

# Učinak bioaktivnih molekula iz ekstrakta cvijeta *Prunus spinosa* L. na biodostupnost, oksidacijski stres i hiperglikemiju u miša C57BL/6

---

Crnić, Irena

Doctoral thesis / Disertacija

2021

*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:159:861519>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-03**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Irena Crnić

**UČINAK BIOAKTIVNIH MOLEKULA IZ  
EKSTRAKTA CVIJETA *PRUNUS  
SPINOSA* L. NA BIODOSTUPNOST,  
OKSIDACIJSKI STRES I  
HIPERGLIKEMIJU U MIŠA C57BL/6**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2021.



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Irena Crnić

**UČINAK BIOAKTIVNIH MOLEKULA IZ  
EKSTRAKTA CVIJETA *PRUNUS  
SPINOSA* L. NA BIODOSTUPNOST,  
OKSIDACIJSKI STRES I  
HIPERGLIKEMIJU U MIŠA C57BL/6**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Prof. dr. sc. Irena Landeka Jurčević

Prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Zagreb, 2021.



University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Irena Crnić

**INFLUENCE OF BIOACTIVE  
MOLECULES FROM *PRUNUS SPINOSA*  
L. FLOWER EXTRACT ON  
BIOAVAILABILITY, OXIDATIVE STRESS  
AND HYPERGLYCEMIA IN C57BL/6  
MICE**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

PhD Irena Landeka Jurčević, Full Professor

PhD Domagoj Đikić, Full Professor

Zagreb, 2021.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu održanoj dana 27.02.2020. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o odobravanju pokretanja postupka stjecanja doktora znanosti u okviru doktorskog studija na sjednici održanoj 26.05.2020.

Ovo istraživanje financirano je sredstvima znanstvenih projekata:

- “Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane (IP-PE-FF)”, Hrvatska zaklada za znanost - HRZZ (2014.-2018.)
- “Bioaktivne molekule ljekovitog bilja kao prirodni antioksidansi, mikrobiocidi i konzervansi“ (KK.01.1.1.04.0093) koji je sufinanciran sredstvima Europske unije iz Europskog fonda za regionalni razvoj. Program: Ulaganje u znanost i inovacije; Operativni program Konkurentnost i kohezija 2014.-2020.

## Informacije o mentoru 1: **Prof. dr. sc. Irena Landeka Jurčević**

Irena Landeka Jurčević doktorsku disertaciju pod naslovom "Primjena proteinskog inženjerstava u pripravi seril-tRNA-sintetaza promijenjene strukture i funkcije" obranila je 1999. godine pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Weygand Đurašević sa Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Znanstveni opus prof. dr. sc. Irene Landeka Jurčević obuhvaća područje biokemijskih mehanizmima biosinteze proteina u kvascu, posebice tRNA sintetazama i primjenom spoznaja o njihovim mehanizmima djelovanja u biotehnoškoj svrhe (stariji radovi). Noviji radovi bave se biokemijskim učinkom biološki aktivnih molekula hrane u organizmu. Trenutno se bavi određivanjem biodostupnosti fitonutrijenata *in vivo* na animalnim modelima, istraživanjima oksidacijskog stresa, hiperkolesterolemije, dijabetesa, istraživanjem bioaktivnih molekula kao prirodnih antioksidansa i mikrobicida.

Objavila je više od 50 znanstvenih radova, pri čemu su isti citirani više od 500 puta a h-index: 12. Na međunarodnim i domaćim znanstvenim skupovima sudjelovala je s više od 80 radova.

Kao istraživač sudjelovala je ili sudjeluje u provedbi nacionalnih projekata: 10 znanstvenih projekata Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH; na projektu koji je financiran iz strukturnih fondova EU (u sklopu programa 2007.-2013., u okviru poziva "Jačanje kapaciteta za istraživanje, razvoj i inovacije"); projektu koji je sufinanciran od strane Vlade RH i Europske unije kroz Europski fond za regionalni razvoj - Operativni program Konkurentnost i kohezija; 2 projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ); projekt Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti (HAZU). Sudjelovala je kao istraživač i na međunarodnim znanstvenim projektima: Transfer RNA Recognition by Class II Synthetases, PA-91-77 NIH/FIRCA International Research Collaboration Awards (1993.-2000.); Protein engineering of aminoacyl-tRNA synthetases, GE/GLO/90/004 International Research Collaboration Awards, Grants from International Center for Genetics Engineering and Biotechnology (1995.-1998.); Evolution of determinants in seryl-tRNA synthesis, Grants from International Center for Genetics Engineering and Biotechnology (1999.-2002.); X-ray crystallographic and biochemical studies of unusual archaeal seryl-tRNA synthetases, SCOPES, ETH, Zürich (2001.-2003.); Seryl-tRNA synthetases: Evolution and Diversity, 1 RO3 TW01467-01, NIH/FIRCA-Fogarty International Research Collaboration Awards (FIRCA) (2001.-2004.); Projekt EU - Bilateralni project, Biološko i ekotoksikološko istraživanje obalnog područja Hrvatske i Crne Gore – BIOECO CROMON (2015.-2017.).

Prof. dr. sc. Irene Landeka Jurčević sudjeluje u nastavi obaveznih i izbornih modula na PBF-u: Kemija i biokemija hrane, Biokemija 1, Pročišćavanje i karakterizacija proteina, Proteinsko inženjerstvo. Na Poslijediplomskom sveučilišnom doktorskom studiju: Biotehnologija i Bioproceno inženjerstvo, Prehrambena tehnologija i Nutricionizam koordinator je modula "Biokemijska funkcija i nutritivni značaj vitamina i minerala u prehrani". Kao gostujući profesor bila je nositelj predmeta "Biokemija 2" na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, te na Agronomskom i prehrambeno tehnološkom fakultetu, Sveučilišta u Mostaru, BIH. Autorica je dva recenzirana nastavna materijala (Kemija i biokemija hrane te Proteinsko inženjerstvo).

Na PBF-u član je Povjerenstva za studentske radove i rektorovu nagradu od 2011. do 2019.; Predsjednica odbora za izvannastavne aktivnosti studenata od 2019-2021.; članica je Vijeća biotehničkog područja od 2021.- danas.

Od 1994. godine članica je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju (HDBMB) gdje od 2001. do 2014. godine obnaša dužnost člana Predsjedništva, a od 2001. do 2010. i rizničarke društva, od 2020-danas je član Povjerenstva za odnose s javnošću HDBMB.

Uz navedene aktivnosti prof. dr. sc. Irena Landeka Jurčević bila je i članica znanstvenog i/ili programskog odbora znanstvenog skupa 9 međunarodnih ili domaćih znanstvenih skupova. Dobitnica je Priznanja za dugogodišnju uspješnu suradnju i izvanredan doprinos na promicanju visokog obrazovanja, znanosti i struke Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta 2006. godine.



## Informacije o mentoru 2: **Prof. dr. sc. Domagoj Đikić**

Redoviti profesor dr. sc. Domagoj Đikić, radi na Biološkom odsjeku, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (PMF), Sveučilišta u Zagrebu od 2000. godine. U Zavodu za animalnu fiziologiju, Biološkog odsjeka PMF-a, u zvanje redovitog profesora izabran je 2018. godine. Doktorirao je na istom fakultetu, obranom doktorske disertacije „Učinak prometrina na odnose serumskih i tkivnih enzimatskih biomarkera u miša“, pod vodstvom profesora Oskara Springera. Nakon doktorata usavršavao na Sveučilištu Phillipsuniversität u Marburgu, Njemačka na Zavodu za animalnu fiziologiju i fiziologiju metabolizma u sklopu vlastitog postdokorskog projekta „Uloga glikolipida gangliozida i lipidnih splavi u stanjima hibernacije, torpora, hipometabolizma i suspendirane animacije kralješnjaka“, financiranog od Hrvatske zaklade za znanost. Znanstveni interes, uz modelnih biomedicinskih istraživanja na laboratorijskim životinjama i staničnim modelima u području fiziologije, toksikologije i metabolizma, proširio je istraživanjima fizioloških i molekularnih mehanizama i promjena u organizmu uvjetovanih različitim vrstama prehrane. Od zaposlenja na Prirodoslovno matematičkom fakultetu vodi i sudjeluje u izvođenju nastave iz kolegija Animalna fiziologija, Neurofiziologija, Fiziologija čovjeka, Toksikologija okoliša, Fiziološki mehanizmi u toksikologiji, Fiziologija endokrinog sustava i reprodukcije, Neuroimunologija, Fiziologija oksidativnog stresa u ljudi i životinja i Fiziologija metabolizma i bioenergetike. Na matičnom fakultetu obnašao je brojne voditeljske dužnosti od kojih se ističu voditeljstva studijskih programa i povjerenik Biološkog odsjeka PMF-a za međunarodnu suradnju. Na drugim institucijama, nositelj je kolegija Osnove biologije za studente psihologije na Filozofskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu od 2009. godine. Vodio je kolegij Fiziologija čovjeka na Prehrambeno biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (2009-2017.). Izabrani je predavač na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu gdje je od 2006. godine predavao kolegije Fiziologija čovjeka i Osnove ekologije. Vodio je 5 doktorskih disertacija i više od 40 magistarskih diplomskih i završnih radova od kojih je jedan nagrađen rektorovom nagradom. Objavio je radove u koautorstvu sa studentima i doktorantima. Sudjelovao je na 14 projekata (10 nacionalnih i 4 međunarodna), financiranih od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH, strukturnih fondova EU (u sklopu programa 2007.-2013., u okviru poziva "Jačanje kapaciteta za istraživanje, razvoj i inovacije") i Vlade RH i Europske unije kroz Europski fond za regionalni razvoj - Operativni program Konkurentnost i kohezija, Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) i Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti (HAZU). Vodio je 3 domaća i 1 međunarodni projekta. Voditelj je stručnog projekt PMF-a i Ministarstva zdravstva RH i PMF-

a „Ocjena biocidnih pripravaka“ i suradnik je u projektu Centra izvrsnosti Hrvatskog instituta za istraživanje mozga. Autor je i koautor preko 70 znanstvenih radova prema bazama WoS i Scopus, od toga je 40 radova objavljeno u kvartilima iznad medijana područja (Q1,Q2), i citirani su iznad 700 puta, h-index: 16. Baza Googl Scholar citira ga 1213 puta, h-index 21. Koautor ili autor je 10 poglavlja u knjigama i priručnicima. Prezentirao je više od 80 radova na znanstvenim skupovima, od toga 40 međunarodnih. Urednik je u časopisu Archives of Industrial Hygiene and Toxicology. Sudjeluje u radu 5 strukovnih društava: Hrvatskog društva za neuroznanost, Hrvatskog društva fiziologa, Hrvatskog društva biokemičara i molekularnih biologa, Hrvatskog genetičkog društva, Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama gdje je obnašao dužnost člana predsjedništva. Član je državnog Bioetičkog povjerenstva za dobrobit životinja i predsjednik je je Bioetičkog povjerenstva za dobrobit životinja na Prirodoslovno matematičkom fakultetu.

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem se svojim mentorima, prof. dr. sc. Ireni Landeka Jurčević i prof. dr. sc. Domagoju Đikiću na stručnom vodstvu, podijeljenom znanju, savjetima i podršci tijekom izrade i pisanja ovoga rada. Hvala im na otvorenosti i što su mi omogućili da zaista uvijek mogu dobiti odgovore na svoja pitanja. Zahvalna sam im za poticajnu radnu okolinu i uvijek ugodnu i pozitivnu atmosferu.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj profesorici Ireni Landeka Jurčević, na nesebičnoj podršci, motivaciji, pomoći i otvorenim vratima tijekom cijelog doktorskog studija. Hvala joj na vremenu i volji koje je mi je posvetila i tako u svakom smislu oplemenila moje studiranje i proširila mi vidike. Hvala joj od srca što je na bezbroj načina doprinijela mojim uspjesima.*

*Zahvaljujem se zaposlenicima Zavoda za animalnu fiziologiju, Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta za stručnu i tehničku pomoć pri izradi ovoga rada.*

*Zahvaljujem se dr.sc. Sandri Pedisić i dr.sc. Zoranu Zoriću za pomoć pri izradi UPLC-MS/MS analiza.*

*Neizmjerne se zahvaljujem svojim dragim roditeljima na potpori i volji da mi u svakom trenutku pruže oslonac i pažnju. Hvala im što su mi uvijek omogućili da se bezbrižno bavim onime što volim.*

*Na kraju posebna zahvala ide mome Matiji za neiscrpnu motivaciju, strpljenje, ljubav i spremnost da me ohrabruje, uveseljava i podržava. Hvala mu na nepokolebljivoj vjeri i volji u ovo putovanje koje je, na mnoge načine, oblikovalo i obogatilo naše zajedničke godine.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Poslijediplomski sveučilišni studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam

UDK: 547.56:577.175.72:582.639.41: 612.122:616.379 008.64(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Nutricionizam

## UČINAK BIOAKTIVNIH MOLEKULA IZ EKSTRAKTA CVIJETA *PRUNUS SPINOSA* L. NA BIODOSTUPNOST, OKSIDACIJSKI STRES I HIPERGLIKEMIJU U MIŠA C57BL/6

Irena Crnić, mag.ing.techn.aliment.

**Rad je izrađen:** Laboratorij za kemiju i biokemiju hrane, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu i Laboratorij za fiziologiju i toksikologiju, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

**Mentori:** Prof. dr. sc. Irena Landeka Jurčević; Prof. dr. sc. Domagoj Đikić

### Kratki sažetak

Hiperglikemija je metabolički poremećaj karakteriziran kroničnom povišenom glukozom u krvi kao rezultat nedovoljnog ili nepravilnog lučenja inzulina, te nizom sekundarnih komplikacija. Mnogi biljni pripravci bogati polifenolima imaju dokazan hipoglikemijski i antioksidacijski potencijal putem različitih mehanizama djelovanja. U ovome radu su istraženi *in vivo* učinci polifenola iz ekstrakta cvijeta *Prunus spinosa* L. (ECT) na biodostupnost, biljege oksidacijskog stresa, antioksidacijske enzime te utjecaj na glikemijske parametre, u normalnog i hiperglikemijskog C57BL/6 miša, tijekom 10 dana eksperimenta. Miševi su bili podijeljeni u 4 skupine, 1. Kontrola (K), 2. Normoglikemija (ECT), 3. Hiperglikemija (AL, izazvana aloksanom), 4. Hiperglikemija (AL+ECT). Dobiveni rezultati sugeriraju da polifenoli kao i njihovi metaboliti iz ECT u tkivima jetre i bubrega povećavaju aktivnost antioksidacijskih enzima (SOD, GSH, CAT) te snižavaju biljege oksidacijskog stresa (MDA, AOPP) u hiperglikemijskoj skupini koja je tretirana sa ECT u odnosu na netretiranu hiperglikemijsku skupinu (AL). Rezultati analize glikemijskih parametara ukazuju na inhibitorno djelovanje na aktivnost  $\alpha$ -amilaze, poboljšanu toleranciju glukoze (OGTT), sniženu glukozu u krvi na tašte te poboljšano lučenje inzulina u skupini AL+ECT u odnosu na AL skupinu, što se pripisuje djelovanju polifenola i njihovih metabolita iz ECT. Dobiveni rezultati mogu doprinijeti razumijevanju utjecaja polifenola iz ECT na oksido-redukcijski i glikemijski status kod oboljelih od hiperglikemije te kao potencijalna suportivna terapija u cilju postizanja bolje glikemijske kontrole i prevencije sekundarnih komplikacija kronične hiperglikemije.

**Broj stranica:** 170

**Broj tablica:** 7

**Broj slika:** 68

**Broj literaturnih navoda:** 251

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:**  $\alpha$ -amilaza, biodostupnost, hiperglikemija, inzulin, OGTT, ROS, *Prunus spinosa* L.

**Datum obrane:** 16.12.2021.

### Stručno povjerenstvo za obranu

dr. sc. Verica Dragović-Uzelac, redoviti profesor

dr. sc. Ivana Kmetič, redoviti profesor

dr. sc. Nada Oršolić, redoviti profesor

**Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, i u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb i Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb

PhD Thesis

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Postgraduate study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition

UDK: 547.56:577.175.72:582.639.41: 612.122:616.379 008.64(043.3)

Scientific Area: Biotechnical Sciences

Scientific Field: Nutrition

### INFLUENCE OF BIOACTIVE MOLECULES FROM *PRUNUS SPINOSA* L. FLOWER EXTRACT ON BIOAVAILABILITY, OXIDATIVE STRESS AND HYPERGLYCEMIA IN C57BL/6 MICE

Irena Crnić, mag.ing.techn.aliment.

**Thesis performed:** Laboratory for Food Chemistry and Biochemistry, Faculty of Food Tehcnology and Biotechnology, University of Zagreb and Laboratory for Animal Physiology and Toxicology, Faculty of Science, University of Zagreb.

**Supervisors:** PhD Irena Landeka Jurčević, Full professor; PhD Domagoj Đikić, Full professor

#### Short abstract

Hyperglycemia is a metabolic disorder characterized by chronically elevated blood glucose which is a result of insufficient or improper insulin secretion as well as a multitude of secondary complications. Many plant sources rich in polyphenols have a proven hypoglycemic and antioxidant effect through various mechanism. In this thesis the following were examined during a 10 day *in vivo* experimentation of the effect of polyphenols from *Prunus spinosa* L. flower extract (ECT) on C57BL/6 mice: bioavailability, influence on biomarkers of oxidative stress, antioxidant enzymes and glyceimic parameters. Mice were divided into 4 groups: 1. Control (K), 2. Normoglycemic group (ECT), 3. Hyperglycemic group (AL, alloxan-induced), 4. Hyperglycemic group (AL+ECT). The given results suggest that polyphenols as well as their metabolites from ECT in liver and kidney tissue increase the activity of antioxidant enzymes (SOD, GSH, CAT) and lower the biomarkers of oxidative stress (MDA, AOPP) in the hyperglycemic group treated with ECT relative to the untreated hyperglycemic group (AL). Analysis results of glyceimic parameters indicate an inhibitory effect on  $\alpha$ -amylase activity, improved glucose tolerance (OGTT), decreased fasting blood glucose and increased insulin secretion in the AL+ECT group compared to the AL group, which is attributed to the efficiency of polyphenols and their metabolites from ECT. The obtained results can contribute to understanding the influence of polyphenols from ECT on the oxidative and glyceimic status in patients with hyperglycemia and as a potential supportive therapy in order to achieve better glyceimic control and prevention of secondary complication from chronic hyperglycemia.

**Number of pages:** 170 pages

**Number of tables:** 7

**Number of figures:** 68

**Number of references:** 251

**Original in:** Croatian

**Key words:**  $\alpha$ -amylase, bioavailability, hyperglycemia, insulin, OGTT, ROS, *Prunus spinosa* L.

**Date of the thesis defence:** 16<sup>th</sup> of December 2021

#### Reviewers:

PhD Verica Dragović-Uzelac, Full Professor

PhD Ivana Kmetič, Full Professor

PhD Nada Oršolić, Full Professor

**Thesis deposited in:** Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb and University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14.

## SAŽETAK

Hiperglikemija je metabolički poremećaj karakteriziran kroničnom povišenom glukozom u krvi kao rezultat nedovoljnog ili nepravilnog lučenja inzulina, te nizom sekundarnih komplikacija kao što su kardiovaskularne, bubrežne, neurološke i druge. Oksidacijski stres kao stanje narušene ravnoteže između stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i učinkovitosti antioksidanasa da iste neutraliziraju, djeluje tako da dolazi do oštećenja proteina, lipida, DNA. Sve je više znanstvenih dokaza kako su sekundarne komplikacije hiperglikemije direktno povezane sa oksidacijskim stresom izazvanim stvaranjem slobodnih radikala. Upravo zato antioksidansi imaju važnu ulogu u obrani organizma od oštećenja uzrokovanih kisikovim radikalima, kao i oštećenja koja su posljedica dugotrajnoj izloženosti hiperglikemiji, primjerice oštećenja na krvnim žilama. Endogeni antioksidativni enzimi, glutathion peroksidaza, katalaza, superoksid dismutaza, odgovorni su za obranu od djelovanja slobodnih radikala. Mnogi biljni pripravci bogati polifenolima imaju dokazan hipoglikemijski i antioksidacijski potencijal putem različitih mehanizama djelovanja.

Trnina (*Prunus spinosa* L.) je tradicionalna biljka korištena u fitoterapiji, bogati je izvor polifenola, a posebno fenolnih kiselina, flavonoida, antocijanina, flavonola i flavan-3-ola. Prema ranijim istraživanjima korištena je u narodnoj medicini u terapeutske svrhe pri poremećajima urinarnog sustava, upala, čišćenja krvi, terapija kardiovaskularnih i gastrointestinalnih bolesti. Ljekovitost je posebno pripisana cvjetovima trnine, kao bogatom izvoru flavonoida. Ekstrakt cvijeta trnine sadrži velik udio bioaktivnih molekula, uglavnom polifenola, kojima se pripisuju antioksidativna i antimikrobna aktivnost.

Mehanizmi hipoglikemijskog djelovanja polifenola u stanju hiperglikemije su višestruki: pojačavaju funkciju  $\beta$ -stanica gušterače, potiču proliferaciju  $\beta$ -stanica gušterače te povećavaju osjetljivost perifernih tkiva na inzulinsku modifikacijom upalnih procesa i oksidativnog stresa. Polifenoli inhibiraju probavne enzime uključene u razgradnju ugljikohidrata, inhibiraju apsorpciju glukoze u gastrointestinalnom traktu i modificiraju metabolizam energije. Antihiperglikemijski učinak polifenola ogleda se osim u staničnim signalnim putevima i u inzulinski ovisnim i neovisnim putevima, kao što je modifikacija glukagonu sličnog peptida (GLP-1), i modifikaciji endogenih antioksidanasa.

U ovome radu su istraženi in vivo učinci polifenola iz ekstrakta cvijeta *Prunus spinosa* L. na biodostupnost, biljege oksidacijskog stresa, antioksidacijske enzime te utjecaj na glikemijske parametre, u normalnog i hiperglikemijskog C57BL/6 miša, tijekom 10 dana eksperimenta. Miševi su bili podijeljeni u 4 skupine, 1. Kontrolna (K), 2. Normoglikemijska

skupina tretirana sa ekstraktom cvijeta trnine (ECT), 3. Hiperglikemijska skupina (AL), 4. Hiperglikemijska skupina tretirana sa ECT (AL+ECT). Dobiveni rezultati sugeriraju da polifenoli i to najprije oni u formi glikozida iz ECT u tkivima jetre i bubrega povećavaju aktivnost antioksidacijskih enzima (SOD, GSH, CAT) te snižavaju biljege oksidacijskog stresa (MDA, AOPP) u hiperglikemijskoj skupini koja je tretirana sa ECT (AL+ECT) u odnosu na netretiranu hiperglikemijsku skupinu (AL). Rezultati analize glikemijskih parametara ukazuju na inhibitorno djelovanje na aktivnost  $\alpha$ -amilaze, poboljšanu toleranciju glukoze (OGTT), sniženu glukozu u krvi na tašte te poboljšano lučenje inzulina u tretiranoj hiperglikemijskoj skupini u odnosu na hiperglikemijsku skupinu koja nije tretirana, što se pripisuje djelovanju polifenola i njihovih metabolita iz ECT. Dosadašnja istraživanja pokazuju korelaciju između antidijabetičkog i antiradikalnog učinka polifenola na način da hipoglikemijski učinak iz polifenola utječe pozitivno na sposobnost hvatanja slobodnih radikala, to uspješnije što je biodostupnost toga spoja veća.

Dobiveni rezultati mogu doprinijeti razumijevanju utjecaja polifenola iz ECT na oksido-redukcijski i glikemijski status kod oboljelih od hiperglikemije te kao potencijalna suportivna terapija u cilju postizanja bolje glikemijske kontrole i prevencije sekundarnih komplikacija kronične hiperglikemije.

**Ključne riječi:**  $\alpha$ -amilaza, biodostupnost, hiperglikemija, inzulin, OGTT, ROS, *Prunus spinosa* L.

## SUMMARY

Hyperglycemia is a metabolic disorder characterized by chronically elevated blood glucose which is a result of insufficient or improper insulin secretion as well as a multitude of secondary complications such as cardiovascular diseases, nephropathy, neuropathy and so on. Oxidative stress is defined as a disturbance in the balance between the production of free radicals and antioxidant defences which are the main cause of protein, lipid and DNA damage. There is growing scientific evidence that secondary complications of hyperglycemia are directly related to oxidative stress caused by free radicals. That is why antioxidants play an important role in protecting the body from damage caused by oxygen radicals, as well as damage resulting from long-term exposure to hyperglycemia, such as damage to blood vessels. Endogenous antioxidant enzymes, glutathione peroxidase, catalase, superoxide dismutase, are responsible for defending against the action of free radicals. Many plant sources rich in polyphenols have a proven hypoglycemic and antioxidant effect through various mechanism.

Blackthorn (*Prunus spinosa* L.) is a traditional plant used in phytotherapy, it is a rich source of polyphenols, especially phenolic acids, flavonoids, anthocyanins, flavonols and flavan-3-ol. According to previous research, it has been used in folk medicine for therapeutic purposes in disorders of the urinary system, inflammation, blood purification, therapy of cardiovascular and gastrointestinal diseases. Medicinal properties are especially attributed to blackthorn flowers, as a rich source of flavonoids. Blackthorn flower extract has a large amount of bioactive molecules, mainly polyphenols, which are attributed to antioxidant and antimicrobial activity.

The mechanisms of hypoglycemic effect of polyphenols in hyperglycemia are multiple: they enhance pancreatic  $\beta$ -cell function, stimulate pancreatic  $\beta$ -cell proliferation, and increase peripheral tissue sensitivity to insulin by modifying inflammatory processes and oxidative stress. Polyphenols inhibit digestive enzymes involved in the breakdown of carbohydrates, inhibit glucose absorption in the gastrointestinal tract, and modify energy metabolism. The antihyperglycemic effect of polyphenols is reflected not only in cellular signaling pathways but also in insulin-dependent and independent pathways, such as modification of glucagon-like peptide (GLP-1), and modification of endogenous antioxidants.

