODOM PO LOWRY-U

Sadržaj proteina u serumu i 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-Ciocalteu reagens) sa aromatičnim aminokiselinama proteina.

Priprema otopina - Reagens A: 2% Na_2CO_3 u 0.1 M NaOH; reagens B: 0.5 % $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 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.

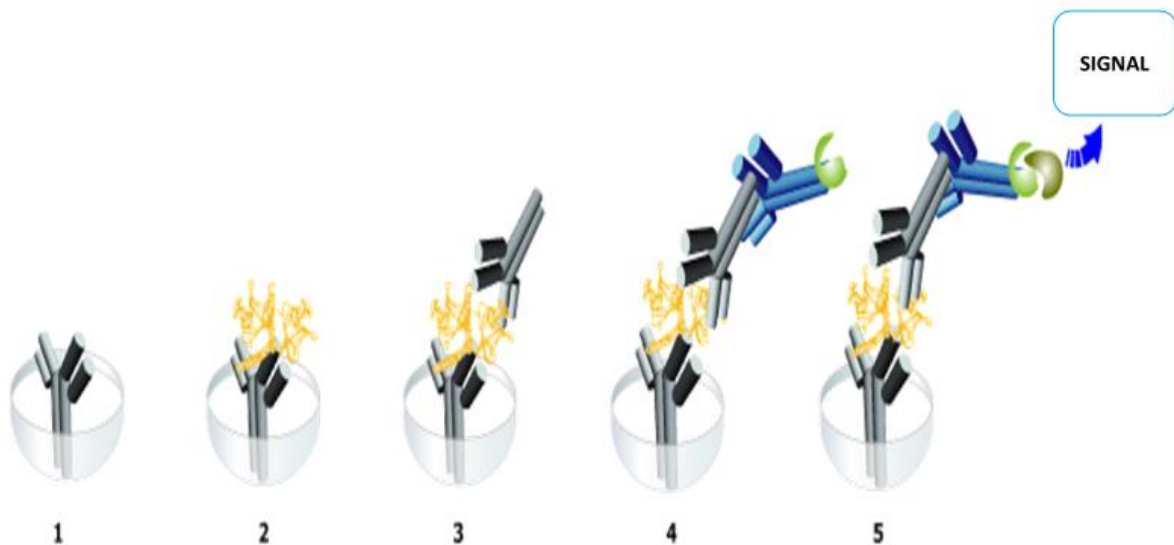
Postupak - Kako bi se mogla odrediti koncentracija proteina, potrebno je konstruirati baždarni dijagram, tj. dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina. Prema niže opisanom postupku provest će se mjerenje sa različitim koncentracijama proteina u rasponu od 5 do 100 mg mL^{-1} . U epruvete 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 temperaturi 40 do 60 minuta. Slijepa proba umjesto otopine proteina sadrži 0,1 mL destilirane vode. Nakon što izmjerimo vrijednost $A = 600 \text{ nm}$ koncentraciju proteina odredimo pomoću baždarnog dijagrama

3.6. ODREĐIVANJE PRODUKTA OKSIDACIJSKIH PROTEINA (AOPP) U HOMOGENATU TKIVA JETRE I BUBREGA

Određivanje produkata oksidacijskih proteina u ovom radu ja napravljena pomoću Elisa kit-a (Elisa, cat.no: MBS263319, MyBioSource, San Diego, SAD) koji se bazira na tehnici dvostrukih protutijela.

Imunoenzimskim ELISA testom (engl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA) se određuje prisutnost i količina antigena. Reakcija ELISA se temelji na vezanju antitijela i antigena iz uzorka te spektrofotometrijskom mjerenju nastale reakcije, do koje dolazi zbog promjene boje.



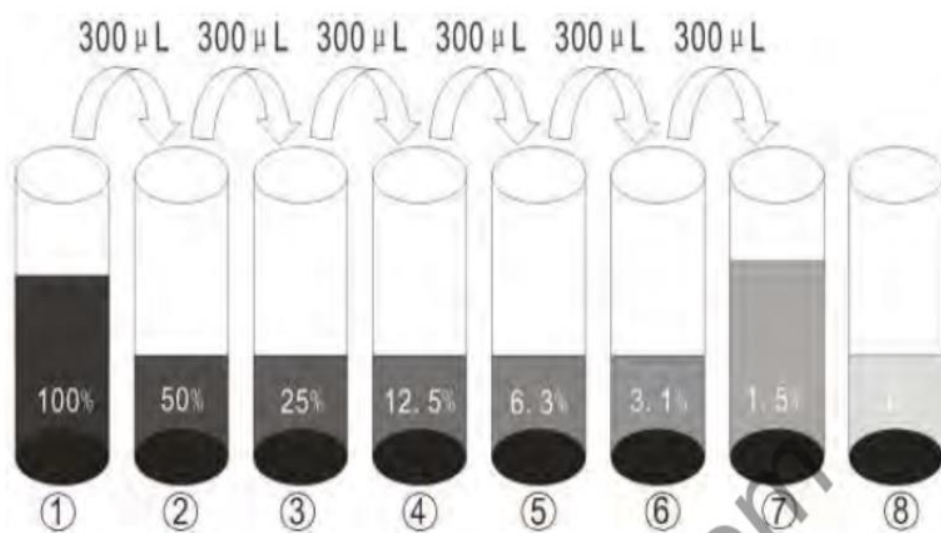
Slika 7. Shematski dijagram za Mouse AOPP ELISA kits (Anonymus 4, 2020)

"Sendvič" ELISA mjeri količinu antigena između dvaju slojeva antitijela (hvatanje i detekcija antitijela) (slika 7). Antigen koji se određuje mora sadržavati najmanje dva antigenska mjesta sposobna za vezanje na antitijela, jer najmanje dva antitijela djeluju u "sendviču". Antigen se prvo hvata, a zatim detektira. Specifično antitijelo koje hvata ciljani

antigen veže se za površinu čvrstog nosača (mikrotitarske ploče). Uzorak se dodaje u jažicu i ukoliko je ciljani antigen prisutan on će se vezati za antitijela. Nakon ispiranja i uklanjanja nevezanog materijala, u jažice se dodaju druga antitijela s vezanim enzimom kao markerom koja će se ponovno vezati za antigen i napraviti sendvič antitijela. Ponovno slijedi ispiranje da se uklone nevezana antitijela, a nakon toga dodavanje bezbojnog supstrata koji će enzim prevesti u obojeni produkt. Na kraju se dodaje otopina za inaktivaciju enzima da se spriječi daljnja aktivnost i promjene boje koja se mjeri.

3.6.1. Priprema otopina

1. **Koncentrirana otopina pufera za pranje:** razrijediti sa destiliranom vodom u omjeru 1:25
2. **Mišji AOPP liofilizirani standard:** dodati 1,0 mL u Mišji AOPP liofilizirani uzorak i ostaviti da stoji 30 minuta. Nakon što se uzorak potpuno otopio, lagano promiješajti i napraviti razrijeđenja za standardnu krivulju: 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 ng mL⁻¹).
 - **Razrjeđenje standardnog uzorka:** pripremiti sedam epruveta i označiti ih. Dodati 300 μL standardnog uzorka u svaku epruvetu. Pipetirati 300 μL otopine iz prethodne epruvete u svaku slijedeću prema ovim koracima. Posljednja epruveta se smatra negativnom kontrolom (slika 8).



Slika 8. Shematski prikaz razrijeđenja standardnog uzorka AOPP (Anonymous 5, 2020)

- 3. Biotinilirana mišja AOPP tekućina s antitijelima:** otapalo s antitijelima razrijediti s koncentriranim biotiniliranim antitijelima (1:100).
- 4. Otopina enzim-konjugat:** koncentrirani enzim-konjugat razrijediti sa otapalom enzim-konjugat (1:100).
- 5. Reagens za boju:** reagens u boji A pomiješati s reagensom u boji B u omjeru 9:1.

3.6.2. Postupak

Pripremiti biotiniliranu otopinu s antitijelima 30 minuta unaprijed. Oprati Elisa pločicu dva puta. U svaku jažicu dodati 100 μ L biotinilirane otopine s antitijelima. Reakcijske jažice zalijepiti vrpcama i inkubirati 60 minuta na 37°C. Pripremiti otopinu enzim-konjugat 30 minuta unaprijed. Oprati Elisa pločice tri puta. Dodati otopinu enzim-konjugata u svaku jažicu, osim onih namijenjenih za slijepu probu. Reakcijske jažice zalijepiti vrpcama i inkubirati 30 minuta na 37°C. Oprati Elisa pločice pet puta. Dodati 100 μ L reagensa za boju C u svaku jažicu, promiješati te očitati apsorbanciju na 450 nm unutar 10 minuta.

3.7. ODREĐIVANJE α -AMILAZE U SERUMU

Određivanje α -amilaze u serumu se vrši pomoću kompleta za ispitivanje amilaze (Amylase Assay Kit, ab102523, abcam, Cambridge, UK) gdje se određuje aktivnost α -amilaze u dva koraka. α -amilaza će rascijepati supstrat etiliden-pNP-G7 na manje fragmente koji su eventualno modificirani β -glukozidazom. To dovodi do oslobađanja kromofora koji se može izmjeriti kolorimetrijski pri 405 nm.

3.7.1. Priprema otopina

- 1. Pufer za ispitivanje amilaze:** dolazi s kompletom, odmah spreman za upotrebu. Potrebno podesiti na sobnu temperaturu prije primjene.
- 2. Amilazna supstratna mješavina:** dolazi s kompletom, odmah spreman za upotrebu. Tijekom ispitivanja potrebno ga je držati na ledu.
- 3. Pozitivna kontrola α -amilaza:** otopiti pozitivnu kontrolu u 50 μ L pufera za ispitivanje.
- 4. Nitrofenolni standard (2mM):** dolazi s kompletom, odmah spreman za upotrebu.

5. Standardna otopina: koristeći 2 mM nitrofenolni standard pripremiti razrijeđenja za standardnu krivulju kako je opisano u tablici:

Tablica 2. Priprema razrijeđenja 2 mM nitofenola za standardnu krivulju

Standard	Volumen standarda (μL)	Volumen pufera (μL)	Konačni volumen standarda u jažici (μL)	Koncentracija nitrofenola u jažici (nmol)
1	0	150	50	0
2	6	144	50	4
3	12	138	50	8
4	18	132	50	12
5	24	126	50	16
6	30	120	50	20

3.7.2. Priprema uzorka (serum)

Uzorci seruma mogu se testirati izravno dodavanjem uzoraka u jažice mikropločice. Za optimalne rezultate i mjerenja, preporučuje se razrijediti uzorak (1/2, 1/5, 1/10).

3.7.3. Postupak

Ukupni volume reakcijske smjese iznosi 100 μL. U jažice za pozitivnu kontrolu dodati 5 μL pozitivne kontrole amilaze i nadopuniti sa ddH₂O do 50 μL. U jažicama namijenjenima uzorcima dodati 2-50 μL uzorka, te ako je potrebno dodati ddH₂O da se postigne volumen od 50 μL. Reakcijska smjesa se priprema za svaku reakciju zasebno miješanjem 50 μL pufera za ispitivanje i 50 μL supstratne smjese. U svaku jažicu potom dodati 100 μL reakcijske smjese i dobro promiješati. Odmah mjeriti apsorbanciju pri 405 nm svakih 2-3 minute tijekom 30-60 minuta na 25°C, zaštićeno od svjetla.

3.8. ODREĐIVANJE INZULINA U SERUMU

Određivanje inzulina u serumu se vrši pomoću Elisa kit-a (Mouse INS (Insulin) ELISA Kit, cat.no: E-EL-M2614, Elabscience, Hubei, Wuhan, China). Ovaj ELISA kit primjenjuje se za *in vitro* kvantitativno određivanje koncentracije INZULINA u serumu miša. Osjetljivost testa je 0.19 ng mL^{-1} , a raspon detekcije je $0,31\text{-}20 \text{ ng mL}^{-1}$.

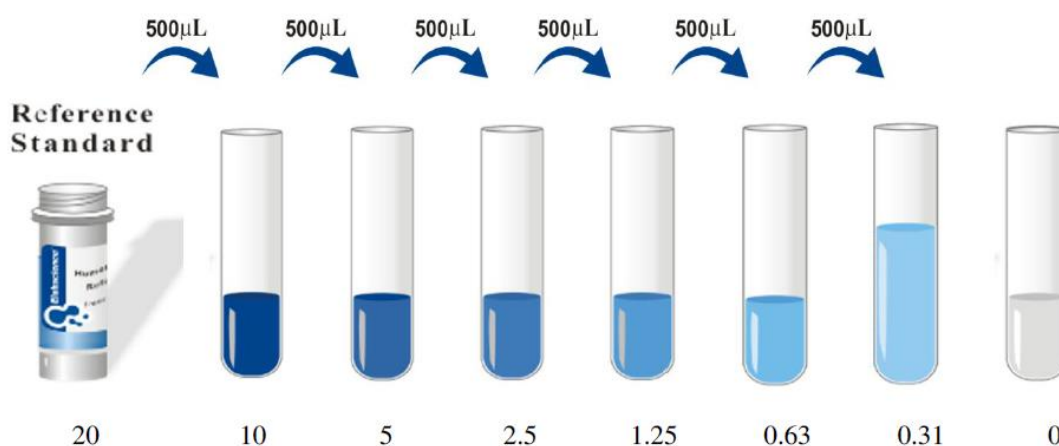
Ovaj ELISA kit koristi Sandwich-ELISA princip. Mikro ELISA pločica koja se nalazi u ovom kompletu je prethodno obložena antitijelima specifičnim za mišji inzulin. Standardi ili uzorci dodaju se u jažice mikro ELISA pločice i kombiniraju se sa specifičnim antitijelima. Zatim se biotinizirana antitijela za detekciju specifična za mišji inzulin i konjugat peroksidaze Avidin (HRP) dodaju uzastopno u svaku jažicu mikro pločice i inkubiraju. Slobodne komponente se ispiru. Otopina supstrata se doda u svaku jažicu. Samo one jažice koje sadrže mišji inzulin, biotinizirana antitijela za detekciju i Avidin-HRP konjugat će izgledati plave boje.

Reakcija enzim-supstrat se završava dodavanjem otopine za zaustavljanje reakcije i boja postaje žuta. Optička gustoća (OD) mjeri se spektrofotometrijski na valnoj duljini od $450 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$.

Vrijednost OD je proporcionalna koncentraciji mišjeg inzulina.

3.8.1. Priprema otopina

1. **Pufer za ispiranje:** razrijediti 30 mL koncentriranog pufera za ispiranje sa 720 mL deionizirane ili destilirane vode.
2. **Standardna radna otopina:** centrifugirati standard na 10000 rpm tijekom 1 minute. Dodati 1,0 mL referentnog standarda i razrjeđivač uzorka. Pustiti da odstoje 10 minuta uz povremeno nježno miješanje. Ova radna otopina ima koncentraciju od 20 ng/mL . Preporučeni gradijent razrjeđenja: 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, $0.31, 0 \text{ ng mL}^{-1}$.
 - **Razrjeđenje standardnog uzorka:** Pripremiti sedam epruveta i dodati $500 \mu\text{L}$ referentnog standarda i razrjeđivača uzorka u svaku epruvetu. Pipetirati $500 \mu\text{L}$ radne otopine 20 ng mL^{-1} u prvu epruvetu te promiješati kako bi se dobila radna otopina od 10 ng mL^{-1} . Pipetirati $500 \mu\text{L}$ otopine iz prethodne epruvete u svaku slijedeću prema ovim koracima (posljednja epruveta se smatra slijepom probom) (slika 9):



Slika 9. Shematski prikaz razrijeđenja standardnog uzorka za određivanje inzulina u serumu
(Anonymous 6, 2020)

3. **Radna otopina za biotiniliranu detekciju:** centrifugirati, razrijediti 100x koncentriranu radnu otopinu za biotiniliranu detekciju na 1x radnu otopinu s otopinom za biotiniliranu detekciju.
4. **Radna otopina koncentriranog HRP konjugata:** razrijediti 100x koncentrirani HRP konjugat na 1x radnu otopinu sa razrijeđenim koncentriranim HRP konjugatom.

3.8.2. Postupak

Dodati standardnu radnu otopinu u prva dva stupca. Dodati 100 µL uzorka u ostale jažice mikrotitarske pločice. Pokriti pločicu sa poklopcem i inkubirati 90 minuta na 37°C.

Ukloniti tekućinu iz svake jažice, ne ispirati. Dodati 100 µL radne otopine za biotiniliranu detekciju u svaku jažicu. Pokriti pločicu poklopcem, nježno promiješati i inkubirati 1 sat na 37°C.

Dekantirati otopinu iz jažica prislanjajući mikrotitarsku pločicu uz absorbirajući papir. U svaku jažicu dodati 350 µL pufera za ispiranje. Pustiti da se upija 1-2 minute, potom dekantirati otopinu iz jažica, osušiti ih čistim upijajućim papirom. Ponoviti ovaj korak tri puta.

Potom dodati 100 µL radne otopine HRP konjugata u svaku jažicu. Pokriti pločicu poklopcem i inkubirati 30 minuta na 37°C.

Dekantirati otopinu iz svake jažice i ponoviti proces pranja s puferom za ispiranje pet puta. Dodati 90 μL reagens za supstrat u svaku jažicu. Pokriti pločicu poklopcem, zaštititi od svjetla i inkubirati 15 minuta na 37°C .

Dodati 50 μL otopine za zaustavljanje reakcije u svaku jažicu. Očitati apsorbanciju na 450 nm.

3.9. ODREĐIVANJE GLUKOZE UKRVI (GUK)

Glukoza u krvi (GUK) je bitan biokemijski parametar u istraživanjima vezanima uz metabolizam ugljikohidrata, te dijagnosticiranje dijabetesa ili terapijsko praćenje bolesnika s hiperglikemijom.

Osim kod ljudi, glukometri se uobičajeno koriste za mjerenje glukoze u krvi na životinjskim modelima, posebno glodavcima (miš, štakor) zato što samo s nekoliko μL krvi se može vršiti mjerenje (Togashi i sur., 2016).

3.9.1. Priprema uzorka

Uzorak krvi za određivanje glukoze u krvi kod miševa se prikuplja tako da se oštrom iglom (lanceta) ubode rep miša, distalno od kosti, te se krv prikupi izravnim protokom. Uzorci krvi u svim skupinama su prikupljeni natašte, 24 sata nakon tretmana trinom i aloksanom i 10. dan ispitivanja. Dobivena vrijednost mjerenja iskazuje se u milimolima po litri krvi (mmol L^{-1}).

3.9.2. Postupak

U glukometar se stavi test trakica i uključi se glukometar. Na test trakicu se kapilarno aplicira uzorak krvi. Vrh za uzorak test trakice odvojiti od uzorka kada se oglasi zvučni signal na glukometru. Očitati mjerač i zapisati rezultat. Baciti test trakicu, umetnuti novu u glukometar te ponoviti korake za sve uzorke. Za svaki novi uzorak potrebna nova test trakica.

3.10. STATISTIČKA ANALIZA

Statistička analiza podataka napravljena je pomoću SPSS Statistics verzija 26 (IBM SPSS Inc, Chicago, IL). Dobiveni podaci izraženi su kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija srednje vrijednosti. Višestruka usporedba netretiranih i tretiranih skupina miševa napravljena je ANOVA analizom varijance. Interval pouzdanosti podešen je na $p < 0,05$. Post-hoc analize su napravljene koristeći Kruskal-Wallis ANOVA test kako bi ustanovili razlike između pokusnih grupa.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti na *in vivo* modelu normalnog i hiperglikemijskog C57BL/6 miša antioksidacijski učinak polifenola izoliranih iz cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) na biomarkere oksidacijskog stresa: razinu inzulina, α -amilaze, glukoze u krvi (GUK) i produkte oksidacije proteina (AOPP) kao pokazatelja oštećenja proteina u stanju hiperglikemije.

Sve je više dokaza da su komplikacije dijabetesa povezane s oksidacijskim stresom izazvanim stvaranjem slobodnih radikala. Slobodni radikali mogu dovesti do poremećaja staničnih funkcija i oksidacijskog oštećenja membrane. Oksidacijski stres je stanje promijenjene ravnoteže u oksidacijsko/antioksidacijskom statusu organizma u korist oksidacijskog stanja, koje može rezultirati oštećenjem tkiva i organa. Stanični sustav je sposoban neutralizirati nastale reaktivne oksidacijske čestice pri normalnim fiziološkim uvjetima. Mehanizmi uklanjanja uključuju katalitičko uklanjanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS-a) djelovanjem antioksidacijskih enzima ili neutralizacijom slobodnih radikala pomoću antioksidansa (koji djeluju kao "hvatači" slobodnih radikala).

Kod hiperglikemije je utvrđeno da je oksidacijski stres uglavnom posljedica povećane proizvodnje radikala bez kisika i velikog smanjenja antioksidacijske obrane. Dakle, spojevi s hipoglikemijskim i antioksidacijskim svojstvima mogu biti korisni antiglikemijski agensi.

α -amilaza iz gušterače ključni je enzim u probavnom sustavu i katalizira početni korak hidrolize škroba do maltoze i konačno glukoze. Razgradnja ovog dijetalnog škroba odvija se brzo i dovodi do povišene postprandijalne hiperglikemije. Dakle, retardacija razgradnje škroba inhibicijom enzima poput α -amilaze igrala bi ključnu ulogu u kontroli dijabetesa.

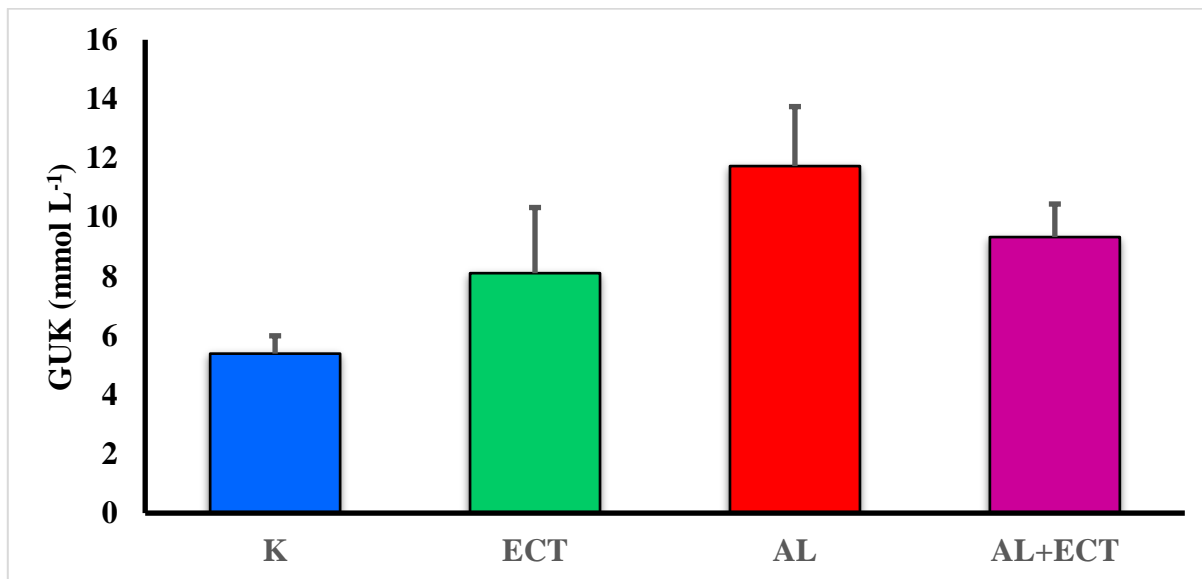
Hiperglikemiju karakteriziraju oštećenja stanica uzrokovanih upalnim i metaboličkim mehanizmima induciranim izmjenom redukcijско-oksidacijskog statusa. Produkti oksidacijskih proteina (AOPP) su proteini koji sadrže ditrozin i umreženi su proteini koji se nalaze u aterosklerotskim lezijama i potiču krvožilnu akumulaciju, aktivaciju monocita i endotelnu disfunkciju prekomjernom ekspresijom adhezijskih molekula. Produkti oksidacijskih proteina danas se smatraju novim markerima oštećenja proteina induciranih oksidacijskim stresom.

U dosadašnjim istraživanjima nema dostupnih i relevantnih znanstvenih radova o utjecaju polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine na oksidacijski stres i hiperglikemiju.

4.1. FIZIOLOŠKA REGULACIJA GLUKOZE U KRVI (GUK) NAKON KONZUMACIJE EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE U NORMALNOM METABOLIZMU I HIPERGLIKEMIJI (ALOKSANSKI MODEL)

Glukoza je najznačajniji izvor energije, potreban kako za mišićni rad, tako i za sve procese u organizmu, uključivši i rad mozga. Nakon unosa hranom u organizam i apsorpcije iz crijeva razinu glukoze u krvi regulira jetra, koja osigurava održavanje razine unutar precizno određenog raspona. Razina glukoze u krvi pokazuje fluktuacije kod svakog pojedinca koje ovise o tjelesnoj aktivnosti i vremenu proteklom od konzumiranja jela. Ove fluktuacije su dodatno povećane kod brojnih patoloških stanja kod kojih razina glukoze u krvi može biti povišena (hiperglikemija) ili smanjena (hipoglikemija).