In this study, the *in vivo* effects of polyphenols from *Prunus spinosa* L. flower extract on bioavailability, markers of oxidative stress, antioxidant enzymes, and effects on glycemic parameters in normal and hyperglycemic C57BL/6 mice were investigated during 10 days of the experiment.



Mice were divided into 4 groups, 1. Control (K), 2. Normoglycemic group treated with thorn flower extract (ECT), 3. Hyperglycemic group (AL), 4. Hyperglycemic group treated with ECT (AL + ECT). The obtained results suggest that polyphenols, primarily those in the form of glycosides from ECT in liver and kidney tissues, increase the activity of antioxidant enzymes (SOD, GSH, CAT) and reduce the markers of oxidative stress (MDA, AOPP) in the hyperglycemic group treated with ECT + ECT relative to untreated hyperglycemic group (AL). The results of the analysis of glycemic parameters indicate an inhibitory effect on  $\alpha$ -amylase activity, improved glucose tolerance (OGTT), decreased fasting blood glucose and improved insulin secretion in the treated hyperglycemic group compared to the untreated hyperglycemic group, which is attributed to their metabolites from ECT. Previous research has shown a correlation between the antidiabetic and antiradical effects of polyphenols in such a way that the hypoglycemic effect of polyphenols has a positive effect on the ability to capture free radicals, the more successful the bioavailability of this compound.

The obtained results can contribute to the understanding of the influence of polyphenols from ECT on the oxido-reduction and glycemic status in patients with hyperglycemia and as a potential supportive therapy in order to achieve better glycemic control and prevention of secondary complications of chronic hyperglycemia.

**Key words:**  $\alpha$ -amylase, bioavailability, hyperglycemia, insulin, OGTT, ROS, *Prunus spinosa* L.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	<b>3</b>
2.1. TRNINA .....	3
2.1.1. Botanička obilježja.....	3
2.1.2. Biološki aktivne tvari u trnini.....	5
2.2. POLIFENOLI .....	7
2.2.1. Klasifikacija polifenola.....	7
2.2.2. Biosinteza polifenola.....	10
2.2.3. Metabolizam polifenola.....	12
2.2.4. Biodostupnost polifenola.....	14
2.2.5. Biodostupnost pojedinih vrsta polifenola.....	16
2.3. OKSIDACIJSKI STRES, SLOBODNI RADIKALI I ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE ENZIMA I POLIFENOLA.....	18
2.3.1. Oksidacijski stres.....	18
2.3.2. Antioksidativni enzimi .....	22
2.4. DIABETES MELLITUS / HIPERGLIKEMIJA .....	28
2.4.1. Tipovi diabetes mellitusa .....	28
2.4.2. Patofiziologija hiperglikemije .....	31
2.4.3. Pozitivni učinci polifenola u prevenciji komplikacija hiperglikemije .....	33
2.4.4. Građa i metabolizam inzulina .....	36
2.4.5. $\alpha$ -amilaza.....	37
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>39</b>
3.1. MATERIJALI.....	39
3.1.1. Kemikalije .....	39
3.2. METODE.....	40
3.2.1. Pokusne životinje .....	40
3.2.2. Dizajn pokusa .....	41
3.2.3. Određivanje polifenola u ekstraktu cvijeta trnine (ECT).....	44
3.2.4. Određivanje biodostupnosti iz ekstrakta cvijeta trnine u tkivu jetre i bubrega C57BL/6 miša UPLC MS/MS metodom .....	45
3.2.5. Mjerenje biljega oksidacijskog stresa .....	47
3.2.6. Mjerenje glikemijskih parametara.....	54
3.2.7. Statistička obrada podataka .....	58

<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>59</b>
4.1. ISPITIVANJE POZITIVNOG UČINKA EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE <i>PRUNUS SPINOSA</i> L. NA OKSIDACIJSKI STRES I HIPERGLIKEMIJU U MIŠA C57BL/6 .....	59
4.1.1. Biodostupnost polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine u tkivu jetre i bubrega C57BL/6 miša .....	59
4.2. REDOKS STATUS (PROOKSIDATIVNO/ANTIOKSIDATIVNO DJELOVANJE) TKIVA NAKON KONZUMACIJE EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE U NORMALNOM METABOLIZMU I HIPERGLIKEMIJI (ALOKSANSKI MODEL).....	67
4.2.1. Produkti oksidacijskih proteina (AOPP) u tkivima jetre i bubrega.....	67
4.2.2. Lipidna peroksidacija - malondialdehid (MDA) u tkivu jetre i bubrega.....	72
4.2.3. Katalaza (CAT) .....	76
4.2.4. Superoksid dismutaza (SOD).....	80
4.2.5. Glutation (GSH).....	84
4.3. GLIKEMIJA.....	88
4.3.1. Sastav ugljikohidrata u ekstraktu cvijeta trnine (ECT) .....	88
4.3.2. Fiziološka regulacija glukoze u krvi (GUK) nakon konzumacije ekstrakta cvijeta trnine (ECT) u normalnom metabolizmu (normoglikemija) i hiperglikemiji (aloksan model) 89	
4.3.3. Fiziološka regulacija inzulina u serumu nakon konzumacije ekstrakta cvijeta trnine (ECT) u normalnom metabolizmu (normoglikemija) i hiperglikemiji (aloksanski model) 95	
4.3.4. Fiziološka regulacija $\alpha$ -amilaze u serumu nakon tretmana ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u normalnom metabolizmu (normoglikemija) i hiperglikemiji (aloksanski model) 101	
4.3.5. Učinak na oralni glukozni tolerans test (OGTT).....	109
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>119</b>
5.1. BIODOSTUPNOST POLIFENOLA IZ EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE U TKIVIMA JETRE I BUBREGA C57BL/6 MIŠA .....	119
5.2. UČINAK POLIFENOLA IZ (ECT) NA VRIJEDNOSTI BILJEGA OKSIDACIJSKOG STRESA I VRIJEDNOSTI ANTIKOSIDACIJSKIH ENZIMA U TKIVIMA BUBREGA I JETRE U C57BL/6 MIŠA.....	124
5.3. UČINAK NA GLIKEMIJSKE PARAMETRE.....	133
5.3.1. Učinak polifenola iz ECT na koncentraciju glukoze u krvi (GUK).....	133
5.3.2. Učinak na inzulin u serumu.....	138
5.3.3. Učinak na $\alpha$ -AMILAZU.....	140
5.3.4. Učinak na oralni glukozni tolerans test (OGTT).....	142

<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>146</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>147</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>168</b>

## 1. UVOD

Hiperglikemija je najbrže rastući metabolički poremećaj u svijetu, a karakteriziran je kroničnom povišenom glukozom u krvi, kao nizom sekundarnih komplikacija, kardiovaskularnih, bubrežnih, neuroloških i drugih (Guariguata i sur., 2014).

Oksidacijski stres je stanje narušene ravnoteže između stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i učinkovitosti antioksidanasa da iste neutraliziraju, a uzrokuje oštećenja proteina, lipida, DNA. Sve je više znanstvenih dokaza kako su sekundarne komplikacije hiperglikemije direktno povezane sa oksidacijskim stresom izazvanim stvaranjem slobodnih radikala (Furukawa i sur., 2014)

Upravo zato antioksidansi imaju važnu ulogu u obrani organizma od oštećenja uzrokovanih kisikovim radikalima, kao i oštećenja koja su posljedica dugotrajnoj izloženosti hiperglikemiji (primjerice oštećenja na krvnim žilama). Endogeni antioksidativni enzimi, glutathion peroksidaza, katalaza, superoksid dismutaza, a predstavljaju prvu liniju obrane od štetnih djelovanja slobodnih radikala.

Pripravci od biljaka korišteni u terapiji brojnih kroničnih bolesti već su široko poznati u medicini, a zbog svog sadržaja bioaktivnih molekula koje mogu djelovati hipoglikemijski, osobito su od interesa pri liječenju dijabetesa ili komplikacija izazvanih nekontroliranim dijabetesom (Governal i sur., 2018).

Do sada je za više od 400 biljaka utvrđeno da imaju potencijal snižavanja razine glukoze u krvi. Unutar ovih 400 biljaka za mnoge je dokazano da su 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).

Djelovanje polifenola na hiperglikemiju ovisi o njegovoj biodostupnosti. Vrlo često je određeni polifenol u visokoj koncentraciji u biljnom izvoru koji se unosi, međutim, ima nisku biodostupnost *in vivo*. Zato je vrlo važno definirati procese uključene u apsorpciju i bioraspodjelu polifenola, kako bi procijenili *in vivo* učinak bioaktivnih molekula (Bohn, 2014).

*Prunus spinosa* L. je trnovita biljka bogata bioaktivnim molekulama, uglavnom polifenolima, a za koje je dokazano da imaju antioksidativni učinak (Radovanović i sur., 2013, Mikulic-Petovsek i sur., 2016).

U dosadašnjim istraživanjima nema dostupnih znanstvenih radova koji ispituju učinak polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine, na biodostupnost, oksidacijski stres i hiperglikemiju.

Cilj ovog istraživanja je na *in vivo* modelu C57BL/6 miša odrediti biodostupnost polifenola nakon unosa ekstrakta cvijeta trnine zatim antioksidacijski utjecaj polifenola iz ekstrakta na biomarkere oksidacijskog stresa, te glikemijski utjecaj na razinu inzulina,  $\alpha$ -amilazu i razinu glukoze u krvi.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. TRNINA

#### 2.1.1. Botanička obilježja

Današnja istraživanja usmjerena su prema korištenju biljaka i njihovih ekstrakata kao izvora bioaktivnih molekula, u svrhu prevencije i pomoćne terapije kod liječenja kroničnih bolesti, a najčešće kardiovaskularnih bolesti i hiperglikemije, kao vodećih uzroka smrtnosti u svijetu (Franz i sur., 2011). Korištenje različitih biljnih pripravaka u terapiji kroničnih bolesti već je široko poznato u medicini, a posebno zbog hipoglikemijskog potencijala, kao i prevencije sekundarnih komplikacija nastalih zbog hiperglikemije, što se pripisuje njihovom antioksidativnom sastavu i protuupalnom djelovanju (Oršolić i sur., 2011; Marchelak i sur., 2017; Ben Salem i sur., 2017; Yin i sur., 2018; Governa i sur., 2018; Chukwuma i sur., 2019). Trnina (*Prunus spinosa* L.) je tradicionalna biljka korištena u fitoterapiji, bogati je izvor polifenola, a posebno fenolnih kiselina, flavonoida, antocijanina, flavonola i flavan-3-ola (Olszewska i Wolbis, 2001; Mikulić Petkovšek i sur., 2016; Marchelak i sur., 2017, Balta i sur., 2020). Prema ranijim istraživanjima korištena je u narodnoj medicini u terapeutske svrhe pri poremećajima urinarnog sustava, upala, čišćenja krvi, terapija kardiovaskularnih i gastrointestinalnih bolesti (Blumenthal i Busse, 1998; Calvo i Caverro, 2014; Jarić i sur., 2015). Ljekovitost je posebno pripisana cvjetovima trnine, kao bogatom izvoru flavonoida (Poonam, 2011). Kako bi se istražio biološki potencijal trnine, posljednjih godina se provode brojna istraživanja koja su usmjerena na prepoznavanje uloge polifenola, njihove apsorpcije, metabolizma i biodostupnosti iz trnine (cvijet, list, plod, korijen), pripremljenih različitim tehnološkim postupcima, u *in vitro* i *in vivo* uvjetima (Lovrić i sur., 2017, Elez-Garofulić i sur., 2018; Đikić i sur., 2018; Murati i sur., 2019; Balta i sur., 2020). Obzirom na kemijski sastav i mogući hipoglikemijski učinak, trnina ovdje pronalazi svoju potencijalno terapeutsku primjenu.

Trnina pripada porodici Ruža (*Rosaceae*) (Slika 1). Raste na nekultiviranim područjima južne i središnje Europe te dijelom na skandinavskom poluotoku (Vander Mijnsburgge i sur., 2016), na području zapadne Azije i sjeverozapadne Afrike (Ruiz-Rodrigues i sur., 2014 i Popescu i Caudullo, 2016) te na području Švicarskih Alpa na nadmorskim visinama od 1600 m.

Trnina je višegodišnji trnovit i listopadni grm a formira gustu krošnju. Ovisno o klimatskim uvjetima, naraste u visinu 1-5 metara. Sekundarne grane formiraju se u trnove crveno smeđe boje. Pupoljci trnine su crveno smeđe boje a kora je tamno siva.

Lišće je dugo od 2 do 5 cm te od 1 do 2 cm jajolike forme, nazubljenih vrškova, sa dlačicama sa donje strane lista. Peteljke su duge od 0,2 do 1 cm. Cvijetovi su bijeli, od 1 do 1,7 cm širine. Lapovi su jajoliki i nazubljeni. Svaki cvijet ima obično 20 prašnika. Plod je okrugli, koštunjičav, od 1 do 1,5 cm, ljubičaste je boje, a zelene pulpe, kiselog i trpkog okusa. Zrenjem okus ploda postaje sladak, čemu dodatno pridonosi izloženost mrazu (Kavaz-Yuksel, 2015). Cvijetovi se formiraju između ožujka i svibnja, a plod dozrijeva u kasno ljeto i jesen, a ponekad opstaje na biljci tijekom cijele zime (Veličković i sur., 2014; Popescu i Caudullo, 2016).



**Slika 1.** Cvijet trnine (preuzeto od Popescu i Caudullo, 2016)

Trnina je u Europi stanovništvu poznata preko 7000 godina kao voćka, a tek kasnije kao biljka koja ima potencijalne bioaktivne molekule, u cvijetu, listu, plodu. Postoje indikacije za vazoprotektivno, protuupalno, detoksifikacijsko i spazmolitičko djelovanje cvjetova. Koristili su je za jačanje srčanog mišića (Olszewska i Wolbis, 2001; Jarić i sur., 2015; Marchelak i sur., 2017). Mlade grančice su najčešće korištene u svrhu liječenja povišenog krvnog tlaka (Olszewska i Wolbis, 2001; Calvo i Caverro, 2014). Plodovi su uglavnom korišteni u svrhu ubrzanja metabolizma, a također su se pokazali djelotvornima u primjeni pri liječenju ekcema, herpesa, prehlade i alergije (Radovanović i sur., 2013). Konzumacija plodova trnine pokazala se korisnim pri upalama sluznice usta i ždrijela. Ranija istraživanja sugerirala su da flavonoidi iz cvijeta trnine značajno reduciraju kapilarnu permeabilnost i pokazuju protuupalni učinak u životinjskim organima (Guimarães i sur., 2013; Marchelak i sur., 2017).

U prehrambene svrhe, plod se koristi za pripremu džemova, vina, octa, destiliranih alkoholnih napitaka, macerata i likera.



Koristi se i za aromatiziranje i korekciju boje zahvaljujući brojnim aromatskim spojevima i pigmentima (Guimarães i sur., 2013). U medicinske svrhe, cvijeće i latice koriste se kao čaj, sirup, sok ili tinktura kod proljeva, anemije i nekih drugih bolesti. Macerati trnine koriste se u liječenju gastrointestinalnih tegoba na način da se priprema alkoholni napitak "Pacharan" (Calvo i Caverro, 2014). Ta djelovanja pripisuju se aktivnim komponentama polifenolima (Owczarek i sur., 2017).

### 2.1.2. Biološki aktivne tvari u trnini

Ekstrakt cvijeta trnine sadrži velik udio bioaktivnih molekula, uglavnom polifenola, kojima se pripisuju antioksidativna i antimikrobna aktivnost (Radovanović i sur., 2013). Biološki aktivne molekule koje su identificirane u cvijetu trnine su flavonoidi, tip A-proantocijanidini, antocijanini, kumarini, fenolne kiseline (Owczarek, 2017). Prema Mikulić-Petkovšek i sur. (2016), glavne organske kiseline u vrstama *Prunus* su jabučna i limunska kiselina, a čine 80-85% ukupnih organskih kiselina, preostale su kininska i šikiminska kiselina te fumarinska kiselina. Cvjetovi i listovi trnine najviše sadržavaju kampferola, kvercetina, rutina te njihovih glikozida s arabinozom, ramnozom i ksilozom (kampferol 3-O- $\alpha$ -L-arabinofuranozid, kvercetin-3-O- $\alpha$ -D-ksilopiranozid, kampferol 3-O- $\alpha$ -arabinofuranozid-7-O- $\alpha$ -ramnopiranozid). Cvjetovi sadrže proantocijanidine tipa A, lišće karotenoide i norizoprenoide, a oba dijela biljke sadrže fenolne kiseline, tanine i vitamin C (Olszewska i Wolbis., 2001; Ruiz Rodrigues i sur., 2014; Elez Garofulić i sur., 2018). U cvjetovima i listovima trnine identificirani su također steroli kao i triterpeni, terpenoidni alkoholni, od kojih je dominantni  $\beta$ -amirini. Od sterola je u najvećoj koncentraciji prisutan  $\beta$ -sitosterol (Olszewska, i Wolbis, 2001). Svježi cvijet trnine sadrži cijanogene glikozide a koji uzrokuju blagi diuretički učinak (Veličković i sur., 2014). U sastavu ploda trnine, najveći dio čine ugljikohidrati kao makronutrijenti i to 88,5%. Od ugljikohidrata, monosaharida, dominantna je glukoza, a od polisaharida celuloza i škrob. Osim ugljikohidrata, oko 3,4% sastava ploda čine proteini, dok na masti otpada udio od 1,2-1,6%. Osim navedenih makronutrijenata, plod trnine identificiran je kao izvor vitamina; askorbinske kiseline,  $\alpha$  i  $\delta$ -tokoferola te  $\beta$ -karotena. Plod sadrži i veliki udio polifenola, a najviše antocijana (cijanidin-3-O-glukozid, cijanidin-3-O-rutinozid, peonidin-3-O-glikozid), flavonol glikozida (kvercetin i kampferol) te fenolnih kiselina (derivati neoklorogenske i kafeinske) (Barros i sur., 2001). Medicinske karakteristike trnine su dokazane za plod, cvijet, kožicu i korijen biljke (Olszewska, i Wolbis, 2001).

Kroz literaturu je zabilježeno da ekstrakt cvijeta trnine ima djelovanje kao blagi laksativ i diuretik zbog sadržaja cijanogenih glikozida (Veličković i sur., 2014). Prema Veličković i sur. (2014), alkoholne otopine cvijeta trnine imaju veći sadržaj polifenola nego vodene, što ukazuje da su alkoholne otopine pogodnije za ekstrakciju spojeva. Etanolni ekstrakti su poželjniji od metanolnih iz razloga što nemaju toksični učinak koji potječe od metanola. Svi testirani alkoholni ekstrakti pokazali su jaki antioksidacijski učinak. Pokazuju jak antimikrobni učinak, usmjeren na inhibiciju rasta gram pozitivnim bakterijama *Bacillus subtilis* te gram negativnim *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella abony* i antifungalnu aktivnost prema *Aspergillus niger* i *Candida albicans*. Najveća antimikrobna aktivnost utvrđena je prema gram negativnim bakterijama iz roda *Salmonella enteritidis* dok u skupini gram pozitivnim *Staphylococcus aureus*, te je puno veća u usporedbi sa antimikrobnom aktivnošću drugog divljeg bobičastog voća.

Novija istraživanja fokusirana su na antioksidativnu aktivnost ekstrakta grančica, lišća i plodova trnine, koja se pripisuje polifenolima iz trnine. Učinak polifenola temelji se na snižavanju oksidativnog stresa i upalnih procesa izazvanih kroničnom izloženošću istima. Polifenoli su kao "hvatači" slobodnih radikala, kelati metala, inhibitori protupalnih enzima, modifikatori signalnog puta stanice. Štite stanicu i tkiva protiv lipidne peroksidacije, kroničnih upala i oksidativnih oštećenja DNA. Polifenoli iz trnine i njihovi metaboliti podižu antioksidacijski kapacitet krvne plazme te povećavaju otpornost prema ishemiji i reperfuziji tkiva (Guimarães i sur., 2013; Popescu i Caudullo, 2016; Marchelak i sur., 2017).

Dostatan unos polifenola iz hrane ili putem dodataka prehrani umanjuje rizik od razvijanja kardiovaskularnih bolesti, te rizik od smrti uzrokovane već razvijenim bolestima (Alissa i Ferns, 2012). Prema *in vivo* istraživanjima dokazano je da flavonoidi poboljšavaju antioksidacijski status, djeluju preventivno na nastajanje ateroskleroze i tromboze, smanjuju oksidaciju LDL-a, moduliraju metabolizam lipida normalizacijom odnosa HLD/LDL te poboljšavaju endotelnu funkciju (Middleton i sur., 2000; Alissa i Ferns, 2012). Prethodna istraživanja pokazala su da bi dnevni unos polifenolnih komponenti za žene trebao iznositi oko 780 mg, dok za muškarce 1058 mg po danu, tako da su polovica od unešenog hidroksicimetne kiseline, koje sadržavaju 20-25% od ukupnih polifenola. Te preporuke mogu se doseći uz unos 50 g plodova trnine dnevno (Ruiz Rodrigues i sur., 2013).

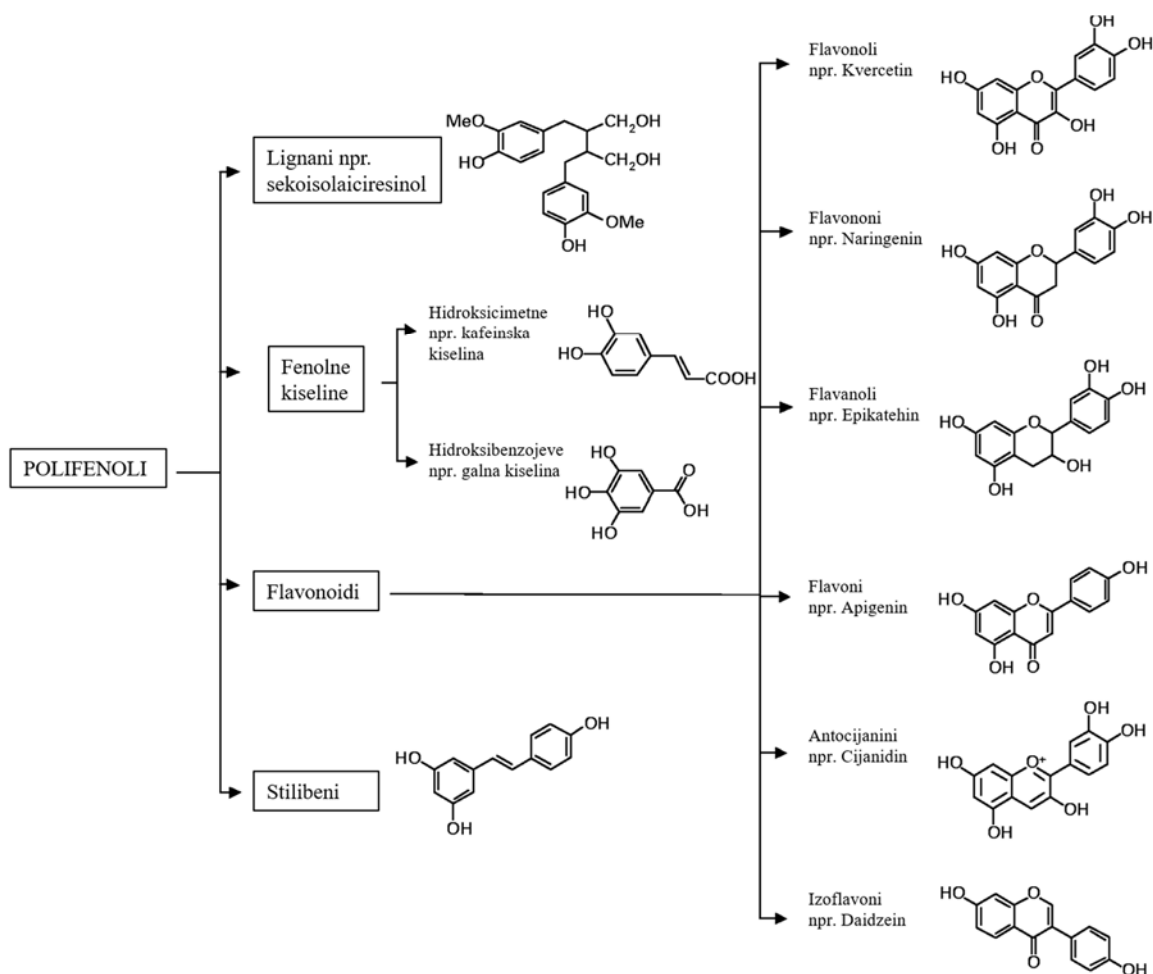
Prethodno opisani sastav polifenola sugerira da bi ekstrakt cvijeta trnine mogao pronaći primjenu u farmaceutskoj industriji kao dodatak prehrani. Neki od potencijalnih zaštitnih mehanizama osim antioksidacijskog i antiomikrobnog djelovanja je i regulacija glikemije.

## 2.2. POLIFENOLI

### 2.2.1. Klasifikacija polifenola

U mnogim namirnicama biljnog porijekla prisutni su polifenoli, biološki aktivne molekule raznolike i kompleksne kemijske strukture (Slika 2) (Abbas i sur., 2017). U hrani svojom prisutnošću utječu na boju i okus ali i na oksidativnu stabilnost (Pandey i Rizvi, 2009). Donori su elektrona te imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala i ostalih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i zaustavljanja lančanih reakcija (Bahadoran i sur., 2013). Njihova antioksidativna aktivnost ovisi o stabilnosti u različitim sustavima te o rasporedu hidroksidnih grupa u molekuli. Sudjeluju u obrani od UV zračenja, patogena, teških metala, ekstremnih temperatura, nepovoljnih okolišnih uvjeta te za antioksidacijsku zaštitu biljke (Manach i sur., 2004; Sharma i sur., 2019). Najznačajnije su komponente u voću koje imaju jače antioksidativno djelovanje čak i od vitamina C (Tsao, 2010). Poznato je više od 8000 polifenolnih struktura (Sima i Sârbu 2016) dok je identificirano oko 4000 flavonoida (Tsao, 2010). Dosadašnja istraživanja dokazuju da polifenoli imaju pozitivan i zaštitni učinak na zdravlje. Djeluju preventivno na bolesti povezane sa oksidacijskim stresom, neurodegenerativne, kardiovaskularne i endokrinološke bolesti te karcinom, a učinak ovisi i o njihovoj kemijskoj strukturi. (Abbas i sur., 2016).