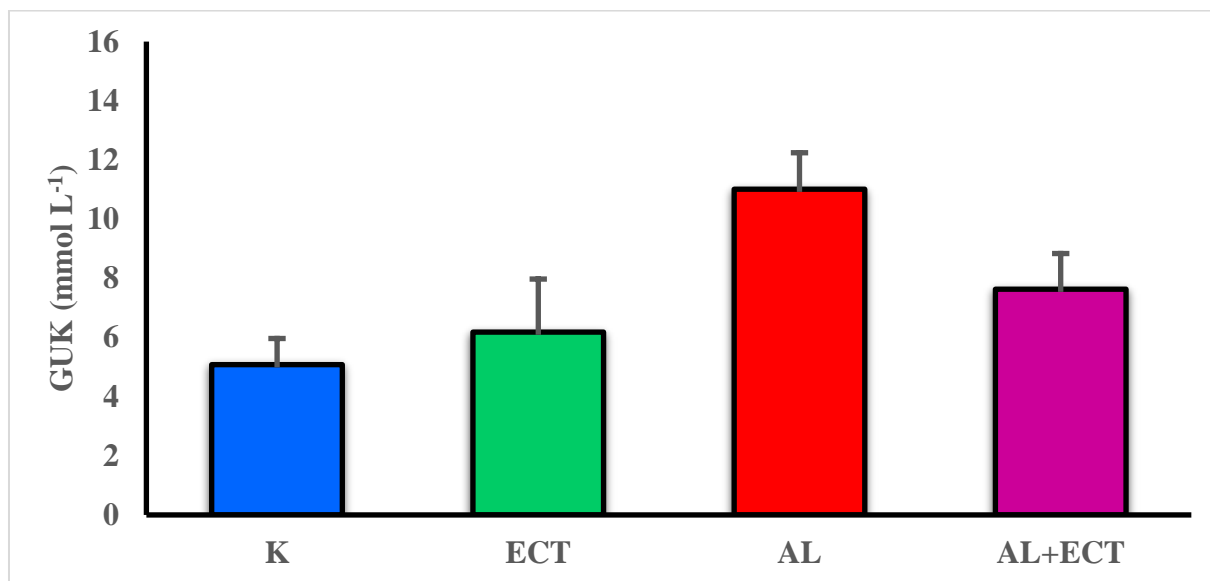
Hiperglikemija (eng. hyperglycemia) znači visoku (*hyper*) glukozu (*gly*) u krvi (*emia*). Određivanje razine glukoze u krvi je klinički značajno za dijagnozu i praćenje terapije dijabetesa. Povećane vrijednosti, naime, ukazuju na poremećaj metabolizma ugljikohidrata, čija je posljedica dijabetes. U tom slučaju glukoza ne može ući u stanice i tamo biti iskorištena pa ostaje u krvotoku, gdje i mjerimo povišenje njene razine.



Slika 10. GUK 1. dan, (mmol L⁻¹); K – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) 25 mg kg⁻¹ tjelesne mase, AL – aloksan 150 mg kg⁻¹ tjelesne mase, AL+ECT

Na slici 10. prikazani su rezultati mjerenja glukoze u krvi (GUK) C57BL/6 miša nakon 24 sata tretmana. Statistički je značajna razlika između: kontrolne (K) (5,39±0,603

mmol L⁻¹) i aloksanske skupine (AL) (11,73±2,011 mmol L⁻¹) ($p<0,0001$), te između K i ekstrakt cvijeta trnine (ECT) skupine (8,11±2,219 mmol L⁻¹) ($p=0,0406$). Najveću vrijednost GUK-a vidimo u AL skupini, gdje je izazvana hiperglikemija. Primijećen je i efekt sniženja GUK-a u AL+ECT skupini (9,33±1,118 mmol L⁻¹) u odnosu na AL skupinu. Skupina koja je tretirana sa ekstraktom cvijeta trnine (ECT) ima veće vrijednosti glukoze u krvi u odnosu na kontrolnu skupinu što je vjerojatno posljedica vezanih šećera na polifenole odnosno glikozide.



Slika 11. GUK 10. dan, (mmol L⁻¹); K – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) 25 mg kg⁻¹ tjelesne mase, AL – aloksan 150 mg kg⁻¹ tjelesne mase, AL+ECT

Na slici 11. prikazani su rezultati mjerenja glukoze u krvi (GUK) C57BL/6 miša nakon 10-og dana tretmana. Statistički je značajna razlika između kontrolne (K) (5,08±0,884 mmol L⁻¹) i aloksanske (AL) (11,01±1,233 mmol L⁻¹) skupine ($p<0,0001$) kao i između AL i AL+ECT (7,63±1,206 mmol L⁻¹) skupine ($p=0,0014$). Vrijednosti skupine koja je tretirana sa ekstraktom cvijeta trnine (ECT) (6,18±1,793 mmol L⁻¹) su nešto više u odnosu na K skupinu.

Mjerenje glukoze u krvi 10-og dana u odnosu na mjerenje GUK-a nakon 1-og dana ukazuju na to da su vrijednosti GUK-a 10-og dana mjerenja za skupinu AL+ECT niže u odnosu na AL skupinu vjerojatno zbog dugotrajnog konzumiranja ekstrakta cvijeta trnine (ECT) što ispoljava pozitivan efekt na glikemiju u C57BL/6 miša.

Ugljikohidrati su jedan od tri makronutrijenata zastupljenih u ljudskoj prehrani. Gradivne jedinice ugljikohidrata su ugljik, vodik i kisik. Imaju veliku ulogu u ljudskom tijelu

jer su primarni izvor energije za naše stanice, kontroli glukoze u krvi i metabolizmu inzulina. Sudjeluju u metabolizmu triglicerida i kolesterola. Ulaskom ugljikohidrata u probavni sustav započinje njihova probava, gdje probavni enzimi α -amilaza i α -glukozidaza cijepaju ugljikohidrate na glukozne jedinice koje se koriste za dobivanje energije. Višak glukoze u krvi se skladišti u jetri i mišićima te predstavlja izvor glukoze kada tijelo treba energiju. Pod pojmom ugljikohidrati obuhvaćeni su svi njihovi izvori odnosno, šećeri, voće, povrće, vlakna i leguminoze (Mills i sur. 2019).

Monosaharidi su najjednostavnije jedinice ugljikohidrata, a neki od primjera su glukoza i fruktoza. Disaharidi su sastavljeni od dvije monosaharidne jedinice, a primjer disaharida je saharoza. Monosaharidi i disaharidi su takozvani jednostavni ugljikohidrati koji se vrlo jednostavno iskorištavaju kao izvor energije, uzrokuju nagli porast glukoze u krvi i sekreciju inzulina.

Ulaskom u probavni sustav monosaharidi se direktno apsorbiraju u krvotok te dolazi do porasta glukoze u krvi i stimulacije gušterače na proizvodnju i izlučivanje inzulina. Inzulin signalizira stanicama da apsorbiraju glukozu za proizvodnju energije ili skladištenje. Ukoliko se smanji razina glukoze u krvi, gušterača proizvodi glukagon i stimulira jetru da oslobodi skladištenu glukozu (Maino Vieytes i sur., 2019).

Glukoza i fruktoza su u visokim koncentracijama zastupljeni u voću i povrću. Fruktoza je puno slađa od glukoze i saharoze, invertnog šećera koji sadrži jednake udjele glukoze i fruktoze te se prirodno nalazi u medu. Saharoza je glavni transportni oblik fotoasimiliranog ugljika i izvor je ugljikovih atoma i energije za biljne organe koji ne mogu vršiti fotosintezu. Kako bi biljke mogle koristiti ugljik unutar saharoze, on se u odgovarajućim tkivima pretvara u glukozu i fruktozu posredstvom glikozil transferaze koja saharozu u prisutnosti UDP-a pretvara u UDP glukozu i fruktozu ili invertaze koja stvara glukozu i fruktozu. Fruktoza se puno sporije apsorbira u probavnom sustavu nego glukoza i zbog toga ne uzrokuje nagli i veliki porast glukoze u krvi i izlučivanje inzulina.

Konzumacija šećera ekstrahiranih iz biljaka ili proizvedena hidrolizom polisaharida (npr. glukoza iz škroba) često se ne preporučuje u velikim količinama zbog dokazanog potencijalnog štetnog utjecaja na zdravlje (razvijanje metaboličkog sindroma, dijabetes tipa 2). Konzumacija šećera preko voća i povrća ne predstavlja zdravstveni problem zbog utjecaja ostalih kemijskih komponenti u namirnici. Unosom šećera iz voća i povrća, ne unosimo samo šećer, već i vodu, ostale makromolekule te razne biološki aktivne tvari koji utječu na porast glukoze u krvi i izlučivanje inzulina (Qi i Tester, 2019).

Povišena razina glukoze u krvi na tašte potencijalno je indikator preddijabetičnog stanja koje može dovesti do razvijanja dijabetesa tipa 2. Učestale hiperglikemije oštećuju stanice i aktiviraju inače relativno neaktivni put razgradnje glukoze do glukozamin-6-fosfata u kojem nastaju glikolipidi, glikoproteini i proteoglikani. Njegova aktivacija dolazi uslijed snižavanja razine adenozin trifosfata (ATP) u stanicama čime dolazi do inhibicije prijenosa inzulinskog signala. Time ne dolazi do aktivacije inzulinskog receptora koji bi kaskadnim reakcijama trebao aktivirati transportere glukoze. Transporteri glukoze ne transportiraju glukozu iz krvi u stanice čime dolazi do prevelike koncentracije glukoze u krvi i nemogućnosti započinjanja ciklusa glikolize (Falkoll i sur., 2004).

Koncentraciju glukoze u krvi možemo regulirati i na način da smanjimo apsorpciju glukoze iz hrane u probavnom sustavu. Glukoza koja se oslobađa probavom transportira se u stanice enterocita kroz četkastu membranu, a onda iz enterocita kroz bazolateralnu membranu u krv. S obzirom na to da su to fiziološki dvije različite membrane, na njima postoje različiti transportni proteini za glukozu. Na strani intestinalnog lumena nalazi se aktivni transporter SGLT1 (engl. Sodium-glucose cotransporters), odnosno Na⁺ glukoza simporter. Prilikom transporta glukoze iz lumena u enterocite, vežu se dva iona Na⁺ na SGLT1 te dolazi do promjene konfiguracije transportera čime se omogućuje transport glukoze. Time natrij i glukoza ulaze u enterocite gdje se potom glukoza pasivnim putem transportira iz enterocita putem GLUT2 transportera (engl. Glucose transporters) u krvotok. Kako bismo spriječili apsorpciju glukoze u krv, potrebno je inhibirati navedene transportne proteine. *In vitro* studije razjašnjavaju utjecaj polifenolnih spojeva na transportere glukoze promatrajući vezikule u četkastoj membrani i Caco-2 stanice (Hanhineva i sur., 2010).

Welsch i suradnici (1989) detektirali su da SGLT1 transporter ima smanjenu aktivnost u prisutnosti klorogenske, ferulinske, kafeinske i taninske kiseline, katehina iz čaja i naringenina. GLUT2 inhibiraju kvercetin, miricetin, apigenin i katehini iz čaja.

Manzano i Williamson (2010) su proveli istraživanje u kojem su dokazali utjecaj polifenolnih ekstrakata iz jagode i jabuke na apsorpciju glukoze kroz inhibiciju glukoznih transportera u enterocitima. U ekstraktu jabuke testirani polifenolni spojevi doprinijeli su s 85% inhibicijske aktivnosti. U ekstraktu jagode, samo pelargonidin-3-O-glukozid se mogao identificirati kao inhibitor i to s 26% inhibicijske aktivnosti. Rezultati istraživanja su pokazali da polifenolni ekstrakti jabuke i jagode u većoj mjeri inhibiraju GLUT2 transporter nego SGLT1 transporter. Konzumacijom polifenolnih spojeva, možemo utjecati na smanjenu koncentraciju glukoze u krvi. Upravo zbog tog razloga, kao pomoć u regulaciji

hiperglikemije, preporučuje se obilje voća i povrća oboljelima od dijabetesa tipa 2 i osobama s hiperglikemijom.

Crna soja, koja je bogata antocijanima (cijanidin-3-glikozid) i procijanidinima, smanjuje razinu glukoze u krvi i poboljšava osjetljivost na inzulin aktivacijom 5' adenozin monofosfat-aktivirana protein kinaza (AMPK) u mišićima i jetri miševa s dijabetesom tipa 2. Aktivacija tog enzima popraćena je pojačanom regulacijom transportera glukoze 4 (GLUT4) u mišićima i smanjenom glukoneogenezom u jetri kod miševa s dijabetesom tipa 2 (Kim i sur., 2016).

Koboyshi i suradnici (2000) dokazali su da polifenoli iz zelenog čaja (epigalokatehingat (EGCG) i epikatehingat (ECG) inhibiraju transport glukoze inhibicijom SGLT1 transportera, dok su Song i suradnici (2002) dokazali da flavonoidi imaju mogućnost inhibirati GLUT2 transporter.

Cimet i ekstrakti cimeta smanjuju razinu glukoze u krvi i usporavaju pražnjenje želuca nakon obroka. Manje od pola čajne žličice dnevno smanjuje razinu glukoze u krvi kod pacijenata s dijabetesom tipa 2.

Berberin (žutika) u dozi od 0,5 g 3 puta dnevno smanjuje razinu šećera u krvi jednako učinkovito kao metformin u 3 mjeseca. Konzumacija berberina značajno smanjuje razinu glukoze u krvi poslije obroka kod osoba s dijabetesom tipa 2 (Aryaein i sur., 2017).

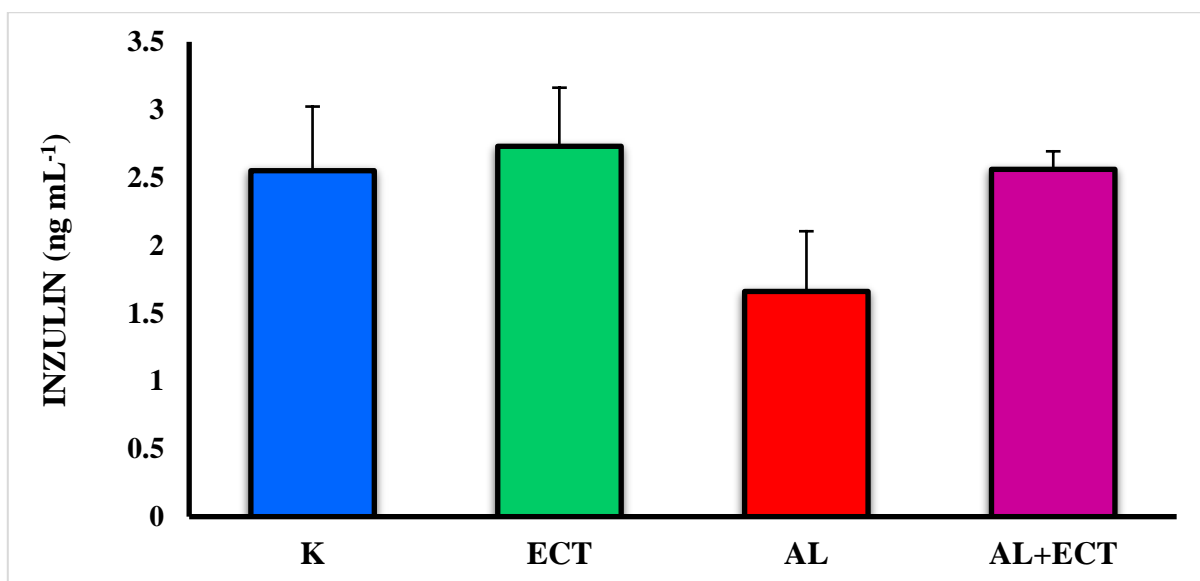
Uspoređujući aloksansku skupinu miševa (AL) i aloksansku skupinu tretiranu ekstraktom cvijeta trnine (AL+ECT) (slika 10, slika 11), može se uočiti da dugotrajnija primjena ekstrakta cvijeta trnine ima pozitivan utjecaj na smanjenje razine glukoze u krvi. Sva ova istraživanja dodatno potkrjepljuju kako i ekstrakt cvijeta trnine, koji obiluje polifenolnim spojevima (tablica 1), ima utjecaj na sniženje glukoze u krvi kod miševa kod kojih je izazvana hiperglikemija. Ova saznanja se mogu primijeniti i na ljude u kontroli bolesti. Polifenolni spojevi ekstrakta cvijeta trnine predstavljaju alternativan način liječenja koji bi mogao pomoći ljudima s hiperglikemijom kako bi na što neinvazivniji način i bez upotrebe lijekova mogli što bolje regulirati bolest.

4.2. FIZIOLOŠKA REGULACIJA INZULINA U SERUMU NAKON KONZUMACIJE EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE U NORMALNOM METABOLIZMU I HIPERGLIKEMIJI (ALOKSANSKI MODEL)

Hiperglikemija je poremećaj u kojem je razina glukoze (jednostavnog šećera) u krvi nenormalno visoka, jer tijelo ne otpušta ili ne rabi inzulin na odgovarajući način. Inzulin,

hormon koji luči gušterača, je prva tvar odgovorna za održavanje odgovarajuće razine krvnog šećera. Inzulin omogućuje glukozu da prijeđe u stanice tako da one mogu proizvesti energiju ili glukozu pohraniti dok nije potrebna. Porast razine krvnog šećera nakon jedenja ili pijenja potiče gušteraču da proizvodi inzulin sprječavajući tako veći porast razine šećera u krvi i uzrokujući postupno njezino padanje. Budući da mišići upotrebljavaju glukozu za stvaranje energije, razina šećera u krvi može padati i tijekom fizičke aktivnosti.

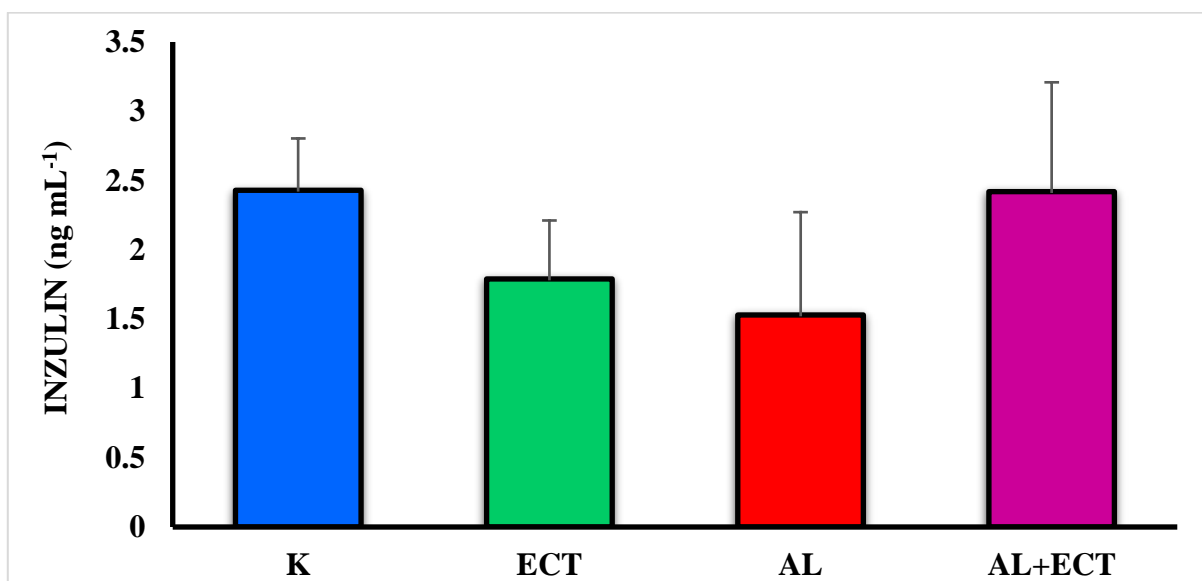
Vremenom, povišena razina krvnoga šećera oštećuje krvne žile, živce i druga tkiva. Složene tvari na temelju šećera ugrađuju se u stijenke malih krvnih žila dovodeći do njihova zadebljanja i propuštanja. Kako krvne žile zadebljavaju tako kožu i živce opskrbljuju sa sve manje krvi. Slabo kontrolirana razina šećera u krvi također uzrokuje povišenje razine masnih tvari u krvi što dovodi do ubrzane ateroskleroze (razvoja plakova u krvnim žilama). Ateroskleroza je oko dva do šest puta češća u dijabetičara nego u nedijabetičara, a pojavljuje se i u muškaraca i u žena. Slaba cirkulacija kroz velike i male krvne žile može oštetiti srce, mozak, noge, oči, bubrege, živce i kožu i usporava zacjeljivanje ozljeda.



Slika 12. Inzulin u serumu, 1. dan, (ng mL⁻¹). K – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) 25 mg kg⁻¹ tjelesne mase, AL – aloksan 150 mg kg⁻¹ tjelesne mase, AL+ECT

Na slici 12. prikazani su rezultati mjerenja inzulina u serumu C57BL/6 miša nakon 1-og dana tretmana. Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne (K) (2,55±0,473 ng mL⁻¹) i aloksanske (AL) (1,66±0,444 ng mL⁻¹) skupine ($p=0,0004$); između ekstrakta

cvijeta trnine (ECT) ($2,73 \pm 0,432 \text{ ng mL}^{-1}$) i AL skupine ($p=0,0002$), te između AL i AL+ECT ($2,56 \pm 0,133 \text{ ng mL}^{-1}$) skupine ($p=0,0005$).



Slika 13. Inzulini u serumu, 10. dan, (ng mL^{-1}). K – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) 25 mg kg^{-1} tjelesne mase, AL – aloksan 150 mg kg^{-1} tjelesne mase, AL+ECT

Na slici 13. prikazani su rezultati mjerenja inzulina u serumu C57BL/6 miša nakon 10-og dana tretmana. Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne (K) ($2,43 \pm 0,374 \text{ ng mL}^{-1}$) i aloksanske (AL) ($1,53 \pm 0,742 \text{ ng mL}^{-1}$) skupine ($p=0,0127$), te između AL i AL+ECT ($2,42 \pm 0,789 \text{ ng mL}^{-1}$) skupine ($p=0,0183$).

Biosinteza inzulina se smanjuje kada su β -stanice gušterače izložene kroničnoj hiperglikemiji u životinjskim modelima dijabetesa tipa 2. Sličan fenomen se javlja prilikom izloženosti organizma oksidacijskom stresu kod dijabetičnog stanja. Sintaza inzulina se smanjuje jer se aktivnost promotora gena za inzulini i mRNA ekspresiju, te je time ekspresija inzulinskog gena inhibirana. Također je otkriveno da se smanjuje vezujuća sposobnost DNA faktora 1 promotora inzulina (PDX-1) koji je vrlo bitan transkripcijski faktor za inzulinske gene. Tijekom hiperglikemije i oksidacijskog stresa uzrokovanog hiperglikemijom, dolazi do smanjenja aktivnosti glukokinaze. Kronična hiperglikemija uzrokuje smanjeno izlučivanje inzulina i povećanje vjerojatnosti nastanka inzulinske rezistencije što na kraju dovodi do glukotoksičnosti. Glukotoksičnost povećava vjerojatnost nastanka drugih komorbiditeta i komplikacija u liječenju šećerne bolesti. U sprječavanju ovih događanja, veliku ulogu imaju

antioksidansi koji poboljšavaju sekreciju inzulina i povećavaju ekspresiju mRNA inzulina (Kawahito i sur., 2009).

Polifenolni spojevi iz različitih izvora stimuliraju enteroendokrine stanice (L-stanice) da izlučuju glukagonu sličan peptid 1 (GLP1) inhibicijom dipeptidil peptidaze-4 (DPP4). Izlučivanje GLP1 je vrlo bitan hormon u glikemiji jer stimulira postprandijalnu sekreciju inzulina. Polifenolni spojevi također stimuliraju β -stanice na sekreciju inzulina i stimuliraju periferni odgovor na inzulin, povećavajući sveukupne učinke GLP1 (Avila i sur., 2017).

U istraživanju González-Abuina i suradnika (2014) promatrao se učinak ekstrakta sjemenki grožđa na sekreciju GLP1 i inzulina. Povećanje koncentracije GLP1 je ovisilo o prisutnosti glukoze zato što ekstrakt sjemenki grožđa nema utjecaj na glikemiju životinja koje nisu unijele glukozu. Utjecaj ekstrakta sjemenki grožđa odražava se na povećano izlučivanje GLP1 i inhibiciju intestinalnog DPP4 koji uzrokuje hidrolizu GLP1. Mješavina katehina, epikatehina, procijanidina B2 i galne kiseline (sadržanih u ekstraktu sjemenki grožđa) je uspješno inhibirala DPP4.

Qin i suradnici (2012) demonstrirali su učinak polifenolnih spojeva iz ekstrakta cimeta na enterocitima Wistar štakora. Tretman je povećao ekspresiju mRNA inzulinskog receptora, inzulinskih receptorskih supstrata (IRS-1, IRS-2), fosfatidilinositol 3-kinaze (PI3K) i Akt1. Promjene u ekspresiji gena ukazuju na inzulinsku osjetljivost enterocita na polifenole cimeta.

U studiji u kojoj su korištene INS-1 832/13 iz β -stanica, tretman sa monomernim katehinima iz kakaa pokazao je značajno povećanje inzulinske sekrecije zbog pojačane ekspresije gena odgovornih za biogenezu mitohondrijskih kompleksa poput nuklearnog faktora eitroid 2 – povezan faktor 2 (Nrf2) i Nrf1 i GA alfa vezujući proteinski transkripcijski faktor (GABPA) (Rowley i sur., 2017).

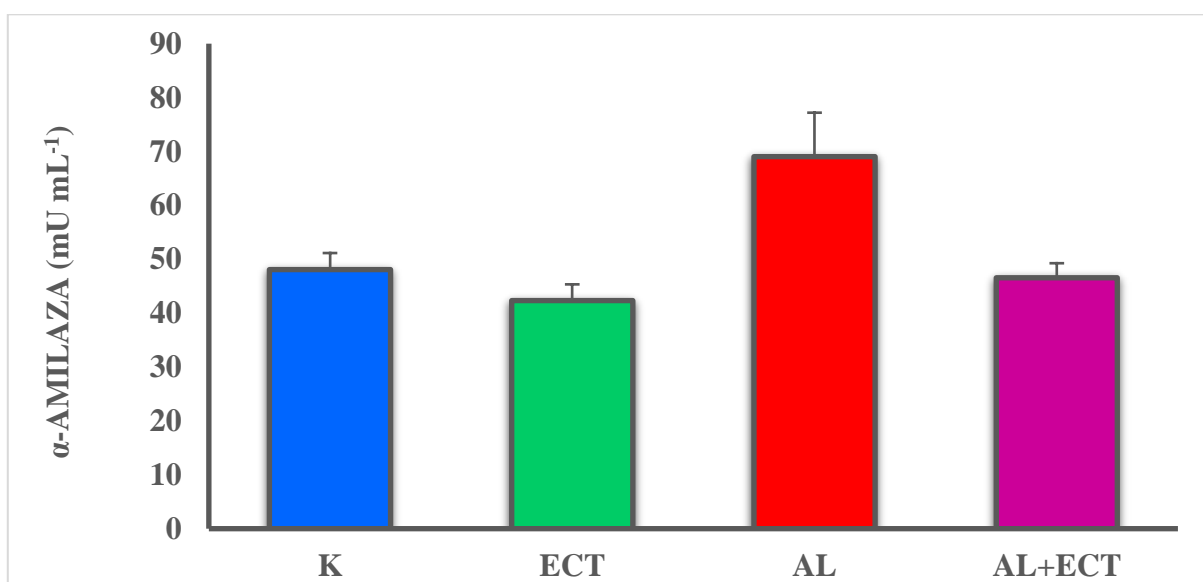
Epigalokatehin galat (EGCG) je najzastupljeniji polifenol u zelenom čaju i jedan od najčešćih flavanola koji ima široki utjecaj na šećernu bolest, uključujući poboljšanu sekreciju inzulina pojačanom aktivnošću β -stanica i učinkovitu inzulinsku signalizaciju. U stanicama gušterače štakora, suplementacija EGCG (1-10 μ M) tijekom 2 sata povećala je ekspresiju PDX-1 i fosforilaciju protein kinaze B što je rezultiralo povećanom funkcijom β -stanica i povećano izlučivanje inzulina (Cai i Lin, 2009).