Polifenoli se klasificiraju prema broju fenolnih prstena i strukturalnim elementima koji ih vežu (Bahadoran i sur., 2013). Najčešće su povezani sa šećerima i organskim kiselinama (Crozier i sur., 2009). Osnovna je podjela u 4 razreda: fenolne kiseline, flavonoide, stilbene i lignane. Svi polifenoli potječu od zajedničkog prstena fenilalanina, prekursora šikiminske kiseline (Pandey i Rizvi 2009).



**Slika 2.** Klasifikacija polifenola (preuzeto i prilagođeno od Spencer i sur., 2007)

Fenolne kiseline se dijele u dva razreda, derivate hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline. Bazirane su na  $C_1-C_6$  i  $C_3-C_6$  strukturi (D'Archivio i sur., 2010). Fenolne kiseline mogu biti slobodne ili hidrolizirane pod djelovanjem enzima (Tsao, 2010). Hidroksibenzojevih kiselina u prehrani ima vrlo malo, stoga niti nemaju neki značaj u ljudskom zdravlju (Pandey i Rizvi, 2009; Abbas i sur., 2017). Hidroksibenzojeve kiseline sastavni su dio kompleksnih struktura tanina (galotanini, elagitanini), a nalaze se u slobodnom i u esterificiranom obliku. Hidroksicimetne kiseline se rijetko nalaze u slobodnoj formi, a češće u formi glikoliziranih derivata ili estera kininske, šikiminske ili vinske kiseline, i to su uglavnom p-kumarinska, kafeinska i sinapinska kiselina. Kafeinska kiselina, esterificirana i u slobodnom obliku, najčešća je fenolna kiselina i sa 75-100% čini hidroksicimetne kiseline u većini voća (Tsao, 2010).

Flavonoidi su građeni od 2 benzenska prstena (A i B) koja su povezana piranskim prstenom od 3 ugljikova atoma koji čine oksigenirani heterociklički prsten (C).

Osnovna struktura im je C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Najčešće u svojoj strukturi imaju vezane šećere, pa su tako flavonoidi u prirodi uglavnom u formi glikozida (Abbas, 2017). Flavonoidi su često hidroksilirani, glikozidirani, mogu sadržavati i acilne grupe na različitim pozicijama (Kazazić, 2004). Šećeri i hidroksilne skupine čine flavonoide hidrofilnima, dok metilne grupe i izopentilne jedinice kao i neki drugi supstituenti čine flavonoide lipofilnima. Biološka aktivnost flavonoida i antioksidativni kapacitet, ovise o strukturi, supstituentima te stupnju polimerizacije (Tsao, 2010). Ovisno o broju i položaju vezanih hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i oksidacije C prstena, glavne skupine flavonoida su: flavoni, flavonoli, flavan-3-oli, izoflavoni, flavononi i anocijanidini (Manach i sur., 2004). Najčešći šećeri povezani sa flavonoidima su glukoza, galaktoza, ramnoza, arabinoza (Huang i sur., 2010).

Flavonole također prikazujemo strukturnom formulom C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Glavni predstavnici su kvercetin i kampferol, a glikolizirani i konjugirani su na mjestima 5,7,3',4' i 5'. Najčešće vezani šećeri su glukoza ili ramnoza, ali mogu biti i galaktoza, arabinoza, ksiloza. Prisutni su uglavnom u formi glikozida (Crozier i sur., 2009). Za flavonole je karakteristično da sadrže ketonsku skupinu te hidroksidnu skupinu na C<sub>3</sub> prstenu koja je glikolizirana (Panche i sur., 2016). Osim kvercetina i kampferola, u flavonole se ubrajaju miricetin, morin, galangin (Huang i sur., 2010).

U skupinu flavona ubrajaju se se luteolin, apigenin, baikalein, krizin i njihovi glikozidi (Huang i sur., 2010). U strukturi nema oksigenacije na C<sub>3</sub> atomu, međutim na drugim mjestima česte su hidroksilacija, metilacija, O- i C-alkilacija i glikolizacija. Većina se pojavljuje u formi 7-O-glikozida (Crozier i sur., 2009; Del Rio i sur., 2013)

Izoflavoni imaju B prsten na poziciji C<sub>3</sub>. Uglavnom su u formi kao 7-O-(6"-O-malonil) glikozida te aglikona. Prisutni su u vrlo ograničenom broju namirnica, u soji i nekim drugim grahoricama. Tijekom različitih faza procesiranja hrane, fermentacije ili ekstrakcije vrućom vodom, glikozidne grupe genistina, daidzeina i glicitina se cijepaju. Struktura koja je slična estrogenu, specifično 17-β-estradiolu, doprinosi fitoestrogenom učinku (Del Rio i sur., 2013; Panche i sur., 2016; Salaritabar i sur., 2017).

Flavanoni imaju zasićeni C prsten, odnosno zasićenu vezu između pozicija 2 i 3. Uglavnom ih u prehrani nalazimo u citrusnom voću, u aglikonskoj formi. Najčešći su naringin (naringenin-7-O-neohesperidoza) i hesperidin (hesperitin-7-O-rutinozid), a većinom su hidrolizirani u tankom crijevu, te se metaboliziraju kao njihovi aglikoni. U većini prirodno prisutnih flavonona C prsten vezan je na B prsten preko C<sub>2</sub> ugljika u α-konfiguraciji. Flavononi su uglavnom glikolizirani, disaharidom na poziciji 7.

Neohesperidozni konjugati (hesperitin-7-O-neohesperizoda i naringenin-7-O-neohesperidoza su nosioci gorkog okusa (Del Rio i sur., 2013; Panche i sur., 2016).

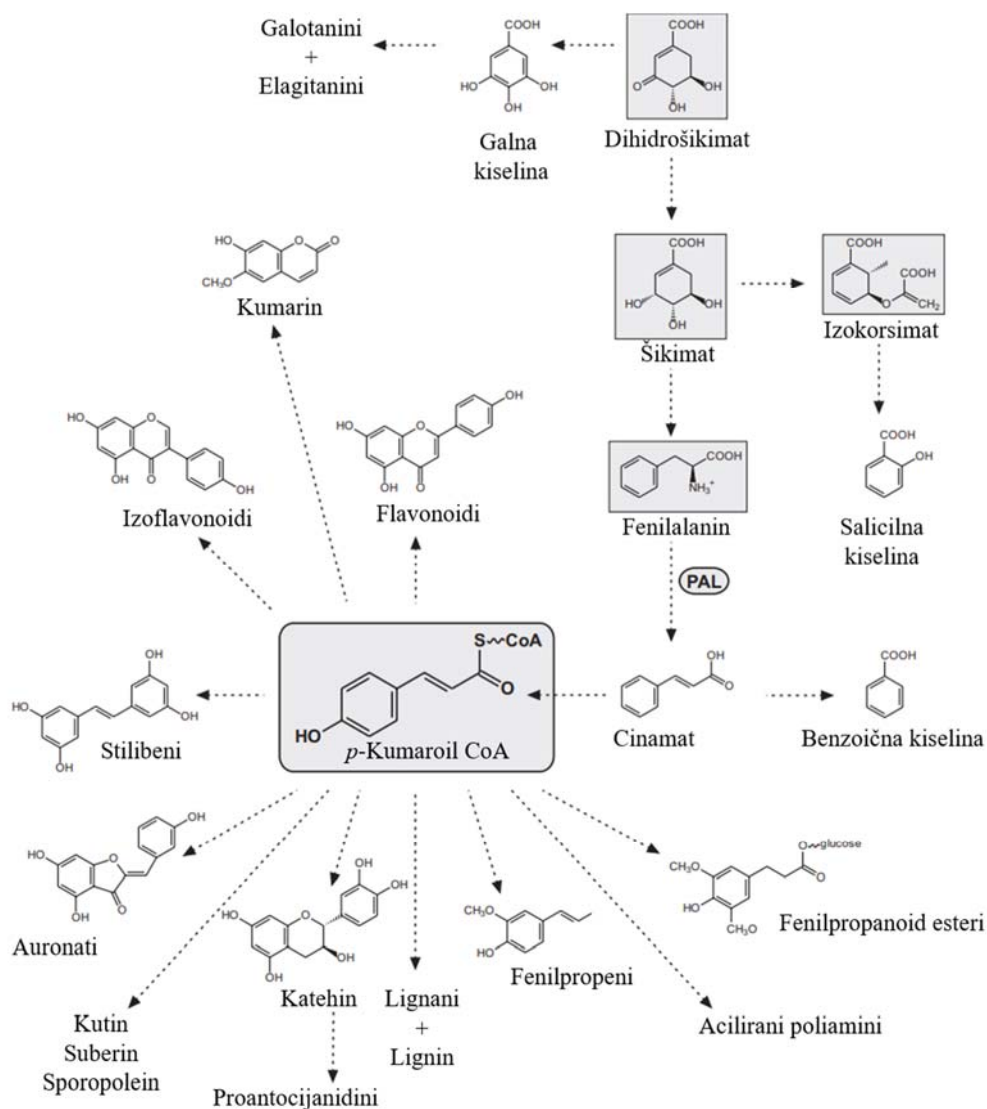
Flavan-3-oli su najkompleksniji flavonoidi, građeni kao monomeri, oligomeri te kao polimerizirani proantocijanidini, a poznati kao kondenzirani tanini (Salaritabar i sur., 2017). Hidroksilna grupa najčešće je vezana uz C<sub>3</sub> atom. Na C<sub>2</sub> i C<sub>3</sub> atomima nalaze se kiralni centri, a koji omogućuju izomerizaciju (Crozier i sur., 2009). Primjerice, katehin je izomer sa *trans* konfiguracijom, a epikatehin sa *cis* konfiguracijom. Svaka od tih konfiguracija ima po 2 stereoizomera, (+)-katehin, (-)-katehin, (+)-epikatehin, (-)-epikatehin. Katehini i epikatehini formiraju polimere, koji se definiraju kao proantocijanidini, jer kiselinskom katalizom polimernih lanaca, nastaju antocijanidini.

Antocijani zbog svog pigmenta, imaju značajno mjestu u prehrambenoj industriji kao bojila te su topivi u vodi. Imaju značajan antioksidativni potencijal (Manach i sur., 2004; Guimares i sur., 2013). Antocijani u biljkama se pretežno nalaze u formi glikozida. Do sada poznati antocijani u formi aglikona su pelargonidin, cijanidin, delphinidin, peonidin, petunidin i malvidin, a koji formiraju konjugate sa šećerima i organskim kiselinama, hidroksicimetnim – kafeinska, p-kumarinska, i ferulinska kiselina te alifatskim kiselinama- jabučna, octena, oksalna kiselina (Crozier i sur., 2009; Salaritabar i sur., 2017). Boja antocijanidina je ovisna o pH okruženju. Također, drugi faktori poput stupnja hidroksilacije i metilacije aromatskog prstena, glikolizacija utječu na boju (Tsao, 2010; Panche i sur., 2016).

Lignani su difenolne komponente koje se sastoje od 2,3-dibenzilbutanske strukture, formirane od 2 fenilpropanska prstena. Putem crijevne mikroflore metaboliziraju se u enterolignane, estradiol i enterolakton. Najbogatiji prirodni izvor lignana su lanene sjemenke (Pandey i Rizvi, 2009).

### **2.2.2. Biosinteza polifenola**

Biosinteza polifenola odvija se preko međuprodukata koji nastaju u putevima šikiminske kiseline i fenilpropanoida (Slika 3).



**Slika 3.** Biosinteza polifenola (preuzeto i prilagođeno od Vogt, 2010)

Fenilalanin i tirozin su prekursori komponenti metaboličkog puta fenilpropanoida. Fenilpropanoidni put je uključen u sintezu lignana te antocijana. U svom biokemijskom putu grade 2 grane koje uključuju 5 enzima i to: fenilalanin amonij liazu (PAL) kao prvi ključni enzim u regulaciji, cinaminsku kiselinu 4-hidroksilazu (CA4H), koenzim A (CoA) ligazu, tirozin aminotransferazu i sintetazu ružmarinske kiseline (Vogt, 2010). Svi polifenoli smatraju se metabolitima šikiminske kiseline. Biosinteza kompleksnih polifenola poput flavonoida, povezana je s metabolizmom u plastidima i mitohondrijima biljaka gdje nastaju međuprodukti, koji se u citoplazmi razdvajaju na pojedinačne molekule.

Aromatski prsten B i heterociklički benzodihidropiranski prsten potječu od aminokiseline fenilalanina, kao produkta šikiminskog puta, gdje prsten A čine 3 jedinice malonil-CoA koje su dodane putem reakcija dekarboksilacije i kondenzacije što pokreće sintezu flavonoida. Fenilalanin amonij lijaza je ključan enzim koji katalizira pretvorbu fenilalanina u cinamat, što vodi do strukture C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (Wang i sur., 2019).

### 2.2.3. Metabolizam polifenola

Mnogo je istraživanja koja su se bavila metabolizmom polifenola na *in vitro* te nešto manje na *in vivo* modelima, međutim i dalje nema dovoljno istraživanja koja bi dala potpuni uvid u podatke o biodostupnosti polifenola. Važno je poznavati metabolizam, apsorpciju, raspodjelu te izlučivanje kako bi se mogla procijeniti biološka aktivnost polifenola (Hollman i Arts, 2000; Morand i sur., 2000; D'Archivio i sur. 2010; Petersen i sur., 2016; Teng i Chen, 2019). Prema do sada istraženom, poznato je da polifenoli unutar organizma prolaze intenzivnu razgradnju i da je njihova koncentracija u krvi mnogo niža nego što je bila izvorno unešena hranom (Gessner i sur., 2017).

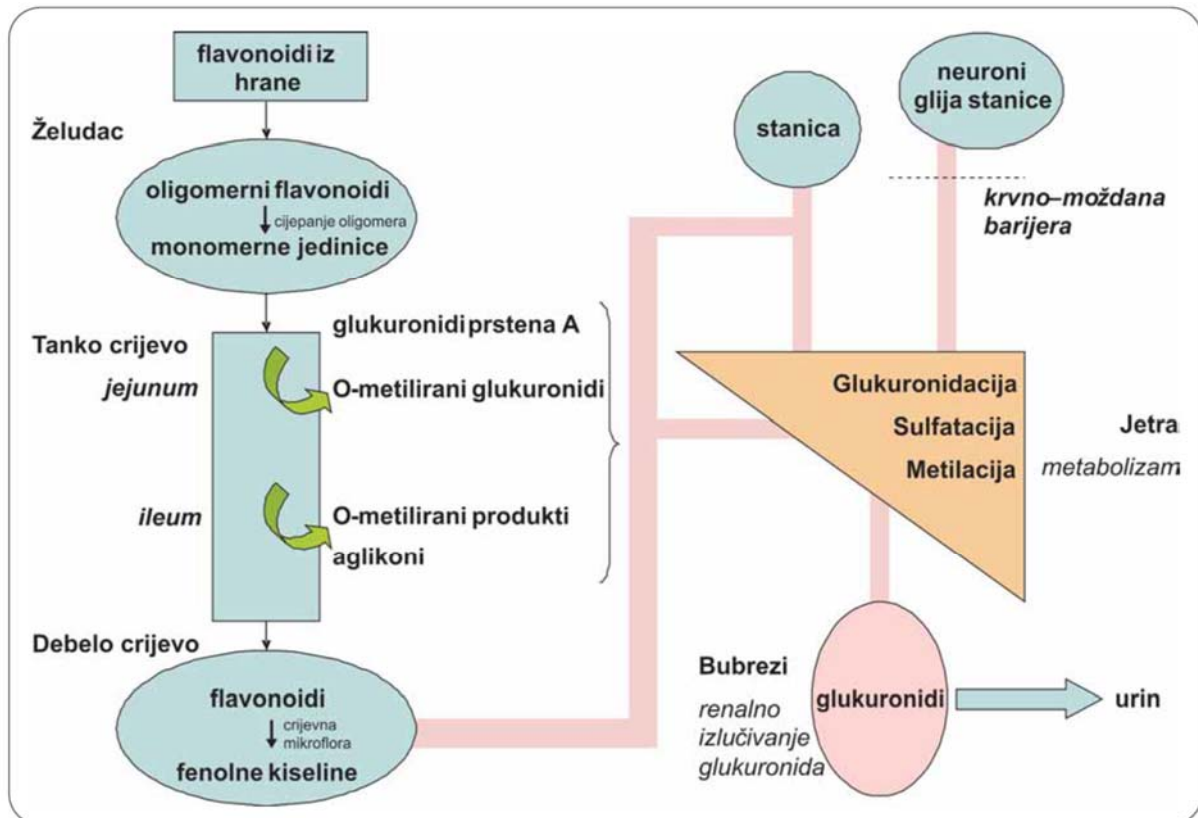
Apsorpcija flavonoida iz hrane ovisit će o brojnim faktorima, kao npr. molekularnoj masi, konfiguraciji i topljivosti (Gessner i sur., 2017).

Prva faza probave polifenola odvija se žvakanjem u ustima, nakon što se oslobode iz strukture u kojem se nalaze, pod djelovanjem enzima iz sline. O formi u kojoj se nalaze polifenoli, kao i prisutnosti drugih komponenti i njihovoj strukturi ovisi dalja razgradnja polifenola u gastrointestinalnom sustavu (Eran Nagar i sur., 2020). Promjena u strukturi omogućuje njihovo oslobađanje te povećava biodostupnost u crijevima, a istovremeno se povećava i površina koja je u međureakciji sa probavnim enzimima (Velderrain-Rodriguez i sur., 2014). U ustima, neki se polifenoli vežu za proteine iz sline, tako ograničavajući apsorpciju (Charlton, 2002). Kao takvi su dio obrambenog sustava od djelovanja tanina, iz čega proizlazi astringentan okus nekih namirnica (npr čaja ili vina) (Jakobek, 2015). Neka istraživanja ukazuju na to da se u usnoj šupljini hidroliziraju polifenoli u glikozidnoj formi, tako da se cijepa šećerna jedinica te nastaju aglikoni (Walle i sur., 2003). Polifenoli uglavnom ne prolaze velike promjene na putu iz gornjeg u donji dio gastrointestinalnog sustava (Spencer, 2003). Nakon prolaska kroz usnu šupljinu i jednjak, polifenoli se razgrađuju u želucu, ponajprije djelovanjem niskog pH a zatim i djelovanjem bakterija, ali ovisno o njihovoj kemijskoj strukturi (Sanz-Bauenhombre i sur., 2016, Areas i Trinidad, 2017; Wu i sur., 2018).



Dio se polifenola u želucu razgradi do fenolnih kiselina, dok ostali opet nepromijenjeno prolaze u tanko crijevo (Manach i sur., 2004). Većina polifenola unešenih hranom apsorbira se u epitelnim stanicama tankoga crijeva gdje mogu biti hidrolizirani djelovanjem laktaza-florizin hidrolaze (LPH enzima), i to uglavnom u formi glikozidnih konjugata (Bohn i sur., 2015; Santhakumar i sur., 2018). Enzimatska hidroliza rezultira otpuštanjem aglikona i poboljšanjem lipofilnosti, koji onda pasivnom difuzijom mogu proći epitelne stanice. Alternativni putevi uključuju apsorpciju glikozida u epitelnim stanicama gdje se kasnije hidroliziraju citosolnom  $\beta$ -glukozidazom (CBG). Da bi glukozidi ušli u epitelne stanice smatra se da tu posreduje o natriju ovisan glukozni prijenosnik (SGLT-1) (Dominguez-Avila i sur., 2017; Santhakumar i sur., 2018). U epitelu tankoga crijeva gdje se apsorbiraju dolazi do biotransformacija kao što su metilacija, sulfatacija, glukouronidacija, O-metilacija, oksidacija, redukcija, hidroliza (Gessner i sur., 2017). Apsorpcija u tankom crijevu ovisi o strukturi polifenola, lipofilnosti molekule, topljivosti te pH u lumenu crijeva i permeabilnosti membrane (Del Rio i sur., 2013). Nakon što prođu reakcije glukuronidacije, sulfatacije i metilacije, metaboliti polifenola odlaze u plazmu iz koje se onda izluče bubrezima u urin ili ukoliko se nisu apsorbirali, odlaze u lumen debelog crijeva uz pomoć prijenosnika ili žuči. Mikroorganizmi iz debelog crijeva metaboliziraju polifenole koji se nisu apsorbirali u tankom crijevu ili one polifenole koji su se apsorbirali u tankom crijevu ili jetri ali su se kruženjem vratili. Mikrobiota crijeva ima mogućnost hidrolize polifenola, pri čemu dolazi do njihove razgradnje i nastanka metabolita, što nazivamo metabolizmom faze II i na taj način dolazi do enterohepatičkog kruženja polifenola. Na taj način povećava se njihova biodostupnost (Xie i sur., 2016; Williamson i Clifford, 2017). Mnogi od tih produkata degradacije ne mogu se apsorbirati, pa ih pronalazimo u urinu i plazmi (Rechner i sur., 2002; Olthof i sur., 2003). Mikrobiotom crijeva razgrađuju se polifenoli uglavnom do nisko molekulskih fenolnih kiselina koje se bolje apsorbiraju kroz crijevnu barijeru nego li njihove ishodišne molekule (Xie i sur., 2016; Williamson i Clifford, 2017; Edwards i sur., 2017). Prisutnost različitih polifenola u sastav crijevne mikrobiote može unijeti pozitivne promjene a na račun povećanja broja *Bifidobacterium* spp. i *Lactobacillus-Eterococcus* spp. (Ozidal i sur., 2016; Jakobek i Matić, 2018). Flavonoidi se intenzivno hidroliziraju enzimima mikrobiote u debelom crijevu do ishodišnih produkata cijepanjem C prstena. U slučaju flavonola, događa se hidroksilacija B prstena, kao kod kampferola (Ozidal i sur., 2016). Kod antocijana, inicijalni korak je bakterijska hidroliza koja uključuje cijepanje šećerne jedinice koja vodi do zauzimanja forme aglikona antocijina. Za deglikolizaciju uglavnom su odgovorni enzimi  $\alpha$ ,L-ramnozidaza i  $\beta$ ,D-glukozidaza (Ozidal i sur., 2016). Aglikoni se spontano prevode pod utjecajem pH u debelom crijevu dalje u fenolne kiseline i aldehide putem posrednika  $\alpha$ -diketona (Ozidal i sur.,

2016). Fenolne kiseline mogu dalje biti razgrađivane u crijevu, primjerice kafeinska kiselina transformira se u 3-(3'-hidroskifenil) propionsku kiselinu i male količine benzojeve kiseline (Ozidal i sur., 2016). Međutim, mnogo je i faktora o kojima ovisi kako će se odvijati metabolizam polifenola u debelom crijevu, a neki od njih su dob, spol, prehrana i životne navike (Ozidal i sur., 2016) (Slika 4).



**Slika 4.** Metabolizam i apsorpcija polifenola u ljudskom i životinjskom organizmu (preuzeto i prilagođeno od Marin i sur., 2015)

#### 2.2.4. Biodostupnost polifenola

Biodostupnost se definira količinom polifenola koji je probavljen, apsorbiran i metaboliziran kroz metaboličke puteve. Biodostupnost svakog polifenola se razlikuje i različita je veza između količine polifenola koji se unesu hranom i njihove biodostupnosti u tijelu. Biodostupnost se eksperimentalno može odrediti oralnom dozom polifenolima bogate hrane ili samo jedne polifenolne komponente, na animalnom ili humanom modelu (Heaney, 2001; Bohn, 2014). Važno je znati koliko je raspoloživ polifenol koji se nalazi u određenoj namirnici, jer je vrlo često slučaj da onaj polifenol koji je u najvećoj koncentraciji nema najbolju biodostupnost (D'Archivio i sur., 2010).

Važan utjecaj na biodostupnost polifenola imaju vanjski faktori (okolišni uvjeti, izloženost suncu, stupanj zrelosti), način obrade biljnog materijala kao izvora polifenola (termička obrada, homogenizacija, liofilizacija, pohrana), forma u kojem se nalaze polifenoli, zatim međureakcije sa drugim komponentama (veze sa proteinima, ili drugim polifenolima sličnog mehanizma apsorpcije), kemijska struktura samog polifenola i njegova koncentracija u formi u kojoj se nalazi te o samom organizmu kroz koji se polifenol apsorbira (Heaney, 2001; D'Archivio i sur., 2010).

Biološki cirkadijalni ritam ima veliki značaj na biodostupnost polifenola i njihov biološki značaj. Biodostupnost nekih polifenola ovisno o njihovoj građi slijedi cirkadijalni ritam i na taj način može pokazati promjenu u antioksidativnim svojstvima. Regulacija glikemije i homeostaze glukoze također je ovisna o cirkadijalnom ritmu i izmjenju dnevnog svjetla i mraka i ciklusa hranjenja i posta, stoga je neusklađenost navedenog moguć put prema patološkim stanjima kao što su hiperglikemija i kardiovaskularne bolesti (Avila-Roman i sur., 2021).

Aglikoni se mogu apsorbirati iz tankoga crijeva, međutim većina polifenola prisutnih u hrani nalaze se u formi glikozida ili estera koji se mogu apsorbirati u primarnoj formi. Zato se prije apsorpcije takvi polifenoli moraju hidrolizirati crijevnim enzimima ili crijevnom mikrobiotom. Polifenoli podliježu i procesima konjugacije u crijevnim stanicama, a kasnije u jetri metilaciji, sulfataciji i glukuronidaciji. Procesi biotransformacije tvore drugačije oblike od onih izvornih metabolita polifenola u krvi i tkivima te je vrlo kompleksno odrediti i identificirati sve metabolite i njihovu biološku aktivnost (Hollman, 2004). Najčešći polifenoli nisu oni koji imaju najveću metaboličku aktivnost u tkivima, već je biodostupnost vrlo individualna za polifenole. Apsorpcija polifenola i njihovih pripadajućih aglikona povezana je s reakcijama u kojima sudjeluju, koje su rezultat njihove modifikacije putem crijevne mikrobiote i probavnih enzima. Laktaza florizin hidrolaza (LPH) je enzim specifično lociran u epitelnim stanicama tankoga crijeva (Danielsen i Danielsen, 2017), kojemu su supstrati flavonoid-O- $\beta$ -glikozidi, i otpušteni aglikoni koji mogu ući u epitelne stanice pasivnom difuzijom kao rezultat povećane lipofilnosti i blizine stanične membrane (Kay i sur., 2017). Prije pasivnog prijenosa jetrenom venom u sistemska cirkulaciju, polifenoli se modificiraju u reakcijama sulfatacije, glukuronidacije ili metilacije te podliježu fazi II metabolizma, kroz aktivnost sulfotrasferaze, uridin-5'-difosfat glukuronoziltransferaze i katehol-O-metiltransferaze (enzimi faze II koji su odgovorni za detoksifikaciju i proizvodnju glukuronidiranih, sulfatiranih i metiliranih konjugata) (Margalef i sur., 2017).