Navedena istraživanja potvrđuju i rezultate ovog rada. Aloksanska skupina miševa ima smanjenu razinu inzulina u serumu prvi i deseti dan u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (slika 12 i slika 13). Smanjena razina inzulina u aloksanskoj skupini (AL) je rezultat glukotoksičnosti, odnosno kronične hiperglikemije zbog koje dolazi do smanjene ekspresije

gena za sintezu inzulina. Promatrajući aloksansku skupinu i aloksansku skupinu tretiranu ekstraktom cvijeta trnine (ECT), vidljivo je da je statistički značajna razlika inzulina u serumu između tih dviju skupina (slika 12 i slika 13). Razlog ovoga efekta leži u potencijalu polifenolnih spojeva u ekspresiji gena odgovornih za sintezu inzulina i osjetljivosti stanica na inzulin. Adekvatna koncentracija inzulina u serumu i dovoljna osjetljivost stanica na inzulin dovodi do smanjenja glukoze u krvi, odnosno smanjenja hiperglikemije. Ekstrakt cvijeta trnine je pokazao da ima utjecaj na povećanje koncentracije razine inzulina u serumu kod aloksanske skupine tretirane ekstraktom cvijeta trnine (AL+ECT).

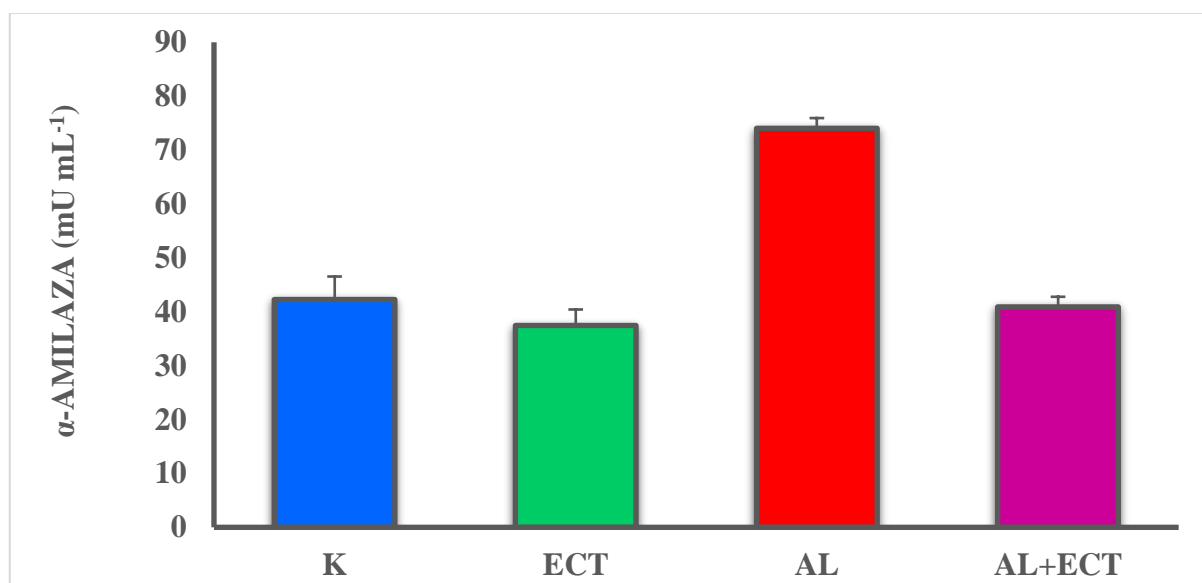
4.3. FIZIOLOŠKA REGULACIJA α -AMILAZE U SERUMU NAKON KONZUMACIJE EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE U NORMALNOM METABOLIZMU I HIPERGLIKEMIJI (ALOKSANSKI MODEL)

Mnogi biljni derivati s prijavljenim hipoglikemijskim svojstvima korišteni su u narodnoj medicini i tradicionalnim sustavima liječenja. α -amilaza iz gušterače ključni je enzim u probavnom sustavu i katalizira početni korak hidrolize škroba do maltoze i konačno glukoze. Razgradnja ovog dijetalnog škroba odvija se brzo i dovodi do povišene postprandijalne hiperglikemije. Dakle, retardacija razgradnje škroba inhibicijom enzima poput α -amilaze igrala bi ključnu ulogu u kontroli dijabetesa.



Slika 14. α -Amilaza u serumu, 1. dan, (mU mL⁻¹). K – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) 25 mg kg⁻¹ tjelesne mase, AL – aloksan 150 mg kg⁻¹ tjelesne mase, AL+ECT

Na slici 14. prikazani su rezultati mjerenja α -Amilaze u serumu C57BL/6 miša nakon 1-og dana tretmana. Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne (K) ($48,08 \pm 3,073 \text{ mU mL}^{-1}$) i aloksanske (AL) ($69,04 \pm 8,158 \text{ mU mL}^{-1}$) skupine; između skupina ekstrakt cvijeta trnine (ECT) ($42,33 \pm 3,008 \text{ mU mL}^{-1}$) i AL, te između AL i AL+ECT ($46,56 \pm 2,699 \text{ mU mL}^{-1}$) skupine; ($p < 0,0001$). Najviša aktivnost α -amilaze izmjerena je za aloksansku skupinu (AL) dok je primijećeno da polifenoli iz ekstrakta cvijeta trnine (ECT) imaju efekt smanjenja aktivnosti α -amilaze, odnosno inhibicije aktivnosti što je jedan od ključnih hipoglikemijskih učinaka polifenola.



Slika 15. α -Amilaza u serumu, 10. dan, (mU mL^{-1}). K – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) 25 mg kg^{-1} tjelesne mase, AL – aloksan 150 mg kg^{-1} tjelesne mase, AL+ECT

Na slici 15. prikazani su rezultati mjerenja α -Amilaze u serumu C57BL/6 miša nakon 10-og dana tretmana. Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne (K) ($42,27 \pm 4,266 \text{ mU mL}^{-1}$) i ekstrakt cvijeta trnine (ECT) ($37,45 \pm 2,967 \text{ mU mL}^{-1}$) skupine ($p < 0,0001$); između K i aloksanske (AL) ($74,04 \pm 1,899 \text{ mU mL}^{-1}$) grupe; između K i AL+ECT ($40,91 \pm 1,864 \text{ mU mL}^{-1}$) ($p = 0,003$); između ECT i AL skupine ($p < 0,0001$); te između AL i AL+ECT skupine, ($p < 0,0001$). Nakon 10 dana tretmana sa ekstraktom cvijeta trnine primjećene su statistički značajnije razlike između skupina koje su dobivale trninu i ostalih skupina što ukazuje da dugotrajnije uzimanje ECT pojačava hipoglikemijski efekt inhibicije α -amilaze.

Inhibicijom α -amilaze u probavnom sustavu onemogućuje se razgradnja škroba na maltozu, odnosno glukozu koja se apsorbira u enterocitima. Inhibicija α -amilaze se odvija tako da se blokira pristup aktivnom mjestu te zbog toga molekule oligosaharida i disaharida ne mogu ući u aktivno mjesto gdje bi α -amilaza pocijepala 1,4-glikozidnu vezu. Rezultat toga je produljeno vrijeme metaboliziranja ugljikohidrata, uzrokujući smanjenu brzinu apsorpcije glukoze i smanjenu postprandijalnu razinu glukoze u krvi. Veliku ulogu u inhibiciji α -amilaze imaju polifenolni spojevi koji vezanjem za aktivno mjesto enzima onemogućuju pristup ugljikohidratima. Jedna od predloženih i pretpostavljenih metoda koja se koristi u farmaceutici je molekularno pristajanje. Ova metoda može s vrlo visokom točnošću predvidjeti konformaciju malih molekula, odnosno liganada u odgovarajućem mjestu vezanja. Molekularno vezanje polifenolnih spojeva na α -amilazu nije pretjerano istraživano. Da bi se detektiralo mjesto vezanja na atomskoj razini, u ovoj metodi se koristi kvantna kemijska analiza i virtualno vezanje klastera optimizirano molekularnom geometrijom i HOMO-LUMO energijama koristeći Becke-a troparametrijsku teoriju funkcionalne hibridne gustoće. Istraživanje je pokazalo da su katehin, hesperetin, kampferol, silibinin i pelargonidin ligandi koji pokazuju afinitet za vezanje na aktivno mjesto α -amilaze i koji inhibiraju njenu aktivnost (Rasouli i sur., 2017).

Brojna *in vitro* istraživanja su dokazala da polifenoli iz bobičastog voća (jagode, maline, borovnice), povrća (bundeva, grahorice, kukuruz, patlidžan), crne riže, leguminoza, zelenog i crnog čaja i crvenog vina inhibiraju α -amilazu i onemogućuju metabolizam ugljikohidrata (Kim i sur., 2016).

Kawakami i sur. (2010) su identificirali polifenolne spojeve iz listića čaja kaki jabuke kao učinkovite α -amilazne inhibitore. Glavni polifenolni spojevi u uzorku bili su katehin, epigalokatehin, epigalokatehin-3-O-galat, epikatehin i epikatehin-3-O-galat.

Tadera i sur. (2006) su dokazali svojstvo naringenina, kamferola, luteolina, apigenina, katehina, epikatehina, daidzeina i epigalokatehin galata da inhibiraju α -amilazu, te su detektirali povezanost potencijalne inhibicije i broj hidroksilnih grupa flavonoida.

U istraživanju Zheng i suradnika (2020) promatran je utjecaj ferulinske kiseline na inhibiciju α -amilaze. Ferulinska kiselina je smanjila aktivnost pankreasne α -amilaze već pri koncentracijama IC_{50} 0,622 mg mL⁻¹, te je pokazala mješovit tip inhibicije. α -heliks i β -ploča α -amilaze su se konformacijski promijenili u prisustvu ferulinske kiseline što je dokazano FT-IR spektrom. Fluorescentno gašenje i molekularno pristajanje su otkrili da ferulinska kiselina ulazi u interakcije s određenim aminokiselinskim ostacima α -amilaze prodirući u aktivno mjesto što dokazuje da su nekovalentne veze uglavnom odgovorne za inhibiciju α -amilaze.

Modra kozokrvina (*Lonicera caerulea*) po svom kemijskom sastavu obiluje polifenolima i to najviše katehinom (43,6%), klorogenskom kiselinom (26,3%) i cijanidin-3-glukozidom (11,6%). Zbog svog kemijskog sastava i visokom zastupljenošću polifenolnih spojeva, pokazuje inhibitorna svojstva prema α -amilazi. Polifenolni spojevi modre kozokrvine pokazuju reverzibilnu kompetitivnu inhibiciju aktivnosti α -amilaze. Katehin, klorogenska kiselina i cijanidin-3-glukozid ispoljavaju najveću kompeticiju za inhibiciju aktivnosti. Vežanje navedenih inhibitora uzrokuje konformacijske promjene α -amilaze. Vežanje inhibitora i enzima se stabilizira pomoću hidrofobnih interakcija, π veza, vodikovih veza i ionskih interakcija što doprinosi inhibiciji aktivnosti α -amilaze (Liu i sur., 2020).

Dosadašnja istraživanja idu u prilog rezultatima ovog istraživanja. Uspoređujući kontrolnu skupinu (K), skupinu životinja koja je tretirana ekstraktom cvijeta trnira (ECT) skupinu, aloksanske skupinu (AL) i AL+ECT skupinu uočeno je da je došlo do statistički značajnog smanjenja koncentracije α -amilaze u serumu u skupinama koje su tretirane ekstraktom cvijeta trnira (ECT). AL+ECT skupina u odnosu na aloksansku skupinu (AL), 1. i 10. dana, pokazuje statistički značajno smanjenje koncentraciju α -amilaze u serumu (slika 14, slika 15). To dokazuje da polifenolni spojevi iz ekstrakta cvijeta trnira (tablica 1) inhibiraju aktivnost α -amilaze i tako smanjuju njenu koncentraciju u serumu. Time je dokazano da inhibicija ovog enzima može pomoći u regulaciji glikemije na način da smanjuje apsorpciju glukoze, a samim time smanjuje i razinu glukoze u krvi.

4.4. REDOKS STATUS (PROOKSIDACIJSKO/ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE) TKIVA NAKON KONZUMACIJE EKSTRAKTA CVIJETA TRNIRE U NORMALNOM METABOLIZMU I HIPERGLIKEMIJI (ALOKSANSKI MODEL)

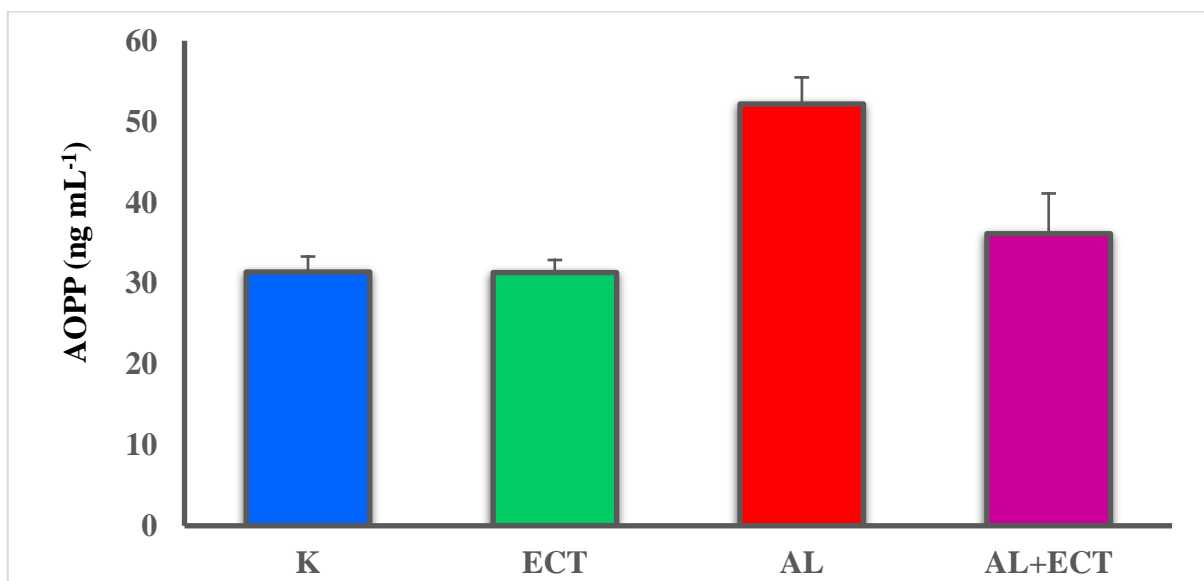
Dijabetes melitus (DM) karakterizira oštećenje stanica uzrokovano upalnim i metaboličkim mehanizmima induciranim izmjenom redukcijско-oksidacijskog statusa.

Karbonilni derivati (aldehidi i ketoni) nastaju izravnom oksidacijom aminokiselinskih ostataka ROS-om ili neoksidacijskim reakcijama s oksidiranim lipidima koje sadrže karbonile (Gyurászová i sur., 2017). Razine karbonila najčešće su korišteni marker oksidacijskog oštećenja proteina zbog relativno rane tvorbe i stabilnosti (Weber i sur., 2015).

Produkti oksidacijskih proteina (AOPP) su proteini koji sadrže ditrozin i umreženi su proteini koji se nalaze u aterosklerotskim lezijama i potiču krvožilnu akumulaciju, aktivaciju monocita i endotelnu disfunkciju prekomjernom ekspresijom adhezijskih molekula (Guo i

sur., 2008; Liu i sur., 2006). Produkti oksidacijskih proteina u serumu (AOPP) novi su markeri oštećenja proteina induciranih oksidacijskim stresom.

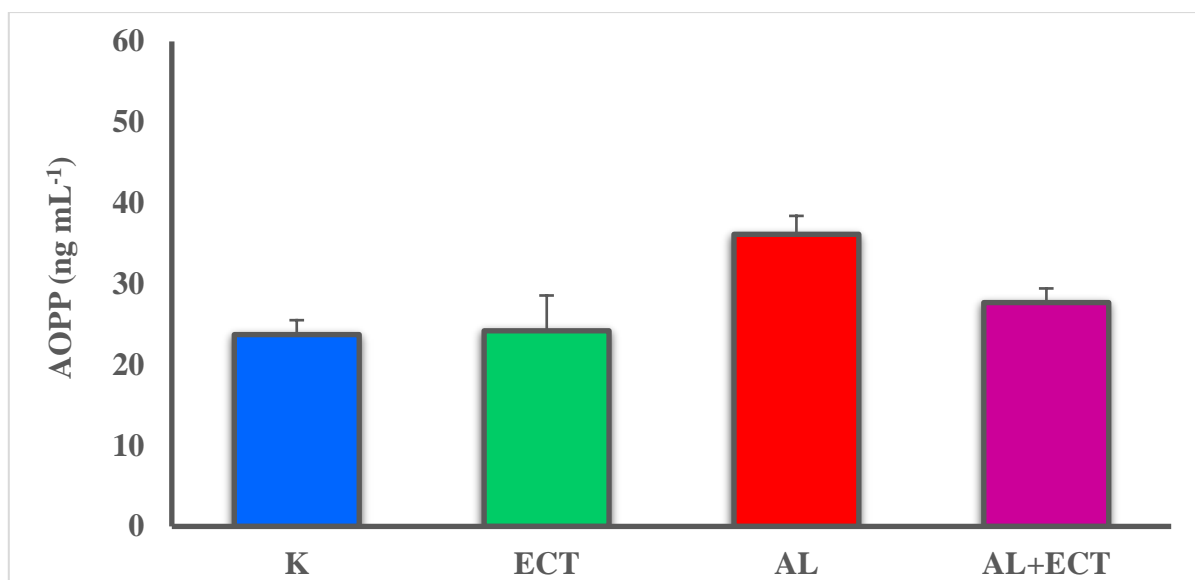
Bolest bubrega predstavlja ozbiljan globalni zdravstveni problem. Jedna od glavnih briga je kasna dijagnoza, izvediva samo u napredovalom bolesnom stanju. Nedostatak kliničke manifestacije u ranim fazama i činjenica da su obično izmjereni parametri bubrežne funkcije značajno smanjeni samo tijekom uznapredovalih stadija bolesti glavni su uzrok. Promjene na molekularnoj razini bubrežnog tkiva događaju se i prije nego što se dušične tvari, poput kreatinina i uree, počnu nakupljati u krvi. Bubrežni proksimalni tubuli sadrže veliki broj mitohondrija i kritični su za energetski zahtjevan proces reapsorpcije vode i otopina. Mitohondriji su najveći proizvođači kisikovih radikala koji povećavaju osjetljivost bubrega na oksidacijsko oštećenje uzrokovano stresom. Slobodni radikali i prooksidansi proizvedeni tijekom akutne ili kronične ozljede bubrega mogu dodatno pogoršati tijek bolesti i igrati ulogu u patogenezi naknadnih komplikacija (Gyurászová i sur., 2020).



Slika 16. AOPP u homogenatu tkiva jetre, 10. dan, (ng mL⁻¹). K – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnina (*Prunus spinosa* L.) 25 mg kg⁻¹ tjelesne mase, AL – aloksan 150 mg kg⁻¹ tjelesne mase, AL+ECT

Na slici 16. prikazani su rezultati mjerenja AOPP u homogenatu tkiva jetre C57BL/6 miša nakon 10-og dana tretmana. Statistički je značajna razlika između kontrolne (K) (31,40±1,909 ng mL⁻¹) i aloksanske (AL) (52,18±3,292 ng mL⁻¹) skupine, ($p<0,001$), ali i između AL i AL+ECT (36,15±4,964 ng mL⁻¹) skupine, ($p=0,026$). Također je statistički

značajna razlika između ECT ($31,33 \pm 1,553 \text{ ng mL}^{-1}$) i AL skupine, ($p < 0001$). Nema značajne razlike između kontrolne skupine (K) i skupine koja je primala ekstrakt cvijeta trnine (ECT). Iz slike 14. se vidi da su razine AOPP najviše u aloksanskoj skupini, što je i logično obzirom da stanje hiperglikemije uzrokuje oštećenja na proteinskoj strukturi.



Slika 17. AOPP u homogenatu tkiva bubrega, 10. dan, (ng mL^{-1}). K – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) 25 mg kg^{-1} tjelesne mase, AL – aloksan 150 mg kg^{-1} tjelesne mase, AL+ECT

Na slici 17. prikazani su rezultati mjerenja AOPP u homogenatu tkiva bubrega C57BL/6 miša nakon 10-og dana tretmana. Statistički je značajna razlika između kontrolne (K) ($23,73 \pm 1,786 \text{ ng mL}^{-1}$) i aloksanske (AL) ($36,12 \pm 2,296 \text{ ng mL}^{-1}$) skupine, ($p < 0,001$), ali i između AL i AL+ECT ($27,69 \pm 1,752 \text{ ng mL}^{-1}$) skupine, ($p = 0,026$). Također je statistički značajna razlika između ECT ($24,20 \pm 4,373 \text{ ng mL}^{-1}$) i AL skupine, ($p < 0001$). Nema značajne razlike između kontrolne skupine i skupine koja je primala ekstrakt cvijeta trnine.

Hiperglikemija uzrokuje pojačano stvaranje ROS-a u organizmu što rezultira s povećanom razinom AOPP kod bolesnika. To dovodi do sistemske upale u organizmu što može rezultirati razvijanjem dodatnih bolesti uz prethodno razvijeni dijabetes.

Brahmi i sur. (2018) promatrali su utjecaj polifenola modrozeleno alge *Chaetomorpha gracilis* (AECG) na različite biokemijske i hematološke parametre kod miševa, među kojima je bio i AOPP. Najzastupljeniji polifenoli u algi su galna kiselina, kumarinska kiselina, apigenin i katehin. Miševi su bili podijeljeni u četiri skupine, gdje je 1.skupina: kontrolna

skupine, 2. skupina: miševi koji su bili na dijeti s visokim udjelom masti (HFD), 3. skupina: miševi na dijeti s visokim udjelom masti uz dodatak ekstrakta alge (HFD+AECG), 4. skupina: miševi na normalnoj dijeti tretiranoj ekstraktom algi (AECG). U istraživanju je došlo do statistički značajnog smanjenja produkta oksidacijskih proteina (AOPP) u eritrocitima i trombocitima u skupini miševa HFD+AECG u odnosu na HFD skupinu. Također je došlo do statistički značajnog smanjenja koncentracije AOPP-a u AECG skupini u odnosu na kontrolnu skupinu i ostale dvije skupine.

Mohammed Yusof i sur. (2018) proveli su istraživanje u kojem su promatrali utjecaj polifenola ekstrakta *Hibiscus sabderiffa* (HPE) na tkivo srca kod dijabetičnih štakora (DM). Štakori su bili podijeljeni u 4 skupine gdje je 1. skupina: nedijabetični štakori (NDM), 2. skupina: dijabetični štakori (DM), 3. skupina: dijabetični štakori tretirani ekstraktom (DM+HPE) i 4. skupina: dijabetični štakori tretirani metforminom (DM+MET). Dijabetes uzrokuje povećanje markera oksidativnog stresa u tkivu srca kod DM, DM+HPE i DM+MET skupina ($p < 0,05$), međutim, koncentracija AOPP u tkivu srca je bila statistički značajno smanjena u DM+HPE skupini u odnosu na DM i DM+MET skupinu. Smanjenje upalnih markera, među kojima je i AOPP, može smanjiti vjerojatnost nastanka kardiovaskularnih bolesti i oštećenja krvožilnog sustava kod dijabetičara.

Svježi listovi čaja bogati su derivatima flavan-3-ola, ponajviše katehinima, epikatehinima i epigalokatehinima, epikatehin galatom i epigalokatehin galatom koji je najzastupljeniji. 3T3-L1 preadipociti su u istraživanju Ramlagan i sur. (2017) tretirani crnim i zelenim čajem te se promatrao njihov utjecaj na razinu AOPP. Razina AOPP-a u glukozom i ribozom glikiranom albuminu iz goveđeg seruma (BSA) je statistički značajno porastao u odnosu na neglikirani BSA. Crni i zeleni čaj su smanjili ($P < 0,01$) AOPP razine u ribozom glikiranom BSA, dok je sam crni čaj statistički značajno smanjio razinu AOPP-a kod BSA glikiranog glukozom. Povećana produkcija ROS-a izaziva oksidaciju proteina što uzrokuje modifikaciju proteina kao što su karbonilirani proteini i AOPP. Polifenoli inhibiraju nastanak karboniliranih proteina i AOPP u BSA u prisutnosti oksidacijskog stresa. Polifenolni spojevi poput galne kiseline, kamferola i rutina statistički značajno inhibiraju formiranje AOPP u BSA glikiranom ribozom.