Kada metaboliti pasivnim prijenosom uđu u krvotok, dolaze do jetre gdje se odvija metabolizam faze II i enterohepatskom cirkulacijom može doći do povratka u tanko crijevo putem žuči. Komponente sa visokim stupnjem polimerizacije ne mogu se apsorbirati u tankom crijevu, nego u debelom crijevu podliježu modifikaciji putem crijevne mikrobiote, formiraju se male molekule koje onda mogu nazad u jetru, gdje se odvijaju reakcije konjugacije (Cardona i sur., 2013). Metaboliti koji su nastali kao rezultat metabolizma faze II, kao i mikrobne modifikacije, dolaze u krvotok, odakle odlaze u organe i tkiva, ili se iz bubrega izlučuju putem urina (Williamson i Clifford, 2017).

Prema dosadašnjim istraživanjima, galna kiselina i izoflavoni se najbolje apsorbiraju od svih polifenola, a slijede ih flavan-3-oli, flavanoni, kvercetin glukozidi, dok proantocijanidini i galokatehini i antocijanini pokazuju najmanju biodostupnost (Manach i sur., 2005).

### **2.2.5. Biodostupnost pojedinih vrsta polifenola**

Biodostupnost flavan-3-ola je viša nego drugih flavonoida, primjerice 2% do 8,1% za flavan-3-ole iz zelenog čaja (Teng i Chen, 2019). Međutim, biodostupnost flavan-3-ola može biti viša jer se povezuju sa makromolekulama (Teng i Chen, 2019). Biodostupnost istraživana na ekstraktu čaja pokazuje slične rezultate gdje je 10% od unešenog sadržaja izlučenog urinom (Chow i sur., 2005; Del Rio i sur., 2010). Za flavan-3-ole je poznato da se vežu sa proteinima i polisaharidima te na taj način sprječavaju mogućnost da budu u mjerljivoj količini (Wiese i sur., 2015). Neka istraživanja potvrdila su da je biodostupnost flavan-3-ola iz zelenoga čaja u vrijednosti od 2 do 8,1% (Manach i sur., 2005; Stalmach i sur., 2009). Prema Stalmach i sur. (2009), u istraživanju na ljudima, ispitanici su pili zeleni čaj, 648  $\mu$ mola flavan-3-ola.

U plazmi i urinu sakupljenom tijekom 24 sata pronađeno je 10 metabolita, o-metiliranih, glukuronidiranih i sulfatiranih konjugata katehina i galokatehina, sa  $C_{max}$  29-126 nM pik i to 1,6 do 2,3 sata od unosa. Frakcije flavan-3-ola koje se nisu apsorbirale u tankom crijevu podliježu mikrobnoj modifikaciji u debelom crijevu, hidrolizirajući se u male molekule, koje kao takve dospijevaju u jetru i konačno u cirkulaciju (Teng i Chen, 2019). Nešto drugačiji i bolji rezultati pokazani su u istraživanjima na uzorcima plazme za apsorpciju flavan-3-ola koji potječu iz kakaa (Massot-Caldera i sur., 2014).

Apsorpcija fenolnih kiselina kao što su galna, klorogenska, kafeinska i ferulinska, a prema detektiranom u urinu, smatra se dosta visokom, do 40% početnog unosa (Santhakumar i sur., 2018).

Od hidroksibenzojevih kiselina, pokazano je da se galna kiselina dobro apsorbira. Istraživanja apsorpcije hidroksicimetnih kiselina pokazuju da unos njihovih slobodnih formi vodi brzom apsorpciji u želucu kao i tankom crijevu, dok unos esterificiranih formi vodi do apsorpcije u debelom crijevu (Karas i sur., 2017).

Premda u cvijeta trnine nisu identificirani antocijani, u značajnijoj količini nalaze se u plodu. Prema rezultatima dosadašnjih istraživanja, biodostupnost antocijanina je vrlo niska (Rein i sur., 2013; Carbonell-Capella, 2014, Yousuf i sur., 2016, Teng i sur., 2017). Premda se antocijani putem namirnica konzumiraju u većim količinama većina studija ipak pokazuje da se u urinu nalazi samo 0,003-5,37% (Fernandes i sur., 2015; Ludwig i sur., 2015). Prema rezultatima animalnih istraživanja, nakon intravenoznog unosa, biodostupnost antocijanina je od 0,25 do 1,8% (Norberto i sur., 2013; Chen i sur., 2015). Vrlo su niske koncentracije antocijanina otkrivene u plazmi u usporedbi s većim koncentracijama metabolita fenolnih kiselina (Fang, 2014). pH želuca koji je <2 što osigurava da antocijanini budu prisutni u formi flavijum kationa, kao najstabilnije forme antocijanina. U tankom i debelom crijevu pH je gotovo neutralan, i tu su manje stabilni. U debelom crijevu, mikrobiota pretvara antocijanine u fenolne kiseline, cijepanjem C<sub>3</sub> prstena (Keppler i Humpf, 2005).

Kao što je već do sada spomenuto, unos namirnica biljnog porijekla koji su bogate polifenolima povezuju se sa sniženim rizikom od kroničnih nezaraznih bolesti (Slika 5). Polifenoli su dokazani kao jaki egzogeni antioksidansi koji neutraliziraju slobodne radikale doniranjem elektrona ili atoma vodika. Polifenoli zaustavljaju proizvodnju slobodnih radikala, reducirajući stupanj oksidacije, inhibirajući formiranje novih ili deaktivacijom nastalih vrsta i prethodnika slobodnih radikala (Pandey i Rizvi, 2009). Osim navedenog mehanizma antioksidacijske zaštite, važni su i inhibicija ksantin oksidaze te podizanje razine endogenih antioksidansa. Polifenoli osnažuju aktivnost antioksidacijskih enzima glutacion peroksidaze, katalaze, superoksid dismutaze. Antioksidacijski potencijal polifenola ovisi o njihovom metabolizmu, apsorpciji, raspodjeli i izlučivanju iz organizma, nakon njihovog unosa (Hollman i sur., 2004). Ključno je poznavati mehanizam njihovog djelovanja (Williams i sur., 2004).



**Slika 5.** Zaštitna uloga polifenola (preuzeto i prilagođeno od Pandey i Rizvi, 2009)

## 2.3. OKSIDACIJSKI STRES, SLOBODNI RADIKALI I ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE ENZIMA I POLIFENOLA

### 2.3.1. Oksidacijski stres

Sposobnost stanice da iskoristi kisik u svrhu metabolizma masti, proteina i ugljikohidrata dovodi do stvaranja štetnih molekula, takozvanih slobodnih kisikovih radikala (ROS) (Krishnamurthy i Wadhwani, 2012). Slobodni radikali su kratkoživuće reaktivne kemijske vrste koje sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj ljusci. Nastali nesporeni elektroni su proton donori ili proton akceptori drugim molekulama. Slobodni radikali uzrokuju oksidaciju stanica i molekula. Nestabilni su i vrlo reaktivni, reagiraju sa anorganskim i organskim spojevima (Bansal i Bilaspuri, 2011). Većina slobodnih radikala nastaje u sklopu aerobnog metabolizma u mitohondrijskom lancu prijenosa elektrona, dok dio nastaje prilikom oksidativnog praska u aktiviranim fagocitima putem čega dolazi do inaktivacije virusa i bakterija. Dio slobodnih radikala nastaje metabolizmom ksenobiotika. U svakodnevnom životu, izlaganje intenzivnoj tjelovježbi, pojačanom staničnom metabolizmu, kroničnim upalama, infekcijama, alergenima, lijekovima, dimu cigareta, pesticidima, različitim zagađivačima, pridonosi narušavanju oksido-redukcijskog statusa odnosno povećanoj proizvodnji slobodnih radikala (Krishnamurthy i Wadhwani, 2012).

Oksidativni stres stanično je stanje u kojem je narušena ravnoteža između antioksidansa i prooksidansa (slobodni radikali, reaktivne vrste) u korist oksidanasa. Oksidativni stres smatra se uzročnikom oštećenja biomolekula i staničnih struktura, DNA i transkripcijskih elemenata (Ighordo i sur., 2017).

Slobodni radikali ili reaktivne vrste kroz oksidativni stres uključene su u razvoj kroničnih bolesti. Svi aerobni organizmi imaju sustav obrane od kisikovih reaktivnih vrsta koje nastaju u procesu disanja i oksidacije supstrata. Izlaganje takvim vrstama dovodi do razvoja obrambenih mehanizama. Ti mehanizmi uključuju djelovanje enzimskih antioksidansa koji su prva linija obrane antioksidansima.

Kisik je uvjet za nastanak svih reaktivnih vrsta, reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), reaktivnih dušikovih vrsta (RNS) i reaktivnih klorovih vrsta. Najviše štete od strane kisika dolazi putem kisikovih radikala, superoksidnog anion ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroperoksilnog radikal ( $HOO^{\bullet}$ ), hidroksilnog radikala ( $HO^{\bullet}$ ), peroksi radikala ( $ROO^{\bullet}$ ) i alkoksi radikala ( $RO^{\bullet}$ ) koji sa vodikovim peroksidom ( $H_2O_2$ ), ozonom ( $O_3$ ) i singletnim kisikom ( $^1O_2$ ) čine reaktivne kisikove vrste. Osim ROS-a, tijelo tijekom različitih procesa stvara i reaktivne dušikove vrste (RNS), dušikov oksid (NO), peroksinitrit ( $ONOO^-$ ), peroksinitrat). Eksperimentalno je dokazano da 6 glavnih reaktivnih vrsta čine štetu u organizmu, a to su: superoksid anion, vodikov peroksid, peroksilni radikali, hidroksilni radikali, singlet kisik, i peroksinitrit. ROS mogu uzrokovati mnoge upalne procese, infekcije te poremećaje poput hiperglikemije (Štefan i sur., 2007; Mazandarani i Ghafourian, 2017). Superoksid se formira *in vivo* putem nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze u fagocitnim stanicama preko enzima kao što su ksantin oksidaza i ksantin dehidrogenaza koje reduciraju  $O_2$  u  $O_2^-$ , kao i putem autooksidacije mnogih biomolekula kao što su gliceraldehid, flavin mononukleotid ( $FMNH_2$ ), flavin adenin dinukleotid ( $FADH_2$ ), adrenalin, noradrenalin i dopamin. Najvažniji izvor singleta kisika *in vivo* je elektronski transportni lanac u mitohondrijima te hemoglobin u eritrocitima, koji također mogu biti izvor superoksidnog radikala.

Oksidativni stres je fiziološko stanje za koje se vjeruje da je uzrok mnogih bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti, srčani udar, neurodegenerativne bolesti, poput Parkinsonove bolesti i Alzheimerove bolesti (Tablica 1).

**Tablica 1.** Bolesti inducirane kroničnom izlaganju oksidativnom stresu\*

<b>Pluća</b>	<b>Astma, kronični bronhitis</b>
<b>Bubrezi</b>	Glomerulonefritis kronično zatajenje bubrega
<b>Zglobovi</b>	Artritis, reumatizam
<b>Mozak</b>	Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, gubitak pamćenja, depresija, moždani udar
<b>Oči</b>	Mrena, bolesti retine (mrežnice)
<b>Fetus</b>	Preeklampsija, zaostajanje u rastu in utero
<b>Srčani zalisci</b>	Ateroskleroza, hipertenzija, ishemija, kardiomiopatija, srčani udar
<b>Ostalo</b>	Rak, diabetes, upalne infekcije, starenje

\*(preuzeto i prilagođeno od Ullah i sur., 2016)

Šteta koja je prouzročena oksidativnim stresom može pogoditi sve organske sustave. Primjerice, oksidacija lipoproteina male gustoće (LDL-a) je inicijalni korak u stvaranju ateroskleroze, vodeći prema kardiovaskularnim bolestima i oksidaciji DNA.

Antioksidansi sprječavaju oksidaciju drugih molekula tako što se oni sami podvrgavaju oksidaciji u reakcijama sa slobodnim radikalima i tako preveniraju oštećenja stanice. Antioksidansi se mogu podijeliti u dvije kategorije: enzimske i neenzimske. Prema svom porijeklu mogu biti endogeni, što znači da se sintetiziraju unutar organizma i egzogeni koji se unose putem prehrane (Lobo i sur., 2010; Bunaciu i sur., 2015).



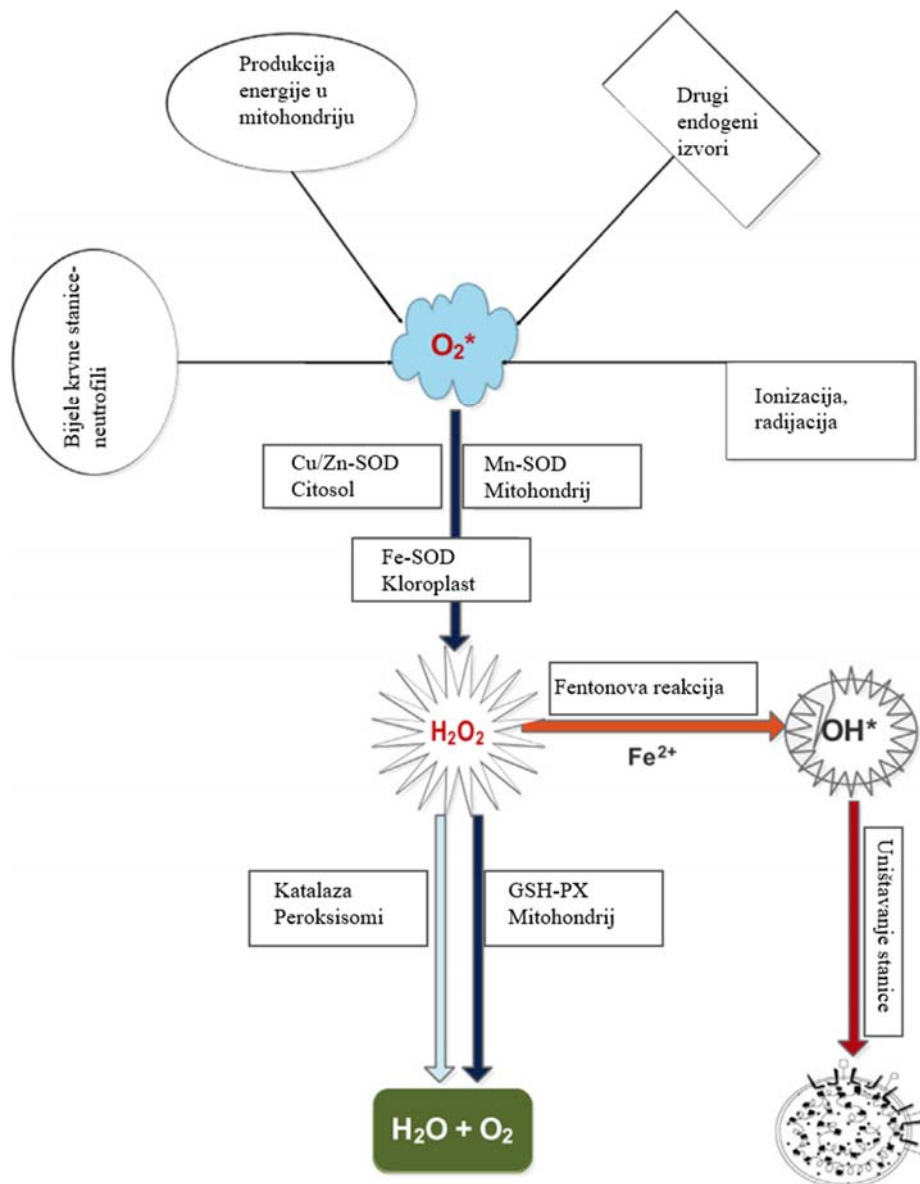
**Tablica 2.** Endogeni i egzogeni antioksidansi\*

ENDOGENI ANTIOKSIDANSI	EGZOGENI ANTIOKSIDANSI
Bilirubin	Vitamin C
Tioli, glutation, lipoičkakiselina, Nacetilcistein	Vitamin E
NADPH i NADH	$\beta$ -karoten, karotenoidi, likopen, lutein
Ubikinon, koenzim Q10	Polifenoli
Urična kiselina	Metaloproteini ovisni o bakru, albumin, ceruplazmin, metalotionein
Enzimi, superoksiddismutaza katalaza, glutation peroksidaza	Metaloproteini ovisni o željezu, feritin, mioglobin, transferin

\*(preuzeto i prilagođeno od Krishnamurthy i Wadhvani, 2012)

Prva linija obrane antioksidansima zaustavlja ili prevenira formiranje slobodnih radikala ili reaktivnih vrsta u stanici (Slika 6). Imaju sposobnost brze neutralizacije bilo koje molekule koja ima potencijal razvijanja slobodnog radikala te induciranja proizvodnje drugih radikala. Glavni antioksidacijski enzimi su: superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza. Ovi enzimi razlažu vodikov peroksid i hidroksiperokside na molekule koje nisu štetne za stanicu. Enzimska detoksifikacija uključuje elemente u tragovima: bakar, mangan, cink i selen koji se nalaze u aktivnim mjestima navedenih enzima.

U drugu liniju obrane ubrajaju se "hvatači" slobodnih radikala. Hvataju slobodne radikale kako bi spriječili inicijaciju i propagaciju, odnosno lančane reakcije stvaranja slobodnih radikala. Neutraliziraju ili hvataju slobodni radikal donirajući mu svoj elektron, tako da sami postaju "slobodni radikal" bez štetnoga učinka za stanicu. Najmoćniji antioksidansi iz ove skupine su: vitamin C (L- askorbinska kiselina), vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol), koenzim Q (ubikinon), DNA polimeraze i ligaze i proteolitički enzimi. Djeluju tako da spriječavaju nastanak novih slobodnih radikala i procesima resinteze obnavljaju oštećene aminokiseline i proteine (Lebeau i sur., 2000; Draper i sur., 2000).



Slika 6. Prva linija obrane od ROS (preuzeto i prilagođeno iz Ighodaro i Akinloye, 2017)

### 2.3.2. Antioksidativni enzimi

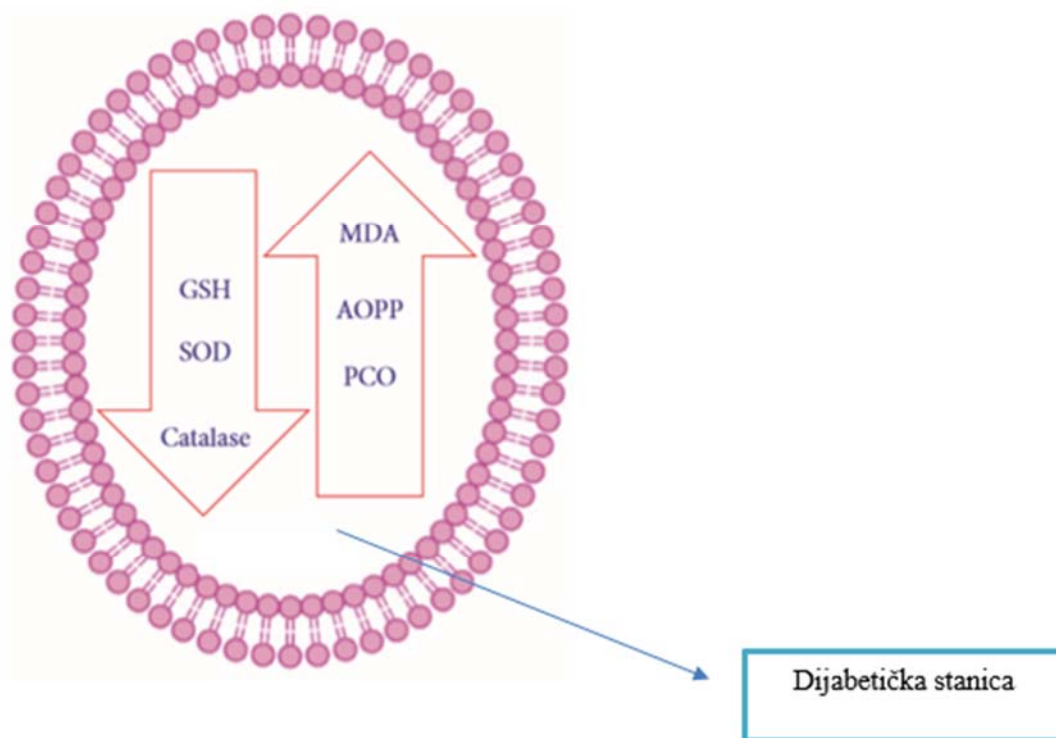
**Glutation peroksidaza (GSH)** je unutarstanični enzim koji razgrađuje i uklanja vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) kao i druge hidroperoksidge. Regulacija uklanjanja vodikovog peroksida važna je za prevenciju nastanka visoko reaktivnih i štetnih hidroksilnih radikala koji se formiraju u Fentonovim reakcijama sa vodikovim peroksidima (Lubos i sur., 2011). U aktivnom mjestu enzima nalazi se kofaktor selen, stoga njegova aktivnost ovisi o selenu. Iz tog razloga glutacion peroksidazu se često naziva i selenocistein peroksidazom. Taj enzim igra ključnu ulogu u inhibiciji lipidne peroksidacije čime štiti stanice od oksidacijskog stresa. Bubrezi se navode kao primarno tkivo gdje je koncentrirana glutacion peroksidaza.

Klinička važnost glutation peroksidaze je dokazana brojnim istraživanjima (Chabory i sur., 2009; Ullah i sur., 2016). Niža vrijednost ovog enzima umanjuje antioksidacijsku zaštitu, vodeći oksidacijskom oštećenju membrana masnih kiselina i funkcionalnih proteina te neurotoksičnom učinku (Chabory i sur., 2009). Kronična izloženost hiperglikemiji uzrokuje promjene u aktivnosti enzima glutation peroksidaze i glutation reduktaze. Snižena razina GSH jedan je od pokazatelja oksidacije DNA u hiperglikemiji. Omjer GSH/GSSG (glutation disulfida) u plazmi je snižen kod osoba sa dijabetesom u odnosu na zdrave osobe. Osim toga, smanjenje omjera opaženo je kod sustavne upale i hiperlipidemije. Dodatak aminokiselina koje prethode sintezi GSH može pogodovati obnovi GSH i tako sniziti oksidacijski stres reducirajući oštećenja organizma izloženog kroničnoj hiperglikemiji (Rahigude i sur., 2012).

**Superoksid dismutaza (SOD)** je detoksifikacijski enzim i najjači antioksidans u stanici. Katalizira dismutaciju superoksid aniona ( $O_2^-$ ) u vodikov peroksid i molekularni kisik. Važan je endogeni antioksidans u obrani od staničnih i tkivnih oštećenja koji se aktivira kao komponenta prve linije obrane od ROS. SOD je metaloenzim, stoga za svoje djelovanje treba metal kao kofaktor. Ovisno o tome koji je metalni ion kofaktor postoje različite forme enzima. Metalni ioni koji su uobičajeno kofaktori enzima SOD su željezo (Fe), cink (Zn), bakar (Cu) i mangan (Mn). U tkivima sisavaca postoje 3 forme SOD: Cu-Zn-SOD (SOD1) u citosolu i Mn-SOD (SOD2) u mitrohondriju. Izvanstanični SOD (EC-SOD) nalazi se u izvanstaničnom prostoru. Superoksid brzo reagira sa dušikovim oksidom (NO) reducirajući ga i formira oksidativni peroksinitrilni radikal. SOD je neophodan za zdravlje stanice, štiti tijelo od kisikovih radikala i drugih štetnih spojeva koji uzrokuju starenje i apoptozu stanice. Razine SOD opadaju sa godinama, kada se ubrzava formiranje slobodnih radikala. Sugerira se da dostatna razina SOD štiti imunološki sustav, i reducira šanse za oboljenje te usporava proces starenja (Krishnamurthy i Wadhvani 2012).

**Katalaza (CAT)** je oksidativni enzim i hemprotein prisutan u svim živim organizmima. Ima važnu ulogu u obrani od oksidacijskog stresa u stanjima hiperglikemije i kardiovaskularnih bolesti. Glavni je regulator metabolizma vrlo reaktivnog vodikovog peroksida koji nastaje kao produkt metabolizma energije. Nakupljane toksične vodikovog peroksida oštećuju proteine, DNA, RNA i lipide. Katalaza enzimski prevodi vodikov peroksid na kisik i vodu i na taj način ga neutralizira. Nedostatak enzima u  $\beta$ -stanicama gušterače dovodi do povećanog oksidacijskog stresa a time posljedično i do disfunkcije stanica.  $\beta$ -stanice obiluju mitohondrijima i zato mogu biti izvor ROS. Katalaza štiti  $\beta$ -stanice od štete koju uzrokuje vodikov peroksid. Niske razine katalaze uzrokuju methemoglobinemiju, hemolitičku anemiju, što zajedno vodi do deficijencije enzima glukoza-6-dehidrogenaze.