Fu i sur. (2018) nastojali su dokučiti utjecaj resveratrola na štakorima kod kojih je izazvana ishemijsko-reperfuzijska ozljeda leđne moždine. Istraživanje je provedeno na 5 skupina štakora u kojoj je 1. skupina (Con): kontrolna skupina bez operacije, 2. skupina: štakori tretirani resveratrolom (10 mg po 1 kg tjelesne mase) (Res), 3. skupina (Sham): štakori podvrgnuti laparotomiji i infrarenalnoj disekciji abdominalne aorte bez stezanja aorte, 4.

skupina (IRI): štakori s ishemijskom-reperfuzijskom ozljedom leđne moždine, 5. skupina (IRI+Resv): štakori koji su tretirani resveratrolom (10 mg kg⁻¹ tjelesne mase) i kod kojih je izazvan IRI. Primijećeno je da je u IRI skupini povećana koncentracija AOPP. Primjenom resveratrola kod štakora sa IRI došlo je do statistički značajnog smanjenja AOPP u serumu u odnosu na IRI skupinu koja nije bila tretirana resveratrolom. Sham skupina je imala manju koncentraciju AOPP u serumu nego IRI skupina. IRI skupina tretirana resveratrolom imala je manju koncentraciju AOPP u krvi u odnosu na Sham skupinu. AOPP je marker proteinske oksidacije te je statistički značajno povećan u IRI skupini u odnosu na kontrolu skupinu. Prekomjerna produkcija slobodnih radikala korelacijski je povezana s produkcijom produkata oksidacijskih proteina u serumu (AOPP). Nastavno na to, AOPP je medijator oksidacijskog stresa, a njegove povećane koncentracije su također povezane s razinom citokina (molekule koje izazivaju upalu) u organizmu.

Slika 16. pokazuje utjecaj polifenolnih spojeva iz ekstrakta cvijeta trnine na razinu AOPP-a u tkivu jetre. Koncentracija AOPP-a u tkivu jetre u aloksanskoj skupini (AL) je statistički značajno veća nego u kontrolnoj skupini (K). Hiperglikemija uzrokuje nastajanje upalnih markera i oštećenje organizma, odnosno oksidaciju proteina i lipidnu peroksidaciju. Uspoređujući aloksansku skupinu s aloksanskom skupinom tretiranom ekstraktom cvijeta trnine (ECT) došlo je do statistički značajnog smanjenja koncentracije AOPP-a u tkivu jetre. Time je potvrđen utjecaj polifenolnih spojeva na markere oštećenja proteina induciranih oksidacijskim stresom. Prehrana obogaćena polifenolnim spojevima ima pozitivno djelovanje na hiperglikemiju i smanjenje nastanka markera oštećenja proteina.

Slika 17. pokazuje utjecaj polifenolnih spojeva iz ekstrakta cvijeta trnine na razinu AOPP u tkivu bubrega. Dobiveni rezultati, odnosno razine AOPP po skupinama odgovaraju onim u tkivu jetre. Koncentracija AOPP-a u tkivu bubrega u aloksanskoj skupini (AL) je statistički značajno veća nego u kontrolnoj skupini. Aloksanska skupina tretirana ekstraktom cvijeta trnine (ECT) pokazuje statistički značajno smanjenje koncentraciju AOPP-a u odnosu na aloksansku skupinu.

Dijabetes se danas smatra heterogenom skupinom bolesti koju karakterizira stanje kronične hiperglikemije, što uzrokuje niz sekundarnih komplikacija poput kardiovaskularnih, bubrežnih i neuroloških. Regulacija DM uključuje vježbanje, prehranu i farmakoterapiju. Međutim, lijekovi razvijeni za liječenje dijabetesa iako mogu spriječiti dugotrajne komplikacije dijabetesa mogu imati brojne nuspojave. Novi terapijski modaliteti koji omogućavaju bolje upravljanje dijabetesom i bolju toleranciju pacijenata bili bi važno poboljšanje. Trenutno se navodi da više od 400 biljaka ima potencijal snižavanja razine

glukoze u krvi. Poznato je da su ove ljekovite biljke učinkovite u liječenju dijabetesa i očekuje se da postižu visoku razinu antihiperglikemijskog učinka bez nuspojava, za razliku od uobičajenih antidijabetičkih lijekova. Biljni ekstrakti ostvaruju antidijabetička djelovanja pomoću farmakoloških mehanizama, uključujući inzulinu sličnu aktivnost (Broadhurst i sur., 2000), kao i povećanje osjetljivosti na inzulin (Miura i sur., 2006), izlučivanje inzulina (Mai i Chuyen, 2007), antioksidacijsku aktivnost (Chen i Yen, 2007) i smanjuju aktivnost crijevne glikozidaze (Kimura i sur., 2007).

Bioaktivne molekule iz ekstrakta cvijeta *Prunus spinosa* L., kao suportivna terapija, imaju pozitivan učinak na oksidacijski stres i hiperglikemiju u miša C57BL/6.

5. ZAKLJUČCI

1. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je tretman s ekstraktom cvijeta trnine u aloksanskoj grupi životinja (AL+ECT) 10-og dana statistički značajno smanjio aktivnosti glukoze u krvi (GUK) ($p < 0,0014$), inzulina ($p = 0,0127$) i α -amilaze ($p < 0,0001$) u serumu miša u odnosu na hiperglikemijsku skupinu životinja (AL) što se može pripisati polifenolima prisutnim u ekstraktu cvijeta trnine. Koncentracije AOPP u ispitivanim uzorcima jetre i bubrega statistički su značajno ($p = 0,026$) smanjene u (AL+ECT) grupama miševa u odnosu na aloksansku grupu, što kazuje na antioksidacijski učinak ECT i smanjenje oksidacijskog stresa, pošto stanje hiperglikemije uzrokuje oštećenja na proteinskoj strukturi.
2. Dakle, ovo istraživanje ukazuje na to da bioaktivne molekule iz ekstrakta cvijeta *Prunus spinosa* L., kao suportivna terapija, mogu imati pozitivan učinak na oksidacijski stres i hiperglikemiju u miša C57BL/6.

6. LITERATURA

- Abou-Seif, M.A., Youssef, A.A. (2004) Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta.* **346**, 161-170.
- Afsartala, Z., Savabkar, S., Mojarad, E.N., Assadollahi, V., Tanha, S., Bijangi, K., Gholami, M. (2016) Expression of liver alpha-amylase in obese mouse hepatocytes. *Gastroenterol. Hepatol Bed Bench.* **9**, 278-285.
- Andronie, L., Holonec, L., Pop, I., Truta, A.M., Odagiu, A., Sălăgean, T., Sobolu, R., Coroian, A., Balta, I., Şuba, E.E. (2019) Antioxidant capacity of several Romanian forest fruits (*Rosa canina* L., *Prunus spinosa* L., *Vaccium vitis-idaea* L. and *Cornus mas* L.). *Not Bot Horti Agrobo* **47**, 1178-1184.
- Anonymous 1, (2020) Trnina cvijet, < <https://pixabay.com/photos/prunus-spinosa-blackthorn-2308291/>>. Pristupljeno 24. travnja 2020.
- Anonymous 2, (2020) Struktura flavonoida, https://www.researchgate.net/figure/Basic-chemical-structure-of-flavonoids_fig2_259355504. Pristupljeno 02. svibnja 2020.
- Anonymous 3, (2020) Struktura α -amilaze, <https://depositphotos.com/87589496/stock-photo-molecular-structure-of-alpha-amylase.html>. Pristupljeno 30. svibnja 2020.
- Anonymous 4, (2020) Shematski dijagram za Mouse AOPP ELISA kits, prema: <https://rockland-inc.com/ELISA-Kits.aspx>. Pristupljeno 24. travnja 2020.
- Anonymous 5, (2020) Shematski prikaz razrijeđenja standardnog uzorka AOPP, <https://cdn.mybiosource.com/tds/protocol_manuals/000000799999/MBS263319.pdf>. Pristupljeno 24. travnja 2020.
- Anonymous 6, (2020) Shematski prikaz razrijeđenja standardnog uzorka za određivanje inzulina u serumu, <https://u2.elabscience.com/PDF/Cate61/E-EL-M1382-Elabscience.pdf>. Pristupljeno 24. travnja 2020.
- Aryaeian, N., Sedehi, S.K., Arabou, T. (2017) Polyphenols and their effects on diabetes management: A review. *Med J Islam Repub Iran.* **31**, 134.
- Ašič, S. (1991) *Priručnik za sakupljanje ljekovitog bilja*, (preveo Jurković, B.), centar za informacije i publicitet, Zagreb.
- Avila, J.A.D., Garcia, J.R., Aguilar, G.A.G., de la Rosa, L.A. (2017) The antidiabetic mechanisms of polyphenols related to increase glucagon-like peptide 1 (GLP1) and insulin signaling. *Molecules.* **22**, 903.
- Bar-Or, D., Rael, L.T., Madayag, R.M., Banton, K.L., Tanner, A., Acuna, D.L., Lieser, M.J., Marshall, G.T., Mains, C.W., Brody, E. (2019) Stress hyperglycemia in

critical ill patients: insight into possible molecular pathways. *Front Med.* **6**, 54. doi: 10.3389/fmed.2019.00054

- Bogdanov S., Baumann E. (1988) Bestimmung von Honigzuckern mit HPLC. *Mitt Geb Lebensm Hyg.* **79**, 198-206.
- Bourdon, E., Blache, D. (2001) The importance of proteins in defense against oxidation. *Antioxid Redox Signal.* **3**, 293-311.
- Brahmi, N., Saoudi, M., kadri, Y., Kallel, C., Euch, A.E., Ayadi, F.M., Harrath, A.H., El Feki, A., Allagui, M.S. (2018) Protective effect of *Chaetomorpha gracilis* aqueous extract against erythrocytes oxidative damage induced by high fat diet in treated mice. *Arch Physiol Biochem.* **125**, 220-227.
- Bravo, L. (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev.* **56**, 317-333.
- Brealey, D., Singer, M. (2009) Hyperglycemia in critical illness: a review. *J Diabetes Sci Technol.* **3**, 1250-1260.
- Broadhurst, C.L., Polansky, M.M., Anderson, R.A. (2000) Insulin-like biological activity of culinary and medical plant aqueous extracts in vitro. *J Agric Food Chem.* **48**, 849-852.
- Butterworth, P.J., Warren, F.J., Ellis, P.R. (2010) Human α -amylase and starch digestion: an interesting marriage. *Starch/Stärke.* **63**, 395-405.
- Cai, E.P., Lin, J.-K. (2009) Epigallocatechin gallate (EGCG) and rutin suppress the glucotoxicity through activating IRS2 and AMPK signaling in rat pancreatic β -cells. *J Agric Food Chem.* **57**, 9817.
- Chen, H.Y., Yen, G.C. (2007) Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. *Food Chem.* **101**, 686-694.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Masella, R. (2010) Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int J Mo Sci.* **11**, 1321-1342.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A. (2013) Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence and protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Sign.* **18**, 1818-1892.
- Descamps-Latscha, B., Witko-Sarsat, V., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., Gausson, V., Mothu, N. (2005) Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients. *Am J Kidney Dis.* **45**, 39-47.

- Egea, P.F., Stroud, R.M., Walter, P. (2005) Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr Opin.Struct Biol.* **15**, 213-220.
- Falkoll, P.J., Jensen, M.D., Cherrington, A.D. (2004) Physiological action of insulin. U: Diabetes Mellitus: A fundamental an clinical text. (LeRoith, D., Taylor, S.I., Olefasky, J.M., ured.), Williams and Wilkins, Philadelphia, str. 165-181.
- Fruhbeck, G. (1996) Flavonoid intake and coronary mortality. *Br Med J.* **312**, 1479.
- Fu, S., Lv, R., Wong, L., Hou, H., liu, H., Shao, S. (2018) Resveratrol, an antioxidant, protects sinal cord injury in rats by suppressing MAPK pathway. *Saudi J Biol Sci.* **25**, 259-266.
- Fu, Z., Gilbert, E.R., Liu, D. (2013) Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev.* **9**, 25-53.
- Ganguly S, G. TK, Mantha S, Panda K (2016) Simultaneous Determination of Black Tea- Derived Catechins and Theaflavins in Tissues of Tea Consuming Animals Using Ultra13 Performance Liquid-Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *PLoS One.* **11**. doi: 10.1371/journal.pone.0163498
- González-Abuin, N., Martínez-Micaelo, N., Margalef, M., Blay, M., Arola-Arnal, A., Mugarza, B., Ardéval, A., Pinent, M. (2014) A grape seed extract increases active glucagon-like peptide-1 levels after an oral glucose load in rats. *Food Funct.* **5**, 2357-2364.
- Groot, P.C., Bleeker, M.J., Pronk, J.C., Arwet, F. (1989) the human α -amilaze multigene family consists of halpotypes with variable numbers of genes. *Genomic.* **5**, 29-42.
- Gryszczyńska, B., Formanowicz, D., Budzyń, M., Wanic-Kossowska, M., Pawliczak, E., Formanowicz, P., Majewski, W., Wojciech Strzyhewski, K., Kasprzak, M., Iskra, M. (2017) Advanced oxidation protein products and carbonylated proteins as biomarkers of oxidative stress in selected atherosclerosis-mediated diseases. *Biomed Res Int.* doi:10.1155/2017/4975264
- Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Queiroz, M. J. R. P., Santos Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R. (2013) Characterization of Phenolic Compounds in Wild Fruits from Northeastern Portugal. *Food Chemist.* **141(4)**, 3721-3730.
- Guo, Z.J., Niu, H.Y., Hou, F.F., Zhang, L., Fu, N., Nagai, R., Lu, X., Hong Chen, B., Shan, Y.X., Tian, Y.W., Nagaraj, R.H., Xie, D., Zhang, X. (2008) Advanced oxidation protein products activate vascular endothelial cells via a RAGE-mediated signaling pathway. *Antioxid Redox Signal.* **10**, 1699–1712.
- Gyurászová, M., Gurecká, R., Bábíčková, J., Tóthová, L. (2020) Oxidative Stress in the Pathophysiology of Kidney Disease: Implications for Noninvasive Monitoring and Identification of Biomarkers. *Oxid Med Cel. Longev.* doi:10.1155/2020/5478708

- Hammer, M., Storey, S., Hershey, D.S., Brady, V.J., Davis, E., Mandolfo, N., Bryant, A.L., Olausson, J. (2019) Hyperglycemia and cancer: a state the science review. *Oncol Nurs Forum*. **46**(4), 459-472.
- Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkanen, H., Poutanen, K. (2010) Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int J Mol Sci*. **11**, 1365-1402.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2001) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*. **13**, 572-584.
- Hodge, C., Lebenthal, E., Lee, P.C., Topper, W. (1983) Amylase in the saliva and in the gastric aspirates of premature infants: its potential role in glucose polymer hydrolysis. *Pediatr Res*. **17**, 998-1001.
- Iwao, Y., Anraku, M., Hiraike, M., Kawai, K., Nakajou, K., Kai, T., (2006) The structural and pharmacokinetic properties of oxidized human serum albumin, advanced oxidation protein products (AOPP). *Drug Metab Pharmacokinet*. **21**, 140-146.
- Joshi, S.R., Parikh, R.M., Das, A.K. (2007) Insulin-history, biochemistry, physiology and pharmacology. *J Assoc Physicians India*. **55**, 19-25.
- Kawahito, S., Kitahata, H., Oshita, S. (2009) Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia induced oxidative stress. *World J Gastroenterol*. **15**, 4137-4142.
- Kawakami, K., Aketa, S., Nakanami, M., Iizuka, S., Hirayama, M. (2010) Major water-soluble polyphenols, proanthocyanidins in leaves of persimmon (*Diospyros kaki*) and their α -amylase inhibitory activity. *Biosci Biotechnol Biochem*. **74**, 1380-1385.
- Khoddami, A., Wilkes, M.A., Roberts, T.H. (2013) Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*. **18**, 2328-2375.
- Kido, Y., Nakae, J., Accii, D. (2001) Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. *J Clin Endocrinol Metab*. **86**, 972-979.
- Kim, Y., Keogin, J.B., Clifton, P.M. (2016) Polyphenols and glycemic control. *Nutrients*. **8**, 17.
- Kimura, T., Nakagawa, K., Kubota, H., Kojima, Y., Goto, Y., Yamagishi, K., Oita, S., Oikawa, S., Miyazawa, T. (2007) Food-grade mulberry power enriched with 1-deoxynojirimycin suppresses the elevation of postprandial blood glucose in human. *J Agric Food Chem*. **55**, 5869-5874.
- Kobayashi, Y., Suzuki, M., Hideo, S., Arai, S., Yukihiro, H., Suzuki, K., Miyamoto, Y., Shimizu, M. (2000) Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependant glucose

transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. *J Agric Food Chem.* **48**, 5618-5623.

- Krokmaz, G.G., Altinoglu, E., Civelek, S., Sozer, V., Erdenen, F., Tabak, O., Uzun, H. (2013) The association of oxidative stress markers with conventional risk factors in the metabolic syndrome. *Metabolism.* **62**, 828-835.
- Kural, A., Toker, A., Seval, H., Döventaş, Y., Basihoğlu, F., Koldaş, M., Sağlam, Z.A. (2011) Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with insulin dependent diabetes mellitus and first degree relatives. *Med J Bakirköy.* **7**, 130-135.
- Li, S., Tan, H.Y., Wong, N., Cheung, F., Hong, M., Feng, Y. (2018) The potential and action mechanism of polyphenols in the treatment of liver diseases. *Oxid Med Cell Longev.* **18**, 1-25.
- Liu, S., Yu, J., Guo, S., Fang, H., Chang, X. (2020) Inhibition of pancreatic α -amylase by *Lonicera caerulea* berry polyphenols *in vitro* and their potential as hyperglycemic agents. *LWT.* **126**, 109288.
- Liu, S.X., Hou, F.F., Guo, Z.J., Nagai, R., Zhang, W.R., Liu, Z.Q., Zhou, M.Z., Zhou, M., Xie, D., Wang, G.B., Zhang, X. (2006) Advanced oxidation protein products accelerate atherosclerosis through promoting oxidative stress and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Bio.* **26**, 1156–1162.
- Lovrić V, Putnik P, Bursać Kovačević D, Jukić M, Dragović-Uzelac V (2017) Effect of Microwave-Assisted Extraction on the Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Blackthorn Flowers. *Food Technol Biotechnol.* **55**(2), 243-250.
- Low Wang, C.C., Goalstone, M.L., Draznin, B. (2004) Molecular Mechanisms of Insulin Resistance That Impact Cardiovascular Biology. *Diabetes.* **53**, 2735-2740.
- Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr A.L. (1951) Protein measurement with the Folin–phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**, 265–275.
- Mai, T.T., Chuyen, N.V. (2007) Anti-hyperglycemic activity of an aqueous extract from flower buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb .) Merr and Perry. *Biosci Biotechnol Biochem.* **71**, 69-76.
- Maino Vieytes, C.A., Taha, H.M., Burton-Obanla, A.A., Douglas, K.G., Arthur, A.E. (2019) Carbohydrate Nutrition and the Risk of Cancer. *Curr Nutr Rep.* **8**, 230-239.
- Manzano, S., Williamson, G. (2010) Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. *Mol Nutr Food Res.* **54**, 1773-1780.
- Marchelak, A., Owczarek, A., Matczak, M., Pawlak, A., Kolodziejczyk-Czepas, J., Nowak, P., Olszewska, M.A., (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. *Front Pharmacol.* **8**, 680.

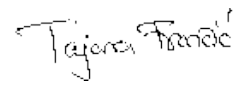
- Mills, S., Stanton, C., Lane, J.A., Smith, G.J., Ross, R.P. (2019) Precision nutrition and the microbiome, Part 1: current state of the science. *Nutrients.* **11**, 923.
- Miura, T., Ueda, N., Yamada, K., Fukushima, M., Ishida, T., Kaneko, T., Matsuyama, F., Seino, Y. (2006) Antidiabetic effects of corosolic acid in KK-Ay diabetic mice. *Biol Pharm Bull.* **29**, 585-587.
- Mohamed Yusof, N.L., Zainalabidin, S., Fauzi, N.M., Budin, S.B. (2018) *Hibiscus sabdariffa* (roselle) polyphenol-rich extract averts cardiac functional and structural abnormalities in type 1 diabetic rats. *Appl Physiol Nutr Metab.* **43**, 1224-1232.
- Nijveldt, R.J., Nood, E.V., van Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., van Norren, K., van Leeuwen, P.A.M., (2001) Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* **74**, 418-425.
- Nishi, M., Sanke, T., Nagamatsu, B., Bell, G.I., Steiner, D.F. (1990) Islet amyloid polypeptide. A new beta cell secretory product related to islet amyloid deposits. *J Biol Chem.* **265**, 4173-4176.
- Olszewska, M., Wolbis, M. (2000) Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Herba Polon Pharm.* **46**, 234-249.
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* **2(5)**, 270-278.
- Pinacho, R., Cavero, R. Y., Astiasarán, I., Ansorena, D., Calco, M. I. (2015) Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa*, L.) and influence of *in vitro* digestion on their antioxidant capacity. *J Funct Foods.* **19**, 49-62.
- Piwowar, A., Knapik-Kordecka, M., Szezecińska, J., Warwas, M. (2008) Plasma glycooxidation protein products in type 2 diabetic patients with nephropaty. *Diabetes Metab ResRev.* **24**, 549-553.
- Popescu, I., Caudullo, G. (2016) *Prunus spinosa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. U: European Atlas of Forest Tree Species, (San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. ured.), European commission, Luxembourg, str. 145.
- Qi, X., Tester, R.F. (2019) Fructose, galactose and glucose- in health and disease. *Clin Nutr ESPEN.* **33**, 18-28.
- Qin, B., Dawson, H.D., Schoene, N.W., Polansky, M.M., Anderson, R.A. (2012) Cinnamon polyphenols regulate multiple metabolic pathways involved in insulin signaling and intestinal lipoprotein metabolism of small intestinal enterocytes. *Nutrition.* **28**, 1172-1179.

- Ramlagan, P., Rondeau, P., Planesse, C., Neerghen-Bhojun, V.S., Bourdean, E., Bahorun, T. (2017) Comperative suppressing effects of black and green teas on the formation of advanced glycation and products (AGEs) formation and AGEs-induced oxidative stress. *Food Funct.* **8**, 4194-4209.
- Rasouli, H., Hasseini-Ghazuini, S.M.-B., Adibi, H., Hhodarahmi, R. (2017) Differential α -amylase/ α -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes. *Food Funct.* **8**, 1942.
- Rowley, T.J., Bitner, B.F. Ray, J.D., Lathen, D.R., Smithson, A.T., Dallom, B.W., Plowman, C.J., Bikman, B.T., Hensen, J.M., Darenkott, M.R. (2017) Monomeric cocoa catechins enhance β -cell function by increasing mitochondrial respiration. *J Nuatr Biochem.* **49**, 30-41.
- Seino, S., Zhang, C.L., Shibasaki, T. (2010) Sulfonylurea action re-revisited. *J Diabetes Investig.* **1**, 37-39.
- Selmeçi, L. (2011) Advanced oxidation protein products (AOPP): novel uremic toxins, or components of the non-enzymatic antioxidant system of the plasma proteome) *Free Radic Res.* **45**, 1115-1123.
- Shakya, A., Chaudary, S.K., Garabadu, D., Bhat, H.R., Kakoti, B.B., Ghosh, S.K. (2020) A comprehensive review on preclinical diabetic models. *Curr Diabetes Rev.* **16**, 104-116.
- Simon, K., Witmann, I. (2019) Can blood value really be referred to as a metabolic parameter? *Rev Endocr Metab Disord.* **20(2)**, 151-160.
- Smirčić-Duvnjak, L. (2004) Patofiziologija metaboličkog sindroma. *Medicus.* **13**, 15-25.
- Smith, M., Morton, D. (2010) The digestive system, 2.izd., Churchill Livingstone, Birmingham, str. 129-152.
- Song, J., Kwon, O., Chen, S., Daruwala, R., Eck, P., Park, J.B., Levine, M. (2002) Flavonoid inhibition of SVCT1 and GLUT2, intestinal transporters for vitamin C and glucose. *J Biol Chem.* **277**, 15252-15260.
- Strugala, P., Dzydzan, O., Brodyak, I., Kucharska, A.Z., Kuropka, P., Liuta, M., Kaleta-Kuratewicz, K., Przewodowska, A., Michalowska, D., Gabrielska, J., Sybirna, N. (2019) Antidiabetic and antioxidative potential of the blue congo variety of purple potato extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Molecules.* **24**, 3126. doi: 10.3390/molecules24173126.
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., matsuoaka, T. (2006) Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol.* **52**, 149-153.

- Togashi, Y., Shirakawa, J., Okuyama, T., Yamazaki, S., Kyohara, M., Miyazawa, A., Suzuki, T., Hamada, M., Terauchi, Y. (2016) Evaluation of the appropriateness of using glucometers for measuring the blood glucose level in mice. *Sci Rep.* **6**, 25465.
- 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
- Weber, D., Davies, M.J., Grune, T. (2015) Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: focus on sample preparation and derivatization conditions. *Redox Biol.* **5**, 367– 380.
- Welsch, C.A., Lachance, P.A., Wasserman, B.P. (1989) Dietary phenolic compounds: inhibition of Na⁺- dependent D-glucose uptake in rat intestinal brush border membrane vesicles. *J Nutr.* **119**, 1698-1704.
- Wilcox, G. (2005) Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev.* **26(2)**, 19-39.
- Yari, Z., Behrooz, V., Zand, H., Pourvali, K. (2019) New insight into diabetes management: from glycemic index to dietary insulin index. *Curr Diabetes Rev.* **16**, 293-300.
- Zakowski, J.J., Bruns, D.E. (1985) Biochemistry of human alpha amylase isoenzymes. *Crit Rev Clin Lab Sci.* **4**, 283-322.
- Zhao, L., Wang, L., Zhang, Y., Xiao, S., Bi, F., Zhao, J., Gai, G., Ding, J. (2017) Glucose oxidase-based glucose-sensitive drug delivery for diabetes treatment. *Polymers.* **9(7)**, 255. doi: 10.3390/polym9070255
- Zheng, Y.X., Tian, J.H., Yang, W.H., Chen, S.G., Liu, D.H., Fang, H.T., Zhang, H.L., Ye, X.Q. (2020) Inhibition mechanism of ferulic acid against α -amylase and α -glucosidase. *Food Chem.* **317**, 126346.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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



Tajana Frančić