Prema Patelu i sur. (2013) u stanju hiperglikemije dolazi do promjene i nagomilavanja superoksida, vodikovog peroksida, polarizacije mitohondrijske membrane i smanjuje se ekspresija gena za katalazu (Chelikani i sur., 2004, Takemoto i sur., 2009; Patel i sur, 2013). Katalaza je tetramerni protein sa 4 podjedinice. Kao metalni kofaktor CAT koristi željezo ili mangan i katalizira razgradnju ili redukciju vodikovog peroksida dovodeći tako do završetka proces detoksifikacije koje je započeo SOD. CAT je vrlo učinkovit enzim, u jednoj sekundi tako može razgraditi milijune molekula vodikovog peroksida. Primarno, CAT je smješten u peroksisomima, ali u mitohondrijima stanica sisavaca ga nema, s iznimkom u srcu štakora. Katalaza je brzo reaktivna i sa donorima vodika kao što su metanol, etanol, mravlja kiselina i fenoli sa peroksidnom aktivnošću. Aktivnost CAT može se objasniti u 2 stupnja. Molekula vodikovog peroksida oksidira hem na oksiferilnim vrstama. Druga molekula vodikovog peroksida ponaša se kao reducens kako bi regenerirala enzim, time producirajući vodu i molekularni kisik. Vodikov peroksid u niskim količinama regulira neke fiziološke procese kao što su signalizacija proliferacije stanice, smrt stanice, metabolizam ugljikohidrata, mitohondrijska funkcija i upostavljanje tiolnog redoks balansa. Međutim, u većim količinama to je za stanicu štetno. Manjak ili mutacija ovoga enzima dovodi do oboljenja i različitih abnormalnosti. Prema Zamocky i Koller (1999) oksidacija DNA i rizik od razvoja raka izraženiji je u osoba koje imaju polimorfizam gena i promijenjenu ekspresiju i aktivnost gena u katalazi. U slučaju manjka katalaze  $\beta$ -stanice gušterače sadrže veliku količinu mitohondrija te podliježu oksidacijskom stresu putem produkcije ROS dovodeći do disfunkcije  $\beta$ -stanica gušterače te na kraju do dijabetesa (Ullah i sur., 2016). Hiperglikemija dovodi do povećanja produkcije vodikovog peroksida i do smanjene regulacije ekspresije gena za katalazu.

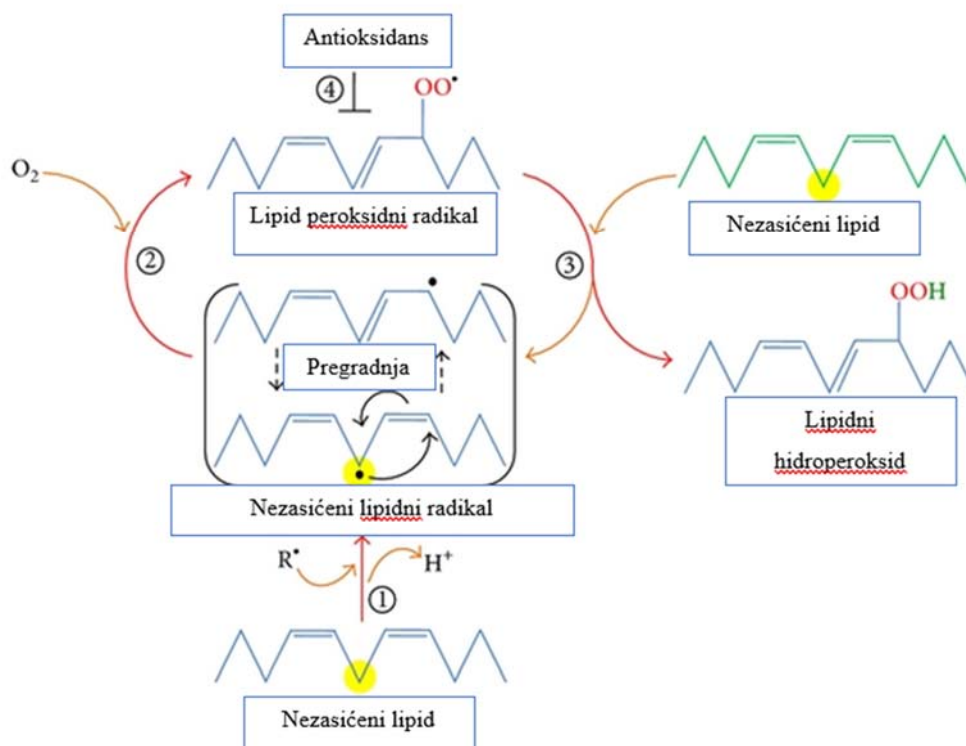


**Slika 7.** Prikaz statusa biljega oksidacijskog stresa u stanju hiperglikemije.

Kratice: MDA - malondialdehid; AOPP - PCO-karbonilirani proteini; GSH - reducirani glutation; SOD - superoksid dismutaza (preuzeto i prilagođeno od Kumar Tiwari i sur., 2013).

**Lipidna peroksidacija** - Lipidi su jedni od prvih na koje štetno djeluju slobodni radikali. Hidroperoksidi imaju toksični učinak na stanicu, direktni ali i indirektni razgradnjom visoko toksičnih hidroksilnih radikala. Mogu reagirati sa metalima kao što su željezo i bakar te formirati stabilne aldehide, kao što je malondialdehid (MDA) koji uništava staničnu membranu (Halliwell, i Chirico, 1993). Peroksidacijom lipida nastaju visoko reaktivni aldehidi, MDA, akrolein, 4-hidroksinoneal (HNE), 4-oksononeal i isolevuglandini (isoLGs). Dosadašnjim istraživanjima pokazano je da peroksi radikal može eliminirati vodik sa lipida i na taj način producirati hiperperokside koji dalje propagiraju put slobodnih radikala. MDA je definiran kao primarni biomarker lipidnog oštećenja i oksidativnog stresa. Značajna promjena u metabolizmu lipida i njihovoj strukturi opažena je u pacijenata oboljelih od hiperglikemije i kardiovaskularnih komplikacija (Fowler, 2008).

Povišena razina MDA u stanju hiperglikemije sugerira prisutnost lipidne peroksidacije u stanju sekundarnih komplikacija uzrokovanih hiperglikemijom. Povišena razina MDA također je znak oslabljenog djelovanja obrambenog mehanizma enzimskih i neenzimskih antioksidanasa. Lipidna peroksidacija odvija se kroz nekoliko faza: inicijacije, propagacije i terminacije. U prvoj fazi inicijacije dolazi do reakcije koju pokreće hidroksilni radikal, i tada nastaje lipidni radikal. Lipidni radikal brzo reagira sa kisikom te nastaje peroksilni radikal. Peroksilni radikal oduzimanjem vodika iz nezasićene veze masne kiseline stvara lipidni hidroperoksid, a koji onda opet stvara nove radikale te tako dolazi do lančane reakcije. U fazi terminacije pod utjecajem antioksidanasa se gasi proces lipidne peroksidacije (Slika 8) (Štefan i sur., 2007; Ayala i sur., 2014).



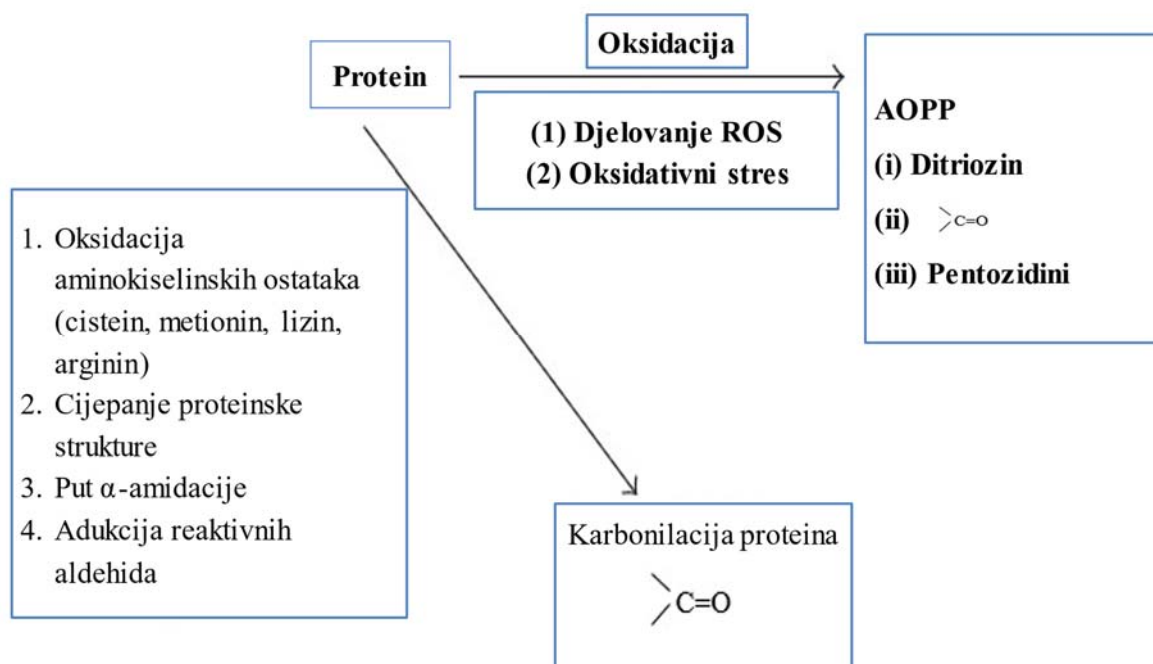
**Slika 8.** Proces lipidne peroksidacije (preuzeto i prilagođeno od Ayala i sur., 2014)

Kronična izloženost hiperglikemiji može uzorkovati inaktivaciju antioksidacijskih enzima kao što su SOD, CAT i GSH gliciranjem tih proteina inducirajući tako oksidacijski stres i lipidnu peroksidaciju.

**Oksidacija proteina** - Proteini su biomolekule uključene u mnoge fiziološke procese u staničnoj signalizaciji (Slika 9). Kao i lipidi, podložni su strukturnim i funkcijskim promjenama pri izloženosti ROS-u.

Karbonilacija proteina posljedica je direktne oksidacije aminokiselinskih ogranaka, lizina, arginina, prolina i treonina ili direktne oksidacije sa reaktivnim kisikovim vrstama ili neoksidativnih reakcija sa oksidiranim lipidima koji sadržavaju karbonilnu skupinu (Monnier i sur., 2010). Vrlo su podložni ireverzibilnom negativnom utjecaju reaktivnih kisikovih vrsta. Napredni oksidirani proteinski proizvodi (engl. *advanced oxidative protein products*, AOPP) i karbonilirani proteini, predstavljaju biomarkere oštećenja proteina te su mjerljivi biomarkeri oksidacijskog stresa u različitim bolestima (Gryszczynska i sur., 2017).

Povećana koncentracija karboniliranih proteina primijećena je u različitim stanicama i plazmi pacijenata oboljelih od hiperglikemije. Glavni faktori akumulacije nefunkcionalnih i oštećenih proteina su glikooksidacija i lipooksidacija. Karbonilacija je ireverzibilna, neenzimatska promjena u strukturi proteina (Cabiscol i sur., 2000; Kumar Tiwari i sur., 2013). Cijepanje proteina  $\alpha$ -amidacija, i oksidacija glutaminskih bočnih ogranaka glavni su putevi koji dovode do nastanka karbonila (Galli, 2007). AOPP su biljezi oksidacije proteina tijekom oksidacijskog stresa, a predstavljaju ukupan status proteina u stanicama i tkivima. U kroničnog oksidativnog stresa, AOPP se formiraju reakcijama između proteina u plazmi i kloriranih oksidanasa. Takvi biljezi prisutni su u stanju kronične izloženosti hiperglikemiji. Oksidacija proteina u stanju hiperglikemije pogađa brojne fiziološke funkcije, uključujući bubrežnu. AOPP su proupalne i prooksidativne komponente koje se akumuliraju starenjem kao i kod kroničnih bolesnika a vode k endotelnoj disfunkciji i bolestima krvožilnog sustava. AOPP sadrže najčešće ditirozine koji podliježu umrežavanju, disulfidne mostove, karbonilne grupe te formiraju klorirane oksidanse, hipokloritne kiseline i kloramine (Kumar Tiwari i sur., 2013). Povećani oksidacijski stres i redukcija antioksidacijskog kapaciteta mogu biti povezani sa komplikacijama kod oboljelih od dijabetesa tipa 2. Hiperglikemija se smatra posljedicom subkliničkih kroničnih upala. Kronično povišeni biomarkeri upale direktno mogu povećati inzulinsku rezistenciju vodeći poremećaju signala lučenja inzulina i narušavanju homeostaza glukoze, kao i glikemije (Chenxiao i sur., 2016).



**Slika 9.** Glavni putevi formacije AOPP i C=O (preuzeto i prilagođeno od Grysczynska i sur., 2017)

## 2.4. DIABETES MELLITUS / HIPERGLIKEMIJA

### 2.4.1. Tipovi diabetes mellitusa

*Diabetes mellitus* je kronična metabolička endokrina bolest koja nastaje zbog nedovoljnog lučenja i/ili nepravilnog djelovanja inzulina i disfunkcije  $\beta$ -stanica gušterače, što rezultira povišenom razinom šećera u krvi, nepravilnim metabolizmom glukoze, masti i povišenim oksidacijskim stresom. U stanju dugoročne izloženosti hiperglikemiji dolazi do komplikacija kardiovaskularnog sustava, neuropatije, retinopatije, nefropatije, općenitog smanjenja kvalitete života i povećane stope smrtnosti u ranijoj dobi. Zbog nedovoljno lučenja inzulina ili ako stanice ne odgovaraju njegovu lučenje, dolazi do povišene glukoze u krvi. Uslijed takvog stanja, dolazi do pojave simptoma bolesti-poliurije (učestalo mokrenje), polidepsije (pojačana žeđ) i polifagije (pojačana glad) (Evans i sur., 2002; Bahadoran i sur., 2013; Al-Numair i sur. 2015; Manukumar i sur., 2017). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO) u svijetu 2014. godine od dijabetesa boluje 422 milijuna ljudi, u usporedbi sa 108 milijuna u 1980. godini.



Do 2035. godine predviđa se da bi moglo biti 592 milijuna oboljelih (Guariguata i sur., 2014). *Diabetes mellitus* prema Američkom dijabetičkom savezu (American Diabetes Association) iz 2008 klasificira se na:

- Dijabetes tipa 1- Oboljeli su ovisni o inzulinu, a zbog uništavanja  $\beta$ -stanica gušterače, smanjuje se ili se uopće ne luči inzulin
- Dijabetes tipa 2-Oboljeli nisu ovisni o inzulinu
- Gestacijski *dijabetes mellitus*- prvi put dijagnosticiran u drugom ili trećem tromjesečju trudnoće
- Drugi specifični tipovi dijabetesa

Dijabetes tipa I je autoimuna multifaktorna bolest nastala međudjelovanjem genetike i okoliša, gdje dolazi do propadanja  $\beta$ -stanica gušterače koje luče inzulin. To može biti uzrokovano mutacijom u human leukocit antigen (HLA) regiji prisutnoj u kromosomskom lokusu 6p21, nazvan IDDM1(engl. *insulin dependent diabetes mellitus locus on chromosome 6*) (Nerup i sur., 1974). Pacijenti oboljeli od dijabetesa tip I ovisni su o inzulinu jer gušterača gotovo potpuno prestane lučiti inzulin te je terapija inzulinom neophodna za preživljavanje bolesnika. Značajan je porast pojave dijabetesa tipa I, osobito u dječjoj dobi (Gushchin i sur., 2008).

Pacijenti oboljeli od dijabetesa tipa II su neovisni o inzulinu. Inzulina najčešće ima dostatno ali u čak 90% oboljelih su stanice neosjetljive na inzulin što nazivamo inzulinskom rezistencijom. Ovo je najčešći oblik šećerne bolesti u odraslih pretilih osoba, obično se javlja u odrasloj dobi. U posljednje vrijeme, kao posljedica lošijih životnih navika javlja se sve ranije. Rizik nastanka ovog tipa dijabetesa raste s godinama, debljinom, slabom tjelesnom aktivnosti i lošim prehranbenim navikama, dok genetski razlozi nastanka još uvijek nisu razjašnjeni. Većina oboljelih od dijabetesa tipa II su pretili i sama pretilost uzrokuje nastanak nekog stupnja inzulinske rezistencije. Također javlja se i u osoba sa optimalnim indeksom tjelesne mase što se u žena često povezuje sa sindromom policističnih jajnika (PCOS). Hiperglikemija se razvija postupno te je izravno odgovorna za početak nastanka svih posljedičnih kroničnih bolesti. Hiperglikemija nastaje iz tri razloga: smanjenim lučenjem inzulina iz  $\beta$ -stanica gušterače, smanjenjem iskoristivosti glukoze i porastom proizvodnje glukoze u jetri zbog nemogućnosti inzulina da inhibira endogenu proizvodnju glukoze te se nastavlja pojačana sinteza glukoze iz glikogenolize i glukoneogeneze (Manukumar i sur., 2017).

Poboljšanje u pacijenata je moguće promjenom načina života što se može očitovati kroz nekoliko mjeseci a mjerljivo je putem glikoliziranog hemoglobina, HbA1c (mjera količine šećera vezanog uz hemoglobin u crvenim krvnim zrnima) (Grant i Kirkman, 2015).

Gestacijski *diabetes mellitus* (GDM) je dijabetes dijagnosticiran u drugom ili trećem tromjesečju trudnoće, a u trudnoći je dijagnosticiran prvi put rutinskom kontrolom putem oralnog glukoza tolerans testa (OGTT). Tolerancija glukoze poboljšava se u ranoj trudnoći žena pod utjecajem humanog korionskog gonadotropina (hCG-a) koji djeluje proinzulinski. Međutim, u drugom tromjesečju, gubi se taj učinak čime se i smanjuje tolerancija glukoze. Luči se humani placentalni laktogen (HPL) čime se povećava inzulinska rezistencija u trudnice. Ako sekrecija inzulina postane nedovoljna da prevlada inzulinsku rezistenciju, nastupa intolerancija glukoze što je podloga za razvoj dijabetesa (Jukić i Dražančić, 1999; Đelmiš, 2009).

Drugi specifični tipovi dijabetesa izazvani su različitim bolestima, kao npr kroničnom upalom gušterače, poremećajem nadbubrežne žlijezde ili hipofize, rijetkim genetskim poremećajima te utjecajem kemikalija ili nekih lijekova.

Terapijski cilj u liječenju hiperglikemije jest postići propisnu regulacije glukoze u krvi (GUK) tako da glikolizirani hemoglobin u krvi (HbA1c) bude manji od 6,4% (Đelmiš, 2009), u čemu velik utjecaj imaju personalizirana prehrana bogata bioaktivnim molekulama, fizička aktivnost, personalizirana terapija te redovna samkontrola GUK.

Inzulinska rezistencija veliki je javnozdravstveni problem koji se početno pojavljuje u stanju preddijabetesa, čak desetak godina prije nego se dijagnosticira hiperglikemija. Metabolički sindrom je karakteriziran kombinacijom abdominalne pretilosti, kronično visokih razina inzulina a onda sa vremenom i povišene glukoze, dislipidemije i hipertenzije (Noratto i sur., 2017). Inzulinska rezistencija definirana je kao neuspješan unos glukoze i neiskorištavanje u perifernim tkivima kao odgovor na lučenje inzulina. Inzulinska rezistencija u fazi preddijabetesa je karakterizirana intolerancijom glukoze, što uključuje blago povišenu glukozu na tašte (glukoza na tašte 100-125 mg dL<sup>-1</sup> ili 5,6-6,9 mmol L<sup>-1</sup>) i/ili smanjenu toleranciju na glukozu (OGTT nakon 2 h glukoza u plazmi 140-199 mg dL<sup>-1</sup> ili 7,8-11 mmol L<sup>-1</sup>). Oksidativni stres uključen je u patogenezu hiperglikemije pogađajući direktno inzulinsku osjetljivost i β-stanice. Istraživanja na glodavcima ukazuju na smanjenu ekspresiju gena antioksidacijskih enzima, kao što su superoksid dismutaza, glutation peroksidaza i katalaza u β-stanica gušterače u odnosu na druga tkiva. Temeljem navedenog, primjena antioksidansa može spriječiti ili usporiti nastanak bolesti te poboljšati zdravlje (Umeno i sur., 2016). Mnoga epidemiološka istraživanja dokazuju da je konzumacija namirnica bogatih polifenolima kao prirodnim antioksidansima, povezana sa nižim rizikom od razvoja inzulinske rezistencije i hiperglikemije.

## 2.4.2. Patofiziologija hiperglikemije

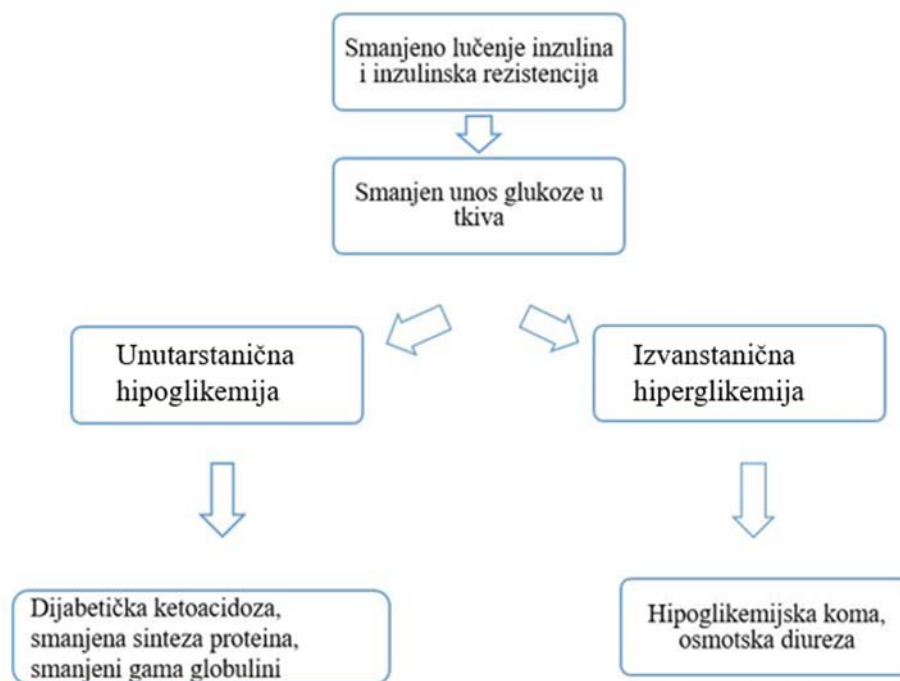
Nakon svakog obroka, posebice dominantnog ugljikohidratima poraste razina glukoze u krvi što je signal za lučenje inzulina i povećavanje prijenosa, biotransformacije i skladištenja glukoze u tkivima i mišićima. Osim što ima ulogu pohrane glukoze, inzulin sprječava lučenje glukagona, smanjuje koncentraciju masnih kiselina u serumu te vodi prestanku sinteze glukoze u jetri (Kangralkar i sur., 2010). Nedovoljno lučenje inzulina ili otpornost na njegovo izlučivanje rezultira nedovoljnim unosom glukoze u tkiva a prevelikim u krv. Tako dolazi do unutarstanične hipoglikemije te izvanstanične hiperglikemije. Unutarstanična hipoglikemija uzrokuje glukoneogenezu koja vodi do razgradnje masti i dijabetičke ketoacidoze i smanjuje sintezu proteina dovodeći do kahesije i polifagije dok izvanstanična hiperglikemija dovodi do hiperglikemijske kome i osmotske diureze (Ozougwu i sur, 2013). Sve je više pokazatelja da su oksidativni stres i nastanak slobodnih radikala glavna podloga patofiziologije dijabetičkih komplikacija uvjetovanih hiperglikemijom (Furukawa i sur., 2004).

Komplikacije hiperglikemije mogu biti makrovaskularne (koronarna bolest srca, bolest perifernih arterija, moždani udar) i mikrovaskularne (neuropatija, retinopatija, nefropatija) ali također i makrovaskularne i mikrovaskularne u isto vrijeme (dijabetičko stopalo).

Općenito komplikacije hiperglikemije mogu se kategorizirati u dvije skupine (Slika 10):

- Metaboličke akutne komplikacije: hipoglikemija, ketoacidoza, hiperosmolarna ne ketonska koma
- Sustavne dugoročne komplikacije: dijabetička nefropatija, mikroangiopatija, dijabetička neuropatija, retinopatija, ateroskleroza i infekcije

Uz mnoge čimbenike koji utječu na progresiju i kronično stanje hiperglikemije, prehrana je glavni na koji se može izravno djelovati. Velik je broj epidemioloških istraživanja koja podupiru tvrdnje da prehrana bogata visokim udjelom fitokemikalija, visokim antioksidativnim kapacitetom i polifenolnim komponentama može biti povezana sa manjim rizikom od hiperglikemije i pratećih bolesti regulacijom glukoze u krvi (Striegel i sur., 2015).



**Slika 10.** Patofiziologija hiperglikemije (preuzeto i prilagođeno od Ullah i sur., 2016)

Oksidativni stres ima primarnu ulogu u uništavanju stanica kao posljedice hiperglikemije. Visoke razine glukoze u krvi mogu stimulirati nastanak slobodnih radikala. Kada čovjekov obrambeni mehanizam nije više u mogućnosti štititi se od visoke razine ROS-a, te se naruši ravnoteža, stvaraju se uvjeti za oksidacijski stres (Kumar Tiwari i sur., 2013). Glavni izvor glukoze u našem tijelu potječe od hidrolize prehranom unešenih ugljikohidrata. Enzimi  $\alpha$ -amilaza gušterače i crijevna  $\alpha$ -glukozidaza hidroliziraju razgradnju glukoze.  $\alpha$ -amilaza hidrolizira  $\alpha$ -1,4-glikozidne veze i razgrađuje komponente poput amiloze i amilopektina u manje oligosaharide i disaharide, poput maltoze dok  $\alpha$ -glukozidaza hidrolizira disaharide u monosaharide (Striegel i sur., 2015). Inhibicija ovih enzima može biti jedna od ključnih u terapiji hiperglikemije (Apostolidis i Lee, 2010). Brojna klinička istraživanja sugeriraju da su pacijenti sa hiperglikemijom izloženi kroničnom oksidacijskom stresu (Wright i sur., 2006). Hipoglikemijski učinak polifenola se uglavnom odnosi na redukciju crijevne apsorpcije ugljikohidrata iz hrane, modulirajući aktivnost enzima uključenih u metabolizam glukoze, poboljšavajući funkciju  $\beta$ -stanica gušterače, inzulinske aktivnosti i stimulirajući njegovo lučenje. Jedno od najznačajnijih svojstava polifenola na metabolizam ugljikohidrata je inhibicija enzima  $\alpha$ -glukozidaze i  $\alpha$ -amilaze (Bahadoran i sur., 2013; Rasouli i sur., 2017).

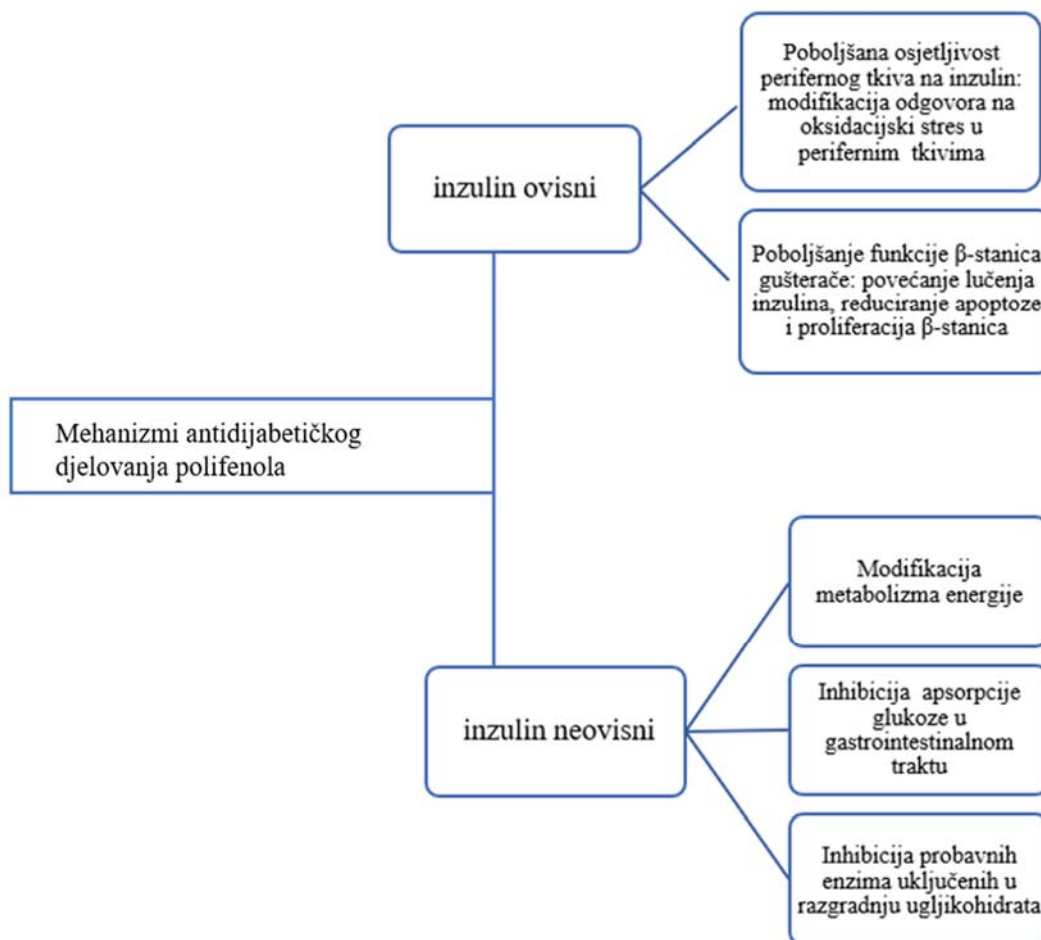
Neki polifenoli poput katehina i epikatehina iz zelenog čaja, klorogenske kiseline, ferulinske kiseline, kafeinske, kvercetina i naringenina mogu biti u međureakciji sa apsorpcijom glukoze, putem inhibicije  $\text{Na}^+$  glukoznog prijenosnika 1 i 2 (SGTL1 i SGTL2). Neka istraživanja ukazuju na to da polifenolne komponente mogu regulirati posprandijalnu glikemiju putem olakšanog odgovora inzulina i smanjenog lučenja inzulotropnog polipeptida ovisnog o glukozi te glukagonu sličan peptid (GLP1) (Dao i sur., 2011). Neki polifenoli mogu regulirati ključne puteve metabolizma ugljikohidrata i ravnotežu glukoze, glikolizu i glukoneogenezu, koje su u pacijenata sa hiperglikemijom oštećeni. Ferulinska kiselina i derivati hidroksicimetne kiseline suprimiraju glukozu u krvi povisujući razinu glukokinazne aktivnosti i produkcije glikogena u jetri, povećanjem razine inzulina te smanjenom glukoneogenezom i smanjenom aktivnošću glukoza-6-fosfataze i fosfoenolpiruvat karbokinaze čime se upostavlja bolja glikemijska kontrola. Inhibicija  $\alpha$ -amilazne i  $\alpha$ -glukozidazne aktivnosti *in vitro* su pokazani za polifenole iz bobičastoga voća kao što su jagode, maline, borovnice, crni ribizl, iz povrća poput bundeve, graha, kukuruza, patlidžana, leguminoza, zelenog i crnog čaja. Inhibicija glukoznog prijenosa postignuta je flavonoidima i fenolnim kiselinama (Kim i sur., 2008). Glukozom stimulirano lučenje inzulina iz gušteračnih  $\beta$ -stanica uključuje ulazak glukoze pomoću glukoznog prijenosnika GLUT2, povećava se razina ATP tijekom glikolize i ciklusa trikarboksilnih kiselina (TCA). Kronična izloženost nereguliranoj hiperglikemiji direktno povećava generaciju reaktivnih kisikovih vrsta, ometa mirohondrijsku funkciju i narušava lučenje inzulina. Izloženost glukozi suprimira AMP-aktiviranu protein kinaznu (AMPK) aktivnost što vodi do povećane lipogenaze i posljedično do oštećenja normalne funkcije  $\beta$ -stanica gušterače. Neki polifenoli, kao što su katehini, povećavaju  $\beta$  oksidaciju u masnom tkivu, reguliraju i aktivnost lipoprotein lipaze, kompleksa sintaze masnih kiselina i peroksisom proliferator aktivirajući receptor PPAR $\gamma$  (Bahadoran i sur., 2013).

### **2.4.3. Pozitivni učinci polifenola u prevenciji komplikacija hiperglikemije**

Jedna od najvažnijih uloga polifenola koja je do sada utvrđena je sprječavanje dugoročnih komplikacija hiperglikemije. Do sada je najviše istraživanja usmjereno na antocijanine i antocijaninima bogate ekstrakte koji poboljšavaju protok krvi, preveniraju hiperglikemijom induciranu mikroangiopatiju, povećavaju mikrovaskularnu permeabilnost, smanjuju agregaciju leukocita u stijenkama krvnih žila i poboljšavaju kapilarnu filtraciju albumina (Bahadoran i sur., 2013).

Flavonoli imaju potencijalni učinak za poboljšavanje kognitivne funkcije i sekundarnih promjena živčanog sustava koje su nastale kao posljedica kronične izloženosti hiperglikemiji putem inhibicije acetilkolin esteraze i slabljenja učinka oksidativnog stresa u živčanom sustavu.

Antocijani se smatraju modulatorima metabolizma masnoga tkiva. Poboljšavaju lučenje adipocitokina u stanju inzulinske rezistencije, povećavajući  $\beta$ -oksidaciju i smanjuju akumulaciju masti u adipocitima. Cijanidin i cijadinin-3-glukozid pokazuju nekoliko terapijskih učinaka na disfunkciju adipocita kroz smanjenje plazminogen aktivatora inhibitora 1 i interleukina 6, induciraju rad acetyl CoA i ekspresiju gena adiponektina (Edirisinghe i Burton-Freeman, 2016). Ukupan udio polifenola se razlikuje bitno između različitih izvora. Ukupan sadržaj od oko 100-300 mg na 100 g voća karakterističan je za crni ribizl, maline i jagode, no razina sadržaja može ovisi uvelike o fiziološkoj zrelosti te o procesiranju i daljnjem postupanju sa voćem (Scalzo i sur., 2005). Bobičasto voće također sadržava i proantocijanidine i elagitanine. Sastav polifenola u bobičastom voću određuje ne samo boju nego i njihove moguće različite utjecaje na zdravlje (Burton-Freeman i sur., 2016). Dosadašnja *in vivo* i *in vitro* istraživanja na animalnim modelima potvrdila su antihiperglikemijsko djelovanje polifenola iz bobičastog voća (Grace i sur., 2009; Takikawa i sur., 2010). Antihiperglikemijski učinci uglavnom se odnose na postizanje bolje homeostaze glukoze u čijem centru je inzulin (Slika 11) (Edirisinghe i Burton-Freeman, 2016).



**Slika 11.** Mehanizmi antihiperглиkemijskog djelovanja polifenola (Edirisinghe i Burton-Freeman, 2016)

Mehanizmi antihiperглиkemijskog djelovanja polifenola iz bobičasnog voća u stanju hiperглиkemije je višestruko: pojačava funkciju  $\beta$ -stanica gušterače, djeluje na oksidativni stres što pojačava osjetljivost na inzulin, potiče proliferacijom  $\beta$ -stanica gušterače te povećava osjetljivost perifernih tkiva na inzulin modifikacijom upalnih procesa i oksidativnog stresa u perifernim tkivima. Polifenoli inhibiraju probavne enzime uključene u probavu ugljikohidrata, inhibiraju apsorpciju glukoze u gastrointestinalnom traktu i modificiraju metabolizam energije. Istraživanja pokazuju da promjene u ekspresiji gena upalnih parametara mogu utjecati na povećanje inzulinske osjetljivosti (Seymour i sur., 2011). Antihiperглиkemijski učinak antocijanina ogleđa se osim u staničnim signalnim putevima i u inzulinski ovisnim i neovisnim putevima, kao što je modifikacija glukagonu sličnog peptida (GLP-1), promjene peroksisom proliferatnog aktiviranog receptora i modifikaciji endogenih antioksidanasa.

Iako voće općenito ima značajne pozitivne učinke na zdravlje, bobičasto voće zbog svog jedinstvenog polifenolnog sastava zauzima posebno mjesto. Nekoliko epidemioloških istraživanja ukazuje na inverznu vezu između unosa polifenola iz bobičastog voća i pojave dijabetesa tipa II (T2DM). *In vivo* i *in vitro* podaci sugeriraju da bobičasto voće ispoljava antihiperглиkemijski učinak putem stanične signalizacije u uspostavljanju homeostaze glukoze u gušterači, jetri, skeletnim mišićima i adipoznom tkivu (Edirisinghe i Burton-Freeman, 2016).

Da bi se utvrdila točna hipoglikemijska uloga polifenola potrebno je poznavati biodostupnost tih bioaktivnih molekula kao i njihovih metabolita. Također, nisu potpuno razjašnjeni međusobni utjecaji komponenti u prehrambenom sustavu/formi, budući da bobičasto voće najčešće nije hrana koja se konzumira zasebno već u kombinaciji sa drugim komponentama sa kojima ulaze u međureakciju, kako u probavnom sustavu tako u cirkulaciji. Dobro provedena istraživanja na ljudima sa naglaskom na mehanizme djelovanja polifenola mogle bi razjasniti njihovu ulogu u prevenciji i kontroli hiperглиkemije (Wedick i sur., 2012; Mursu i sur., 2014).

#### **2.4.4. Građa i metabolizam inzulina**

Inzulin je peptidni hormon kojega izlučuju  $\beta$ -stanice Langerhansovih otočića gušterače, a građen je od dva aminokiselinska lanca A i B. Lanac A sadrži 21 aminokiselinu a lanac B 30 aminokiselina. Međusobno su povezani disulfidnim mostovima. Aminokiselinski slijed inzulina varira između vrsta, uključujući položaje disulfidnih mostova, oba kraja A lanca i C-terminalni kraj B lanca. Inzulin tvori trodimenzionalnu konformaciju. Iako je aktivni oblik inzulina monomer, u otopini molekule inzulina imaju tendenciju stvaranja dimera zbog uspostavljanja vodikovih veza između C-terminalnih krajeva B lanaca (Mayer i sur., 2007).

Tijekom unosa ugljikohidrata, njihove probave i apsorpcije dolazi do lučenja inzulina iz gušterače, koja dobiva signal da je šećer u krvi porastao te otpuštanjem inzulina regulira ugradnju glukoze iz krvotoka u stanice i tkiva. Kod zdravih osoba signalizacija posredovana lučenjem inzulina smanjuje glukozu u krvi lučenjem dovoljnih količina inzulina iz  $\beta$ -stanica gušterače, povećanjem unosa glukoze u periferna tkiva, premještanjem glukoznog transportera (GLUT 4), promicanjem unosa glukoze i skladištenja u jetri te supresije proizvodnje glukoze u jetri, inhibiranjem lipolize i poticanjem lipogeneze u masnom tkivu.



Ako je osjetljivost na inzulin smanjena, dolazi do inzulinske rezistencije što rezultira smanjenim unosom glukoze u tkiva, smanjenom supresijom proizvodnje glukoze u jetri a povećanom glukozom u krvi na tašte i postprandijalno te povećanim lučenje inzulina iz gušterače i njenim iscrpljivanjem (Laville i Nazare, 2009).

U metabolizmu proteina inzulin stimulira prijenos i unos aminokiselina u jetru kao i ugradnju aminokiselina u proteine. U metabolizmu lipida inzulin stimulira unos glukoze u adipozne stanice te sintezu i pohranu triglicerida i inhibira razgradnju pohranjenih lipida (Lavielle i Nazare, 2009).

U zdravih ljudi inzulinska signalizacija promiče hepatski unos glukoze, pohranu i supresiju proizvodnje glukoze u jetri te inhibira lipolizu i promiče lipogenezu u adipoznom tkivu (Laville i Nazare, 2009).

#### **2.4.5. $\alpha$ -amilaza**

Alfa amilaze su kalcijevi metaloenzimi čije je funkcioniranje ovisno o prisutnosti kalcija. Amilaza je građena od nerazgranatih lanaca D-glukoze koji su međusobno povezani  $\alpha$ -1,4-glikozidnom vezom. Alfa amilaze su skupina enzima koji hidroliziraju  $\alpha$ -1,4-glikozidne veze u škrobu (polisaharidu) i nekim drugim oligosaharidima (Mehta i Satyanarayana, 2016).

Mnogo je probavnih enzima u čovjeka a jedan od najznačajnijih je gušteračina alfa amilaza koja se ponaša kao katalizator u reakcijama koje uključuju hidrolizu alfa-1,4 glikozidnih veza škroba, amilopektina, amiloze, glikogena i drugih. Ostali enzimi koji kataliziraju završnu razgradnju ugljikohidrata su alfa glukozidaza i maltaza koje vode do glukoze kao završnog produkta. Velike molekule poput škroba ne mogu proći krvnu barijeru kao što to može glukoza i zato ih je potrebno pocijepati.

Ako dolazi do viška pretvorbe škroba u šećere, povećat će se razina glukoze u krvi a tada dolazi do uloge inzulina kako bi stanice počele metabolizirati višak šećera i pohranjivati ga u glikogen, što je zapravo beskonačni ciklus u zdrave osobe. Međutim, pojačana aktivnost enzima amilaze kao i smanjeno lučenje inzulina ili rezistencija na njegovo lučenje vodi u hiperglikemiju. Stoga je inhibicija alfa amilaze od velike važnosti u kontroli hiperglikemije (Kaushik i sur., 2015; Zhao i sur., 2015; Maity i sur., 2015).

Međutim, ni pretjerano inhibitorno djelovanje na alfa amilazu nije poželjno, jer može rezultirati abnormalnom bakterijskom fermentacijom neprobavljenih složenih ugljikohidrata u debelom crijevu, što dovodi do napuhanosti ili dijareje (Horri i sur., 1987).

Takvo inhibitorno djelovanje na alfa amilazu imaju mnoge farmakološki aktivne komponente poput vitamina, karotenoida i flavonoida koji posljedično snižavaju razinu glukoze u krvi, a za razliku od konvencionalnih lijekova koje koriste pacijenti u suzbijanju hiperglikemije, nemaju nuspojave. Osim snižavanja GUK, nose mnoge druge korisne učinke te se smatra da je od velikog interesa istražiti to područje primjene (Elder, 2004).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Kemikalije

- Vodena otopina ekstrakta cvijeta trnine (ECT) primijenjena u dozi od 25 mg kg<sup>-1</sup>
- Fiziološka otopina (Natrii chloridi infudibile, Pliva Hrvatska d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- NaOH – Kemika, Zagreb, Hrvatska
- PBS pH 7,0 (Fosfatni pufer) - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - Kemika, Zagreb, Hrvatska
- CuSO<sub>4</sub>x5H<sub>2</sub>O - Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O - Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x12H<sub>2</sub>O - Kemika, Zagreb, Hrvatska
- EDTA (Etilen diamin tetraoctena kiselina) - Kemika, Zagreb, Hrvatska
- HCl (Klorovodična kiselina) - Kemika, Zagreb, Hrvatska
- NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, reducirani) – Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- DTNB (Ellmanov reagens - 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzojeva kiselina) – Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- Glutation reduktaza - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- K, Na – tartarat - Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Folin-Ciocalteu reagens - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- TBA (Tiobarbiturna kiselina) - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- SDS (natrij dodecil sulfat) - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- DMSO (Dimetil sulfoksid) – Heiltrophen, Njemačka
- Ksantin - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- Ksantin oksidaza - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- Cyt C (citokrom C) - Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- Aloksan-monohidrat - Sigma Chemical, St. Louis, SAD
- Narketana<sup>®</sup> Vetoquinol S.A., BP 189 Lure Cedex, Francuska (djelatna tvar Ketamin)
- Xylapana<sup>®</sup> Vetoquinol Biowt Sp., Gorzow, R. Poljska (djelatna tvar Ksilazin)

- KIT za određivanje  $\alpha$ -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. METODE

#### 3.2.1. Pokusne životinje

Ovo istraživanje provedeno je na miševima visokosrodnog soja C57BL/6. Miševi su uzgojeni u jedinici za uzgoj laboratorijskih životinja Zavoda za animalnu fiziologiju na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu a u pokusu su korišteni miševi od 3 mjeseca, prosječne mase 30 g. Po 8 životinja je bilo u kavezima dimenzija 20 cm x 30 cm x 20 cm na temperaturi od 22 °C uz neograničen pristup hrani i vodi *ad libitum*. U kavezima su bili uvjeti 12 sati svjetla i 12 sati tame pri 22 °C i 60% vlažnosti. Hranjeni su standardnom hranom za miševе 4RF21 (Mucedola, Italija, oblik pelete 12). Nutritivna vrijednost hrane prikazana je u Tablici 3.

**Tablica 3.** Nutritivna vrijednost Mucedola standardne hrane za miševе i štakore

Sastav standardiziranog peleta u prehrani laboratorijskih miševa i štakora	Analitičke komponente i dodaci prehrani
Pšenica	12% vlage
Pšenična slama	18,5% proteina
Ljuske lješnjaka	3% masti
Kukuruz	6% sirovih vlakana, 7% sirovog pepela
Sojino zrno	E672 (vitamin A)
Kukuruzni gluten	E671 (vitamin E)
Riblji ekstrakt	E1 (Fe)

Dikalcijev fostat	E2 (I)
Natrijev klorid	E3 (Co)
Sir u prahnu	E4 (Cu)
Sojino ulje	E5 (Mn)
Kvasac	E6 (Zn)

Održavanje i njega svih pokusnih životinja provedena je u skladu sa smjericama koje su na snazi u Republici Hrvatskoj (Zakon o dobrobiti životinja, NN #102, 2017 i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u pokusima ili druge znanstvene svrhe NN #47, 2011, a provodi se u skladu s Uputama za njegu i korištenja laboratorijskih životinja DHHS publ.#(NH)86-123. Pokus je odobren od strane Etičkog povjerenstva Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu (broj odobrenja 251-58-10617-14-37).

### 3.2.2 Dizajn pokusa

Sve životinje su na početku pokusa nasumično raspoređene u 8 eksperimentalnih skupina (4 ženske i 4 muške skupine C57BL/6 miša). Prije izvođenja pokusa, životinje su označene te im je prije i tijekom eksperimenta mjerena tjelesna masa. Životinje su svakodnevno intragastričnim putem tretirane oralno, korištenjem gastralne kanile.

#### ***Eksperimentalne grupe C57BL/6 miša:***

K – Kontrolna grupa (0,3 mL fiziološke otopine),

ECT – ekstrakt cvijeta trnine – *Prunus spinosa* L. (25 mg kg<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>),

AL – aloksan (Aloksan-monohidrat 150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase),

AL+ECT – ekstrakt cvijeta trnine + aloksan

K – Kontrolna grupa (0,3 mL fiziološke otopine),

ECT – ekstrakt cvijeta trnine – *Prunus spinosa* L. (25 mg kg<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>),

AL – aloksan (Aloksan-monohidrat 150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase),

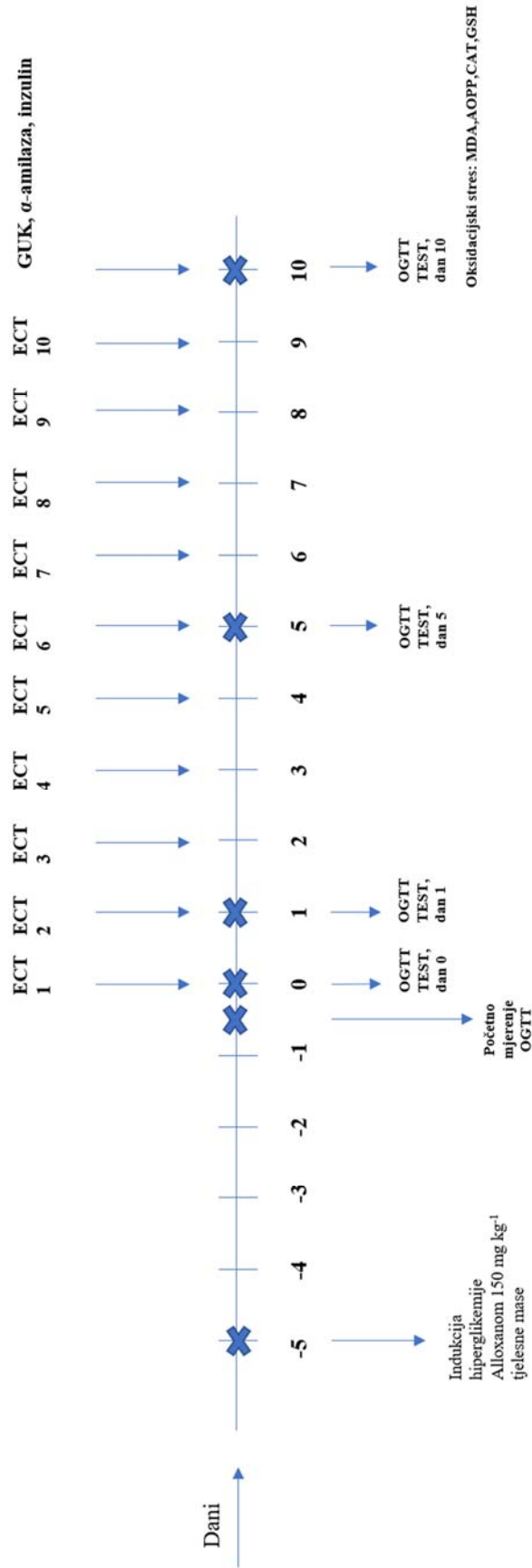
AL+ECT – ekstrakt cvijeta trnine + aloksan



Životinje su žrtvovane nakon 24 sata, 5-og i 10-og dana provedbe eksperimenta. Tijekom žrtvovanja sve životinje su bile anestezirane i analgezirane intraperitonealnom primjernom kombinacije Narketana® Vetoquinol S.A., BP 189 Lure Cedex, Francuska (djelatna tvar Ketamin) i Xylapana® Vetoquinol Biowt Sp., Gorzow, R. Poljska (djelatna tvar Ksilazin).

Životinjama su uzeti krv i organi jetre i bubrega za daljnju analizu. 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.

Prvi segment – biodostupnost, oksidacijski stres



Drugi segment – GUK,  $\alpha$ -amilaza u serumu i jetri, inzulin u serumu, OGTT

Slika 12. Dizajn pokusa

### 3.2.3. Određivanje polifenola u ekstraktu cvijeta trnine (ECT)

Prema Lovrić i sur. (2017) opisano je kako se priprema ekstrakt cvijeta trnine (ECT) te kako se određuje koncentracija polifenola u ekstraktu.

**Tablica 4.** UPLC-MS analiza polifenolnih spojeva u ekstraktu cvijeta trnine i standardnoj hrani za miševu (Mucedola) primjenjenih u obradi i prehrani miša C57BL/6

Polifenoli iz ekstrakta cvijeta trnine				Ukupni polifenoli (mg/100 g) suhog cvijeta trnine	Doza ukupnih polifenola (mg/kg tjelesne mase C57BL/6 miša)			
				2508,6	25,00			
Br.	Ime spoja	RT	m/z (prod.)	Koncentracija pojedinih polifenolnih spojeva (mg/100 g) u suhom cvijetu trnine	Koncentracija pojedinih polifenolnih spojeva (µg/mg ukupnih polifenola) u ekstraktu cvijeta trnine	Doza pojedinačnih spojeva (µg/kg tjelesne mase C57BL/6 miša) u ekstraktu cvijeta trnine	Koncentracija pojedinačnih polifenolnih spojeva u peletu standardne prehrane (Mucedola) (µg/100 mg)	
1	kafeinska kiselina	4,387	179	135	34,32	13,68	342,02	0,17
2	3-O-kafeoil kininska kiselina (	3,979	353	191	192,00	76,53	1913,41	<LOD
3	4-O-kafeoil kininska kiselina	4,444	353	173	24,04	9,58	239,57	0,07
4	klorogenska kiselina	3,776	353	191	55,47	22,11	552,79	0,01
5	p-kumarinska kiselina	5,764	163	119	23,67	9,43	235,88	0,05
6	3-p-kumaroil kininska kiselina	3,507	337	163	216,00	86,10	2152,59	<LOD
7	4-p-kumaroil kininska kiselina	5,181	337	173	61,53	24,52	613,19	0,07
8	ferulinska kiselina	6,427	193	134	8,69	3,46	86,60	0,09
9	3-O-feruloil kininska kiselina	4,043	367	193	132,2	52,69	1317,46	<LOD
10	galna kiselina	1,245	169	125	1,75	0,69	17,44	0,13
11	(+)-katehin	3,796	291	139	85,67	34,15	853,76	0,02
12	(-)-epikatehin	4,829	291	139	70,16	27,96	699,19	0,06
13	(-)-epikatehin-3-galat	6,583	443	139	0,51	0,20	5,08	0,07
14	(-)-epigalokatehin-3-galat	4,98	459	139	0,15	0,06	1,49	0,01
15	izoramnetin -3-rutinozid	7,355	625	317	4,68	1,86	46,64	2,50
16	kampferol -3-rutinozid	6,216	595	287	51,84	20,665	516,623	0,005
17	kampferol -acetil -rutinozid	9,402	637	287	0,68	0,271	6,777	<LOD
18	kampferol -pentozil -heksozid	7,291	581	287	50,27	20,039	500,977	0,024
19	kampferol -pentozid	8,234	419	287	494,94	197,297	4932,432	0,111
20	kampferol -ramnozid	7,166	433	287	436,62	174,049	4351,232	<LOD
21	kampferol -acetil -heksozid	11,29	491	287	0,92	0,367	9,168	0,010
22	kampferol -ramnozid -heksozid	8,064	595	287	49,79	19,848	496,193	0,029
23	kampferol -3-glukozid	7,489	449	287	0,60	0,239	5,979	0,009
24	apigenin	11,16	271	153	3,23	1,288	32,189	0,029
25	luteoin	9,8	287	153	6,68	2,663	66,571	0,013
26	kvercetin -3-rutinozid (rutin)	6,448	611	303	82,35	32,827	820,677	0,162
27	kvercetin -acetil -rutinozid	8,596	653	303	3,18	1,268	31,691	<LOD
28	kvercetin -3-glukozid	6,737	465	303	31,29	12,473	311,827	0,015
29	kvercetin -pentozid	7,396	435	303	226,75	90,389	2259,727	0,069
30	kvercetin -acetil -heksozid	5,096	507	303	2,34	0,933	23,320	0,138
31	kvercetin -ramnozid	7,557	449	303	81,15	32,349	808,718	0,057
32	kvercetin -pentozil -heksozid	6,605	597	303	56,81	22,646	566,152	0,013

Kratice: LOD, ispod granice detekcije (engl. *limit of detection*)



Kako bi se odredio kvalitativni i kvantitativni sadržaj polifenola, uzorak ECT od 250  $\mu\text{L}$  potrebno je pripremiti razrjeđivanjem a zatim u njega dodati 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 se zatim mjeri na  $\lambda = 360 \text{ nm}$ . Za određivanje polifenola u ekstraktu, ali i u Mucedola hrani za miševе, korištena je metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (UPLC) uz MS/MS detekciju a metodom prema Ganguly i sur. (2016). Prema primijenjenoj dozi ECT od  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase ukupnih polifenola, izražene su doze svakog pojedinog polifenola u ECT, kao i u primijenjenoj dozi u  $\text{mg kg}^{-1}$  tjelesne mase miša.

### **3.2.4. Određivanje biodostupnosti iz ekstrakta cvijeta trnine u tkivu jetre i bubrega C57BL/6 miša UPLC MS/MS metodom**

Uzorci za analizu koncentracije polifenola u tkivima jetre i bubrega normoglikemijskog i hiperglikemijskog C57BL/6 miša analizirani su u svim pokusnim skupinama u vremenu od 24 h, peti i deseti dan.

#### **3.2.4.1. Priprema uzoraka za enzimsku hidrolizu**

Tkivo jetre i bubrega (0,5 g) se homogenizira (ultrazvučni homogenizator - 3 ciklusa od po 30 sekundi uz stanku od 10 sekundi između ciklusa) u 1 mL 0,4 M fosfatnog pufera koji sadrži 6 mg askorbinske kiseline i 0,5 mg  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (pH=6,5). Nakon homogenizacije uzorci su centrifugirani 5 minuta na 16000 okretaja. Supernatant je odvojen i on je korišten za analizu koncentracije polifenola iz ECT. Pripremljeni uzorci su potom pohranjeni na  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **3.2.4.2. Enzimaska hidroliza i ekstrakcija uzoraka**

Metabolizam polifenola uključuje metilaciju, sulfataciju i konjugaciju s glukuronskom kiselinom te degradaciju glikozidnih kompleksa i heterocikličkih oblika polifenola. Enzimi  $\beta$ -D-glukozidaze,  $\beta$ -D-glukuronidaze i sulfataze djeluju na otpuštanje aglikona iz glikozidnih ili glukuronidnih oblika.

Pomiješano je 200  $\mu\text{L}$  uzorka (homogenata tkiva jetre i bubrega) s 10  $\mu\text{L}$  mješavine enzima (250 U  $\beta$ -glukuronidaze i 20 U sulfataze). Enzimaska hidroliza se provodi inkubacijom smjese uzoraka i enzima u trajanju od 45 minuta na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Nakon enzimske hidrolize, uzorci su ekstrahirani s etil-acetatom, a potom centrifugirani 5 min/12000 rpm/+4 °C. Postupak je ponovljen dva puta. Nakon ekstrakcije u supernatant je dodan etil-acetat koji sadrži 10 µL 20%-tne askorbinske kiseline, te se uzorci upareni do suha (engl. *vacuum centrifuge concentrator*; 30°C, 40 min). Nakon uparavanja talozi su otopljeni u 100 µL 10%-tne vodene otopine acetonitrila nakon čega su centrifugirani 5 min/16000 rpm pri sobnoj temperaturi.

### 3.2.4.3. Određivanje polifenola primjermom UPLC uz MS/MS detekciju (engl. *Ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometer*)

Polifenoli se određuju primjermom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (UPLC) uz MS/MS detekciju - metoda vanjskog standarda, a metoda se temelji na gradijentnoj eluciji. Ekstrahirani polifenoli se eluiraju u nizu pripadajuće polarnosti. Flavonol glikozidi i fenolne kiseline se određuju modificirano prema metodi kako su opisali Serra i sur. (2011). Prema Serri i sur. (2011) dvije su mobilne faze i to A (0,2% octena kiselina u H<sub>2</sub>O) i B (acetonitril), dok su u ovom istraživanju korištene mobilne faze: A (0,1% mravlja kiselina u H<sub>2</sub>O) i B (0,1% mravlja kiselina u acetonitrilu). Octena kiselina i acetonitril korišteni su od proizvođača BDH Prolabo, VWR (Lutterworth, Engleska).

Prije kromatografske analize uzorci se otope u 300 µL 10% vodenoj otopini acetonitrila (v/v). Nakon otapanja slijedi centrifugiranje na 5000 okr/5 min. Potom se 150 µL uzorka prebaci u vialicu. Određivanje fenolnih spojeva u uzorcima je provedeno prema donje navedenim kromatografskim uvjetima (Tablice 5 i 6).

**Tablica 5.** Kromatografski uvjeti za UPLC MS/MS metodu

Kolona:	Zorbax Eclipse Plus C18, 1,8 µm (100 × 2,1 mm I.D.) (Agilent, Santa Clara, CA, USA)
Pokretna faza:	otapalo A: 0,1% mravlja kiselina u redestiliranoj vodi otapalo B: 0,1% mravlja kiselina u acetonitrilu
Detektor:	MS/MS trostruki kvadropol (QqQ)
Ionski izvor:	ESI

MS parametri:	temperatura plina: 300 °C protok plina (N <sub>2</sub> ): 11 L/min nebulizer: 40 psi napon na kapilari: +4000 V; -3500 V maseni detektor: DMRM mode (m/z od 50 do 1000)
Eluiranje:	gradijentno – gradijent prikazan u Tablici X.
Temperatura:	35 °C
Vrijeme trajanja:	12,5 min
Injektirani volumen:	2,5 µL

**Tablica 6.** Gradijent za LC-MS/MS analizu polifenola Serra i sur. (2011)

t/min	Otapalo A	Otapalo B	Protok (mL/min)
0	95	5	0,4
10	65	35	0,4
10,1	20	80	0,4
11	20	80	0,4
11,1	95	5	0,4
12,5	95	5	0,4

Standardi su korišteni kako bi se pripremili baždarni pravci, i to kvercetin-3-glukozid, kampferol-3-rutinozid, kafeinska kiselina, galna kiselina, ferulinska kiselina, klorogenska kiselina, *p*-kumarinska kiselina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka), epikatekin, katehin, epigalokatehin galat, epikatehin galat, proantocijanidin B1, apigenin, luteolin (Extrasynthese, Genay, Francuska) i kvercetin-3-rutinozid (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgija). Pri kvantifikaciji spojeva korištena je deionizirana voda Milli-Q kvalitete (Millipore Corp., Bedford, SAD).

Temeljem dobivenih masenih spektara, prvo se identificiraju polifenoli, a temeljem jednadžbe baždarnih pravaca, kvantificiraju se potom isti.

### 3.2.5. Mjerenje biljega oksidacijskog stresa

#### 3.2.5.1. Izolacija i priprema tkiva jetre i bubrega za određivanje biljega oksidacijskog stresa

Prije nego što se izolira tkivo, životinje se podvrgavaju anesteziji mješavinom Xylapana i Narketana (*ip* 25 mg kg<sup>-1</sup> tj.m.), te se iskrvare punkcijom iz srca bez antikoagulansa. Jetra i bubrezi izvađeni su i izvagani na analitičkoj vagi. Da bi se odredili biljezi oksidacijskog stresa,

dijelove tkiva jetre i bubrega potrebno je prvo homogenizirati u 50 mM fosfatnom puderu pH 7 u omjeru 1:10 (w/v).

Fosfatni pufer (50 mM, PH 7): pripremi se otopina (a) 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  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 sa 183 mL otopine (b), potom se podese pH i doda se  $\text{H}_2\text{O}$  do 800 mL.

Organi se homogeniziraju ultrazvučnim homogenizatorom Bandelin Sonoplus HD270 (Bandelin, Njemačka) upotrebom sonde MS73 (Bandelin, Njemačka) snagom od 10%, u 3 ciklusa od kojih svaki traje 30 sekundi. Između svakog ciklusa potrebna je stanika. Za vrijeme rada uzorci moraju biti pothlađivani ledom. Homogenati koje se dobiju trebaju se centrifugirati centrifugom Mikro 200 R (Hettich, Njemačka) na 2000 x g 15 minuta uz hlađenje na +4 °C. Dobiveni supernatanti služe za određivanje biomarkera oksidacijskog stresa koje se može provoditi odmah ili se tako pripremljeni uzorci pohranjuju na -80 °C.

### 3.2.5.2. Određivanje proteina metodom po Lowry-u

Metodom po Lowry-u (1951) određuje se koncentracija proteina u pripremljenim homogenatima tkiva jetre i bubrega.

Metoda se temelji na kemijskoj reakciji između dvovalentnih iona bakra, u lužnatim uvjetima i amino skupine iz peptidne veze, a uslijed koje onda dolazi do redukcije  $\text{Cu}^{2+}$  u  $\text{Cu}^+$  i nastanka kompleksa  $\text{Cu}^+$ -protein. Dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa (fosfomolibdenska i fosfovolframova kiselina) dolazi do redukcije fosfomolibdena i fosfovolframove kiseline u molibden i fosfovolfram plavilo, od strane  $\text{Cu}^+$ -proteinskog kompleksa i bočnih ogranaka aminiokiselina.

Nastali kompleks je plavo ljubičaste boje te je kao takav mjerljiv sa maksimalnom apsorpcijom od  $\lambda=600$  nm. Intenzitet nastalog obojenja je direktno proporcionalan koncentraciji proteina u pripremljenim uzorcima.

Prije samog određivanja koncentracije proteina, potrebno je, pomoću standarda goveđeg seruma (*Bovine serum albumin*, BSA), izraditi baždarni dijagram koji prikazuje ovisnost apsorpcije o poznatoj koncentraciji proteina. Iz početne koncentracije BSA koja iznosi 20 mg mL<sup>-1</sup> treba pripremiti raspon koncentracija od 0 do 100 mg mL<sup>-1</sup> te slijepu probu koja sadrži destiliranu vodu, umjesto otopine proteina.

*Priprema otopina:*

Otopina A: 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> u 0,1 M NaOH

Otopina B: 0,5% CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O

Otopina C: 1% NaK-tartarat

Otopina D: 48 mL otopine A + 1 mL otopine B + 1 mL otopine C

Otopina E: Folin-Ciocalteu reagens, komercijalni reagens razrijeđen sa destiliranom vodom u omjeru 1:2

U epruvete se dodaje 100 μL uzorka i 2 mL otopine D, zatim se inkubira 10 minuta na sobnoj temperaturi. Svaki uzorak je rađen u triplicatu. Kada završi propisana inkubacija potrebno je odmah dodati 200 μL otopine E uz snažno vorteksiranje. Nakon toga slijedi ponovno inkubacija na sobnoj temperaturi 30 minuta. Istom procedurom potrebno je izraditi i baždarni dijagram. Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA odredi se nagib pravca i odsječak na y-osi, preko čega se onda izračuna nepoznata koncentracija proteina u uzorcima, a formulom kako slijedi:

$$\gamma = \frac{A_{uzorka} - b}{a} \cdot d \quad [1]$$

b = odsječak na y-osi standardne krivulje

a = nagib standardne krivulje

d = faktor razrijeđenja uzorka

Koncentracija proteina je izražena u mg/mL.

### 3.2.5.3. Određivanje produkata oksidacijskih proteina (AOPP)

Određivanje produkata oksidacijskih proteina određuje se imunoenzimskom ELISA metodom baziranoj na modelu dvostrukih protutijela a prema metodi Elisa, cat.no: MBS263319, MyBioSource, San Diego, SAD.

ELISA testom određuje se prisutnost i količina antigena, a reakcija se temelji na vezanju antitijela i antigena iz uzorka čime dolazi do obojenja a koje je mjerljivo spektrofotometrijski.

Princip sendvič ELISA metode mjeri količinu antigena koja je između dva sloja antitijela slika 12. Antigen koji se određuje mora imati dva antigenska mjesta za vezanje na antitijela, jer u sendvič metodi ELISA sudjeluju dva antitijela. Prvo se hvata antigen koji se zatim detektira. Antitijelo koje hvata ciljani antigen se veže za površinu mikrotitarske pločice. Potom se željeni uzorak dodaje u jažice mikrotitarske pločice. Ako je ciljani antigen prisutan on se veže za antitijela. Slijedi potom korak ispiranja kao i uklanjanja nevezanog materijala. Nakon toga u jažice se dodaju druga antitijela koja imaju vezani na sebe enzim koji ima ulogu biljega. Tako dodana antitijela se ponovo vežu za antigen i stvara se tzv. sendvič. Zatim slijedi drugo ispiranje kako bi se uklonilo sve nevezano i na kraju se dodaje bezbojni supstrat da bi ga enzim preveo u obojeni produkt. Kako bi se promjena obojenja mogla izmjeriti spektrofotometrijski, potrebno je dodati otopinu za inaktivaciju enzima kako bi se inaktivirala daljnja aktivnost.

#### *Priprema otopina:*

1. Koncentrirana otopina pufera za pranje: razrjeđuje se sa destiliranom vodom u omjeru 1:25
2. Mišji AOPP liofilizirani standard: dodaje se 0,1 mL u mišji AOPP liofilizirani uzorak i ostavi se da stoji 30 minuta. Nakon što se uzorak potpuno otopio, promiješa se i napravi razrijeđenje za standardnu krivulju : 50;25;12,5;6,25;3,12;1,56,0,78 ng ml<sup>-1</sup>.
3. Razrijeđenje standardnog uzorka: pripremiti 7 epruveta koje se označe. Dodaje se 300 μL standarda u svaku epruvetu. Zatim se pipetira 300 μL otopine iz prethodne epruvete u svaku sljedeću u skladu sa ovim koracima. Zadnja epruveta je negativna kontrola.

4. Biotinilirana mišja AOPP tekućina sa antitijelima: otapalo sa antitijelima razrijediti s koncentriranim biotiniliranim antitijelima 1:100.
5. Otopina enzim-konjugat: koncentrirani enzim-konjugat razrijediti sa otapalom enzim-konjugat 1:100

Biotiniliranu mišju AOPP tekućinu sa antitijelima je potrebno pripremiti 30 minuta prije početka rada. Dobivenu mikrotitarsku ELISA pločicu treba dva puta ispirati a potom u svaku jažicu dodati po 100  $\mu$ L biotinilirane otopine sa antitijelima. Nakon dodavanja otopine potrebno je jažice zaštititi vrpčama i inkubirati 60 minuta na temperaturi 37 °C.

Potrebno je potom pripremiti otopinu enzim-konjugat 30 minuta unaprijed. Nakon inkubacije potrebno je ispirati 3 puta pločicu a potom dodati prethodno pripremljenu otopinu enzim-konjugat u svaku jažicu, osim u jažice koje su shemom označene za slijepu probu. Jažice potom treba omotati kao i u prvom koraku zaštitnim vrpčama te staviti na inkubaciju 30 minuta na temperaturi 37 °C. Nakon što završi inkubacija, pločicu je potrebno ispirati 5 puta i na kraju dodati 100  $\mu$ L reagensa C (u svaku jažicu), čime dolazi do obojenja te je moguće očitati apsorbaciju na 450 nm, 10 minuta nakon dodavanja reagensa.

#### **3.2.5.4. Mjerenje produkata lipidne peroksidacije - malondialdehida (MDA)**

Lipidna peroksidacija temeljena je na mjerenju koncentracije malondialdehida (MDA), glavnog produkta lipidne peroksidacije, metodom kako je opisano prema Jayakumar i sur. (2008). Reakcijom malondialdehida i tiobarbituratne kiseline dolazi do nastanka ružičastog obojenja koji je mjerljivo spektrofotometrijski.

Odvaganim tkivima jetre i bubrega (100 mg) dodaje se 1 mL 50 mM fosfatnog pufera pH 7 te se homogenizira 15 minuta na brzini od 10000 rpm. U Eppendorf epruveti pomiješa se 200  $\mu$ L nerazrijeđenog supernatanta prethodno pripremljenih tkiva jetre i bubrega sa 100  $\mu$ L 8,1%-tne vodene otopine natrijeva dodecil sulfata (SDS-a), 750  $\mu$ L 20%-tne vodene otopine octene kiseline (pH=3,5) i 750  $\mu$ L 0,8%-tne vodene otopine tiobarbituratne kiseline. Tako pripremljena smjesa inkubira se 60 minuta u vodenoj kupelji pri temperaturi od 95 °C. Nakon inkubacije, smjesu je potrebno ledom naglo ohladiti a zatim centrifugirati 15 minuta na 5000 rpm pri +4 °C.

Nakon provedenog centrifugiranja potrebno je odvojiti supernatant te se mjeri apsorbanacija pri  $\lambda=532$  nm i 600 nm spektrofotometrom Libro S22 (Biochrom, Ujedinjeno Kraljevstvo).

Ukupna apsorbanacija se određuje formulom:

$$A = A_{532nm} - A_{600nm} \quad [2]$$

Koncentracija MDA izračunata je prema formuli:

$$c(MDA) = \frac{\Delta A \cdot V_{reakcijske\ smjese} (mL)}{\varepsilon \cdot V_{uzorka} (mL) \cdot c_{proteina} \left(\frac{mg}{mL}\right)} \quad [3]$$

Gdje je:

$$\varepsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$l \text{ (duljina kivete)} = 1 \text{ cm}$$

Koncentracija produkata lipidne peroksidacije izražava se kao nmol MDA/mg proteina.

### 3.2.5.5. Katalaza (CAT)

Aktivnost katalaze određuje se spektrofotometrijskom metodom prema Aebi-u (1984). U kiveti se pripremi najprije slijepa proba koju čine pomiješanih 20  $\mu$ L fosfatnog pufera i 980  $\mu$ L 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. U ostalim kivetama potom se priprema 20  $\mu$ L uzoraka tkiva jetre i bubrega kojeg pripremimo razrjeđivanjem i dodamo 980  $\mu$ L 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tim korakom započinje enzimska reakcija. Uzorci se trebaju termostatirati na 25 °C a potom se spektrofotometrijski izmjeri aktivnost enzima na valnoj duljini  $\lambda = 240$  nm, tijekom jedne minute. Katalazna aktivnost mjeri se padom apsorbanacije u jedinici vremena, a izražena je kao količina enzima koji razgrađuje 1  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u minuti kod pH = 7,0 pri 25 °C gdje koncentracija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada od 10,3 do 9,2 mM. Koncentracija katalaze izračunata je prema formuli:

$$c(KAT) = \frac{\Delta A \cdot V_{reakcijske\ smjese} (mL)}{\varepsilon \cdot V_{uzorka} (mL) \cdot c_{proteina} (mg/mL)} \cdot d \quad [4]$$



Gdje je:

$$\varepsilon(\text{H}_2\text{O}_2) = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1},$$

$$l \text{ (duljina kivete)} = 1 \text{ cm}$$

$d$  - faktor razrjeđenja uzorka.

Aktivnost CAT-a u uzrocima tkiva bubrega i jetre izražena je u  $\mu\text{mol}$  razgrađenog  $\text{H}_2\text{O}_2$  po minuti po miligramu proteina ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min mg}$  proteina), a to je jednako jedinicama CAT-a po miligramu proteina (U CAT/mg proteina).

### 3.2.5.6. Mjerenje aktivnosti glutaciona (GSH)

Aktivnost reduciranog glutaciona (GSH) – postupak određivanja koncentracije GSH se temelji na reakciji GSH i DNTB-a (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina). DNTB je poznat i kao Ellmanov reagens, a koristi se pri kolorimetrijskom određivanju tiolnih skupina u biološkim uzorcima. Ellmanov reagens uzrokuje oksidaciju GSH pri čemu dolazi do stvaranja veće količine 2-nitro-5-tiobenzoatne kiseline (NTB) i male količine glutation disulfida (GSSG). NTB je žuto obojeni produkt koji se mjeri na Plate Reader-u pri 412 nm, a na temelju čega indirektno dobivamo podatak o koncentraciji GSH (Eyer i sur. 2003).

Ukupna koncentracija GSH izračunata je prema formuli

$$c(\text{GSH}) = \frac{\Delta A_{\text{uzorak}} \cdot V_{\text{reakcijske smjese}}(\text{mL})}{\varepsilon \cdot V_{\text{uzorka}}(\text{mL}) \cdot C_{\text{proteina}}(\frac{\text{mg}}{\text{mL}})} \cdot d \quad [6]$$

Gdje je

$$\varepsilon(\text{DNTB}) = 8,22 \text{ mM}^{-1}$$

$$l = 0,6 \text{ cm}$$

$d$  = faktor razrjeđenja uzorka

Aktivnost enzima reduciranog glutaciona (GSH) smo izrazili kao mU  $\text{mg}^{-1}$  proteina (nmol/min/mg proteina).

### 3.2.5.7. Mjerenje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)

Aktivnost SOD-a određena je u supernatantima homogenata jetre i bubrega inhibicijom redukcije citokroma C u sustavu ksantin/ksantin oksidaza prema modificiranoj metodi Flohé i sur. (1971). U staklenu kivetu s 1,45 mL otopine A doda se 25  $\mu\text{L}$  uzorka (po potrebi razrijeđenog fosfatnim puferom pH=7,8 bez EDTA-e) i reakcija se započne dodatkom 25  $\mu\text{L}$  otopine B.

Vrijeme reakcije mjeri se 3 minute na valnoj duljini 550 nm. Svaki uzorak termostatiran je na 25 °C. Kako aktivnost ksantin-oksidge može varirati od pokusa do pokusa, nužno je uskladiti koncentraciju tog enzima tako da brzina redukcije citokroma C bude analogna porastu apsorbancije od 0,025 po minuti u kontrolnoj reakciji bez superoksid dismutaze.

Jedinica SOD-a definirana je kao količina enzima potrebnog za 50-postotnu inhibiciju redukcije citokroma C u baždarnom pravcu s poznatim koncentracijama SOD-a. Aktivnost SOD-a izražena je kao U/mg proteina.

#### *Priprema otopina:*

1. Otopina A: 1,5 mg 1 mM ksantina otopljen je u 9,86 mL 1 mM NaOH i tome je dodano 12,96 mg 0,05 mM citokroma C otopljenog u 85 mL 50 mM fosfatnog pufera pH=7,8 koji sadržava 0,1 mM EDTA-e.
2. Otopina B: 1500  $\mu\text{L}$  otopine svježe pripremljene ksantin oksidge u 50 mM fosfatnom puferu pH=7,8 koji sadržava 0,1 mM EDTA-e, konačne aktivnosti od 0,2 U/mL.
3. Osnovna otopina SOD-a iz goveđih eritrocita u koncentraciji 1 mg mL<sup>-1</sup> razrjeđuje se do koncentracije 1000 ng 100  $\mu\text{L}^{-1}$ ; ta se koncentracija namjesti na koncentraciju 500 ng 50  $\mu\text{L}^{-1}$  kojom se rade serije razrjeđenja u rasponu od 100 ng 50  $\mu\text{L}^{-1}$  do 500 ng 50  $\mu\text{L}^{-1}$ .

### 3.2.6. Mjerenje glikemijskih parametara

#### 3.2.6.1. Analiza sastava ugljikohidrata u ekstratu cvijeta trnine (ECT)

Analiza sastava ugljikohidrata u ECT provedena je HPLC metodom, kromatografskim razdvajanjem, s Agilent 1260 četverokutnim LC Infinity sustavom (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), a koji je opremljen sa detektorom refrakcije indeksa, automatskim injektorom te softwarom ChemStation. Detekcija ugljikohidrata glukoze, fruktoze i saharoze je provedena na Cosmosil-5-C18, Sugar-D (250 x 4,6 mm i.d.) stupcu (Naclai Tesque, Inc., Kyoto, Japan).

Prema Bogdanov i Bauman (1988) opisani su sastav otapala kao i korišteni gradijenti uvjeti. Pokretna faza A u izokratskoj eluciji sadržava 80% acetonitrila u vodi. Radni uvjeti bili su konstantna brzina protoka 1,3 mL/min u 20 minuta, temperature stupca 30 °C. Volumen ubrizgavanja je 10 µL a vrijeme ravnoteže 2 minute. Detektor reakcije korišten je za detekciju. Identifikacija ugljikohidrata je provedena usporedbom retencijskih vremena autentičnih normi za glukozu, fruktozu i saharozu dok je kvantifikacija šećera izrađena metodom vanjskog standarda. Svi standardi za ugljikohidrate su otopljeni metanol u koncentraciji od 50 mg L<sup>-1</sup>. Standardne otopine pripremljene su razrijeđivanjem početne otopine, a tako da se dobiju koncentracije u rasponu od 1 do 50 mg L<sup>-1</sup>.

Kalibracijska krivulja standarda fruktoze korištena je kako bi se provelo kvantitativno određivanje:  $y=70684x+4030$ ,  $R^2=0,00$ ; glukoze:  $y=72170x+6655,3$ ,  $R^2=0,99$ ; i saharoze:  $y=71630x+1199,3$ ,  $R^2=0,99$

### 3.2.6.2. Određivanje glukoze u krvi

Glukoza u krvi (GUK) kao biokemijski parametar indikator je pri dijagnosticiranju i praćenju hiperglikemije ali i drugih bolesti metabolizma ugljikohidrata.

Mjerenje GUK vrši se glukometrom na volumenu od nekoliko µL krvi, u ljudi iz prsta, u glodavaca iz repne vene (Togashi i sur., 2016). Lancetom se ubode repna vena miša te se krv potom prikupi izravnim protokom. Uzorci krvi uzimaju se na tašte nakon noćnog posta, potom nakon 24 h, 5 i 10 dana tretmana. Vrijednost je iskazana u mmol L<sup>-1</sup>. U glukometar je potrebno prvo umetnuti trakicu za test i onda ga uključiti, kako je opisano u uputi proizvođača. Na trakicu za test aplicira se uzorak krvi. Vrh za uzorak trakice se odvoji od uzorka nakon zvučnog signala glukometra. Na ekranu se tada pojavi izmjerena vrijednosti.

### 3.2.6.3. Određivanje inzulina u serumu

Određivanje produkata oksidacijskih proteina u ovom radu napravljena je 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.

"Sendvič" ELISA mjeri količinu antigena između dvaju slojeva antitijela (hvatanje i detekcija antitijela). 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 ciljni antigen veže se za površinu čvrstog nosača (mikrotitarske ploče). Uzorak se dodaje u jažicu i ukoliko je ciljni antigen prisutan on će se vezati za antitijela. Nakon ispiranja i uklanjanja nevezanog materijala, u jažice se dodaju druga antitijela s vezanim enzimom kao biljegom 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.

#### *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 sample 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<sup>-1</sup>).
  - *Razrjeđenje standardnog uzorka:* pripremiti sedam epruveta i označiti ih. Dodati 300 µL standardnog uzorka u svaku epruvetu. Pipetirajte 300 µL otopine iz prethodne epruvete u svaku slijedeću prema ovim koracima. Posljednja epruveta se smatra negativnom kontrolom.
3. Biotinilirana mišja AOPP tekućina s antitijelima: otapalo s antitijelima razrijediti s koncentriranim biotiniliranom 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.

Potrebno je pripremiti biotiniziranu otopinu s antitijelima 30 minuta ranije. Isprati nevezani uzorak s pločice dva puta. U svaku jažicu dodati 100  $\mu$ L biotinizirane otopine s antitijelima. Reakcijske jažice zalijepiti vrpčama i inkubirati 60 minuta na 37 °C. Pripremiti otopinu enzim-konjugat 30 minuta unaprijed te isprati tri puta. Dodati otopinu enzim-konjugata u svaku jažicu, osim onih namijenjenih za slijepu probu. Reakcijske jažice zalijepiti vrpčama i inkubirati 30 minuta na 37 °C te isprati pločicu pet puta. Dodati 100  $\mu$ L reagensa za boju C u svaku jažicu, promiješati te očitati apsorbanciju na 450 nm unutar 10 minuta.

#### 3.2.6.4. Određivanje aktivnosti $\alpha$ -amilaze

Određivanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze u serumu i jetri provodi se pomoću Amylase assay kit Abcam Amylase assay kit (2020) gdje se određuje alfa amilaza u dva reakcijska koraka. Alfa amilaza cijepa supstrat etildien-p NP-G7 na manje ulomke koji su modificirani  $\beta$ -glukozidazom. Tada se oslobađa kromofor i mjeri se kolorimetrijski pri 405 nm.

##### *Priprema otopina:*

Pufer kojim se ispituje amilaze: dolazi sa kompletom i spreman je za upotrebu.

Amilazna supstratna mješavina: dolazi sa kompletom i spreman je za upotrebu.

Pozitivna kontrola  $\alpha$ -amilaza: otopi se pozitivnu kontrolu u 50  $\mu$ L pufera za ispitivanje Nitrofenolni standard 2 mM: dolazi sa kompletom i spreman je za upotrebu.

Standardna otopina: koristi se 2 mM nitrofenolni standard za pripremu razrjeđenja za standardnu krivulju

Uzorci seruma se mogu prema uputi proizvođača testirati direktno dodavanjem u jažice mikrotirarske pločice. Preporučljivo je razrijediti uzorak (1/2, 1/5, 1/10).

Volumen reakcijske smjese iznosi 100  $\mu$ L. U jažice za pozitivnu kontrolu dodati 5  $\mu$ L pozitivne kontrole  $\alpha$ -amilaze i nadopuniti sa ddH<sub>2</sub>O do 50  $\mu$ L. U jažicama za uzorke se dodaje 2-50  $\mu$ L uzorka, a ako je potrebno dodaje se ddH<sub>2</sub>O da se postigne volumen od 50  $\mu$ L. Reakcijska smjesa se priprema za svaku reakciju zasebno miješanjem 50  $\mu$ L pufera za ispitivanje i 50  $\mu$ L supstratne smjese. U svaku jažicu dodaje se 100  $\mu$ L reakcijske smjese i dobro promiješa. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri 405 nm svake 2-3 minute tijekom 30-60 minuta na 25 °C, zaštićeno od svjetla.

### 3.2.6.5. Određivanje oralnog glukoznog tolerans testa (OGTT)

OGTT predstavlja evaluaciju odgovora na metabolizam glukoze u organizmu. Miševi su bili u fazi posta 6 h prije OGTT testa. OGTT se izvodi davanjem glukozne otopine u koncentraciji  $2 \text{ mg kg}^{-1}$ , svim skupinama. Uzorci krvi sakupljani su iz repne vene u 0, 15, 30, 60 i 120 minuta nakon oralnog unosa glukozne otopine.

Razine GUK mjerene su korištenjem glukometra Medismart Sapphire, a prema uputi proizvođača. Odziv prema metaboliziranju glukoze procjenjen je prema AUC, odnosno površinama ispod krivulje. Na početku je napravljeno početno mjerenje bez unosa glukoze kako bi se ustanovile razlike u dinamici apsorpcije glukoze u normoglikemijskog i hiperglikemijskog miša.

Nulti dan mjerenja proveden je odmah nakon davanja ECT kako bi se procijenio kratkotrajni učinak ekstakta cvijeta trnine na apsorpciju glukoze. Nakon toga u istim intervalima (0, 15, 60, 120 min) mjerenje se provelo 1, 5 i 10 dan eksperimenta.

### 3.2.7. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija uzoraka ( $SV \pm SD$ ). Za statističku analizu korištena je SPSS Statistika verzija 17.0 softvera te je korištena za vizualizaciju grafova te statističku komparaciju između pokusnih grupa, metodom Kruskal Vallis (ANOVA). Podatci su uspoređeni za statističku značajnost  $P \leq 0,05$  između testova. Višestruka usporedba tretiranih i netretiranih skupina je određivana pomoću ANOVA analize varijance.

## 4. REZULTATI

### 4.1. ISPITIVANJE POZITIVNOG UČINKA EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE *PRUNUS SPINOSA* L. NA OKSIDACIJSKI STRES I HIPERGLIKEMIJU U MIŠA C57BL/6

Dijabetes se danas smatra heterogenom skupinom bolesti koju karakterizira stanje kronične hiperglikemije. 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. Mnoge biljke imaju 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.

#### 4.1.1. Biodostupnost polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine u tkivu jetre i bubrega C57BL/6 miša

U ovom istraživanju prikazani su polifenolni spojevi iz ECT koji su detektirani UPLC MS/MS metodom u tkivima bubrega i jetre C57BL/6 normoglikemijskog i hiperglikemijskog miša (Tablica 7).

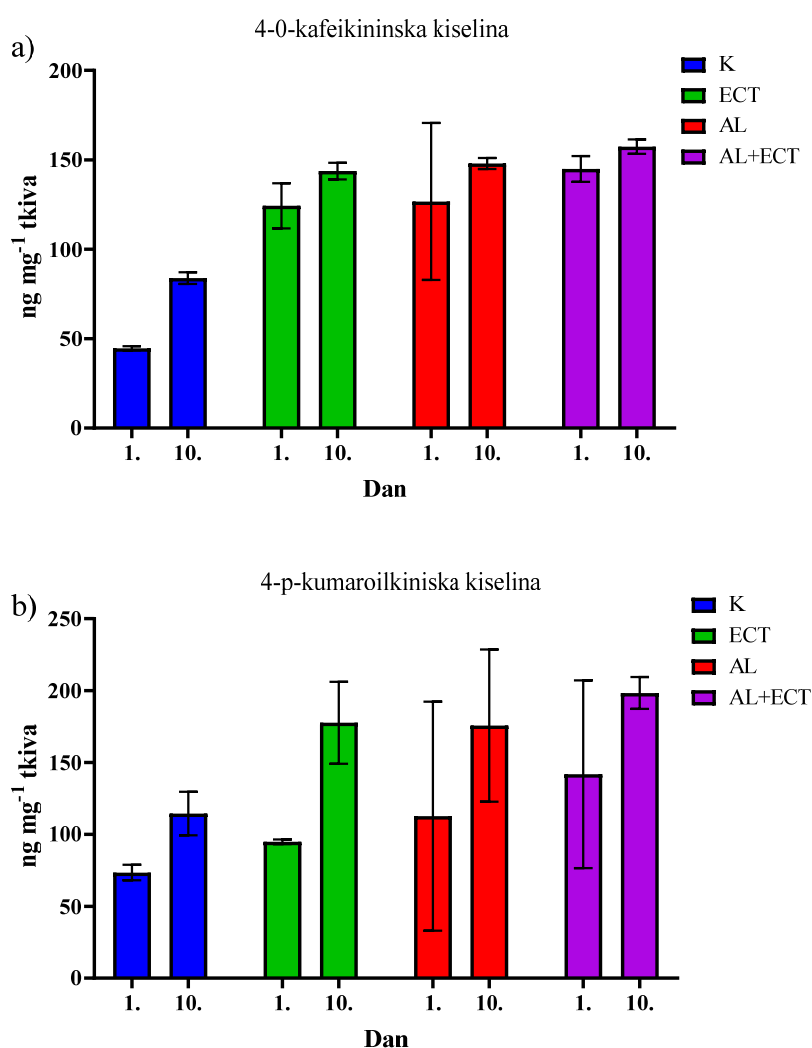
**Tablica 7.** U tkivu bubrega i jetre detektirani su sljedeći spojevi

	Bubreg	Jetra
Fenolne kiseline	<ul style="list-style-type: none"><li>○ 4-0-kafeikininska kiselina</li><li>○ 4-p-kumaroilkininska kiselina</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ 4-0-kafeikininska kiselina</li><li>○ 4-p-kumaroilkininska kiselina</li></ul>
Flavan-3-oli	<ul style="list-style-type: none"><li>○ katehin</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ katehin</li></ul>
Flavonoli	<ul style="list-style-type: none"><li>○ kvercetin-acetil-heksozid</li><li>○ kamferol-3-rutinozid</li><li>○ kvercetin-3-rutinozid</li><li>○ kampferol-pendozil-heksozid</li><li>○ izoramnetin-3-rutinozid</li><li>○ kvercetin-pentozid</li><li>○ kvercetin-ramnozid</li><li>○ kamferol-3-glukozid</li><li>○ kampferol-ramnozid-heksozid</li><li>○ kampferol-pentozid</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ kvercetin-acetil-heksozid</li><li>○ kamferol-3-rutinozid</li><li>○ kvercetin-3-rutinozid</li><li>○ kampferol-pendozil-heksozid</li><li>○ izoramnetin-3-rutinozid</li><li>○ kvercetin-pentozid</li><li>○ kvercetin-ramnozid</li><li>○ kampferol-ramnozid-heksozid</li><li>○ kampferol-pentozid</li></ul>

\*Preostali polifenoli koji su ishodišno detektirani u ECT bili su ispod limita detekcije.

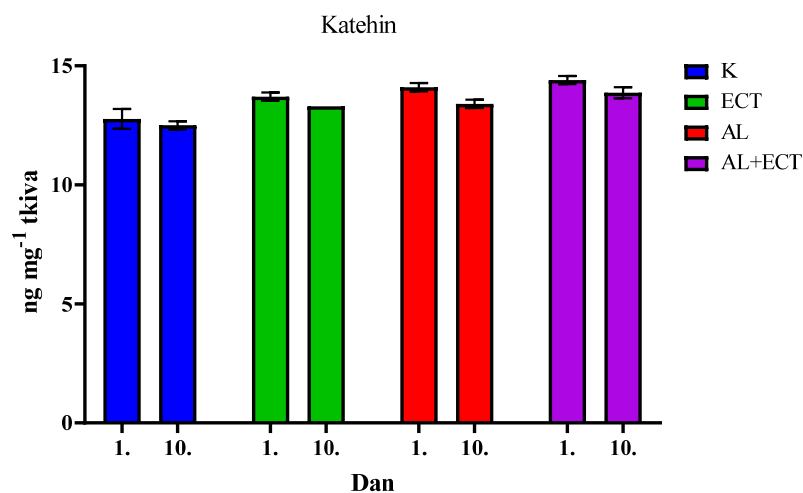
Na Slikama 12.-14. prikazani su polifenolni spojevi iz ECT koji su detektirani u tkivima jetre u C57BL/6 normoglikemijskog i hiperglikemijskog miša.

U tkivu jetre od fenolnih kiselina detektirane su 4-0-kafeoilkininska kiselina i 4-p-kumaroilkininska kiselina (Slika 12), od flavan-3-ola katehin (Slika 13), dok su od flavonola to kvercetin acetilheksozid, kamferol-3-rutinozid, kvercetin-3-rutinozid, kampferol pendozidheksozid, izoramnetin-3-rutinozid, kvercetin pentozid, kvercetin ramnozid, kampferol ramnozilheksozid te kampferol pentozid (Slika 14). Preostali polifenoli koji su ishodišno detektirani u ECT bili su ispod limita detekcije.

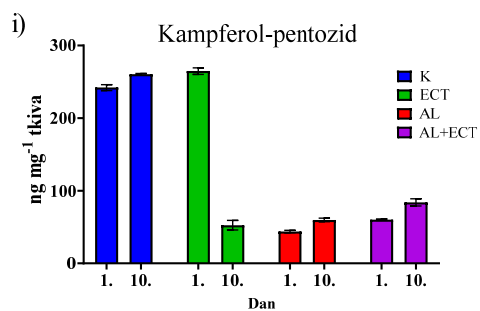
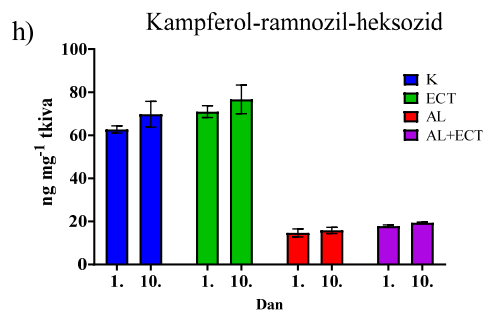
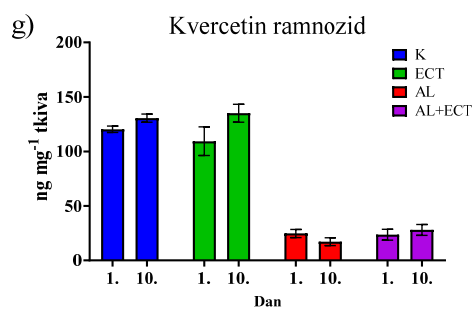
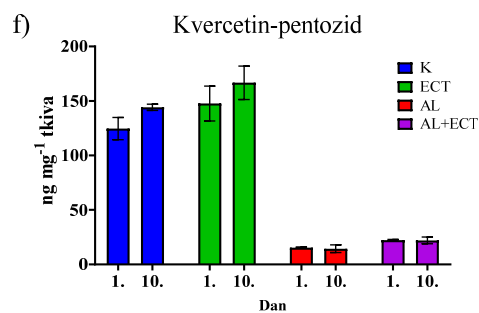
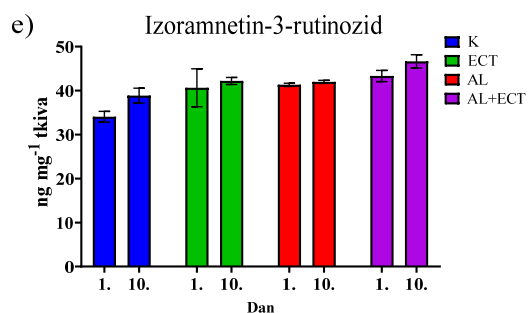
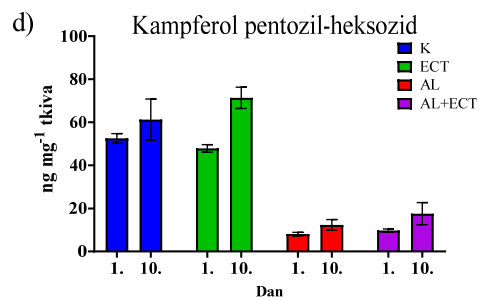
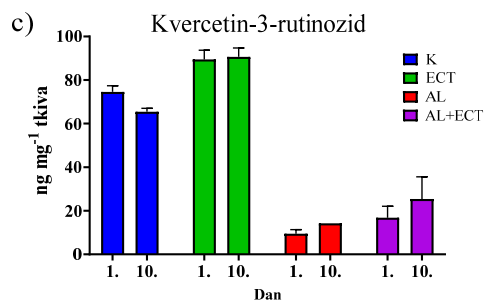
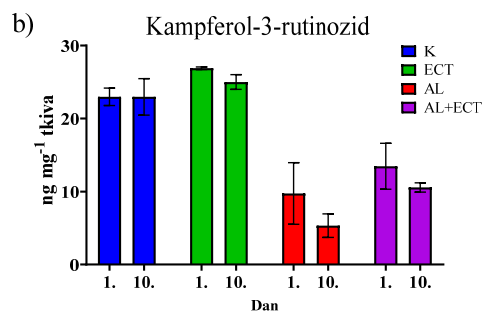
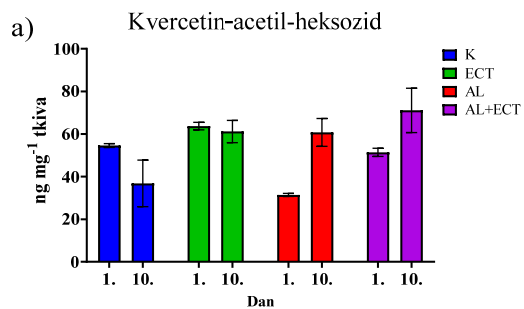


**Slika 12.** Fenolne kiseline u uzorcima tkiva jetre C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 24 sata i nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ± standardna devijacija. Fenolne kiseline u tkivu jetre slika a) 4-0-kafeoil kininska kiselina b) 4-p-kumaroil kininska kiselina





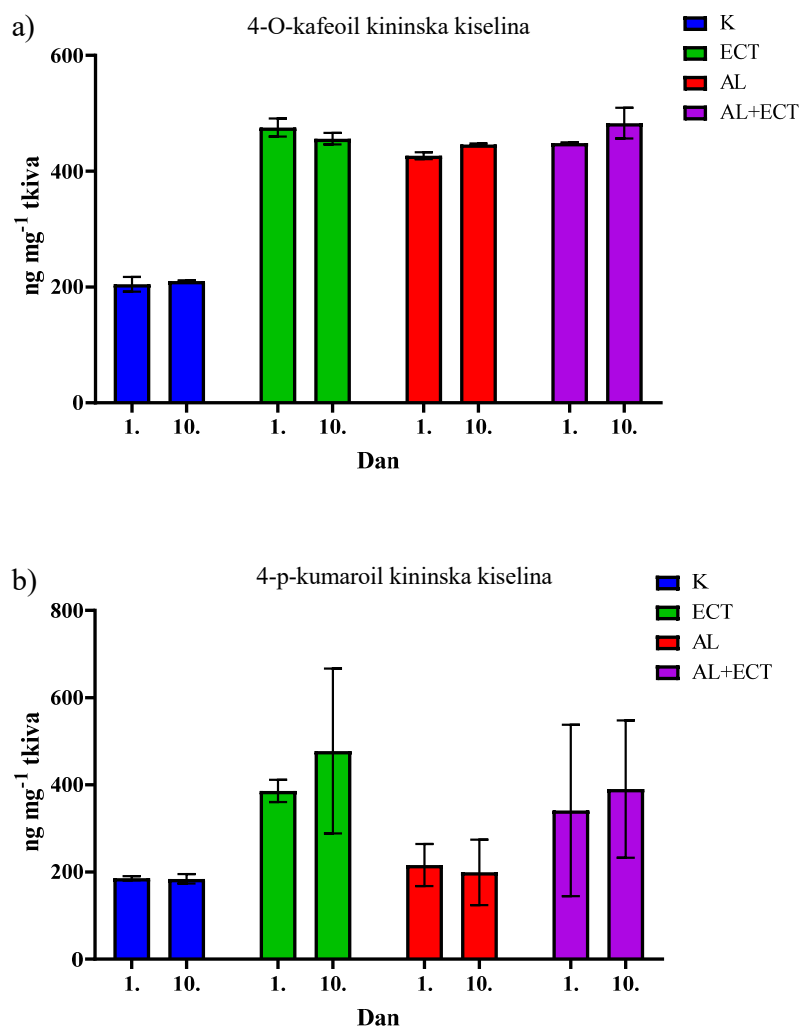
**Slika 13.** Flavan-3-oli u uzorcima tkiva jetre C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 24 sata i nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ± standardna devijacija. Flavan-3-oli jetra: katehin



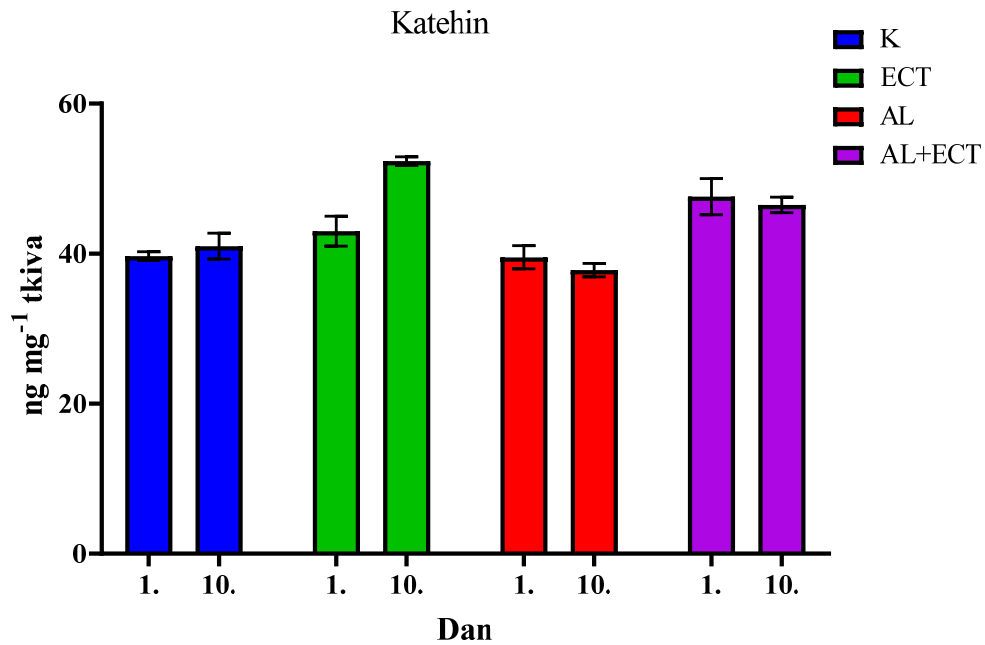
**Slika 14.** Flavonoli u uzorcima tkiva jetre C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 24 sata i nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase  $\text{dan}^{-1}$ . Broj životinja po skupini ( $n=16$ , 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat diz( $150 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL+ECT ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Flavonoli u tkivu jetre a) kvercetin-acetil-heksozid b) kamferol-3-rutinozid c) kvercetin-3-rutinozid d) kampferol-pendozil-heksozid e) izoramnetin-3-rutinozid f) kvercetin-pentozid g) kvercetin-ramnozid h) kamferol-ramnozil-heksozid i) kampferol-pentozid

Na Slikama 15.-17. prikazani su polifenolni spojevi iz ECT koji su detektirani u tkivima bubrega u C57BL/6 normoglikemijskog i hiperglikemijskog miša.

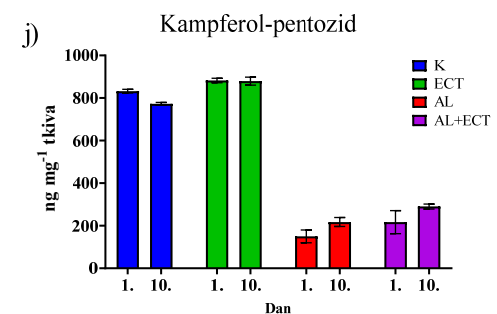
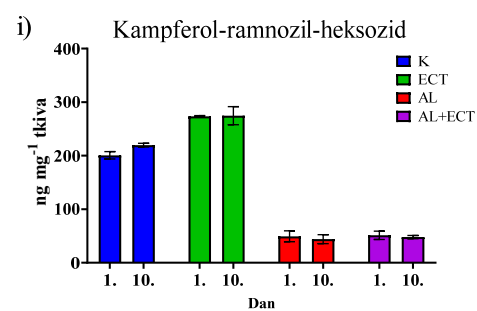
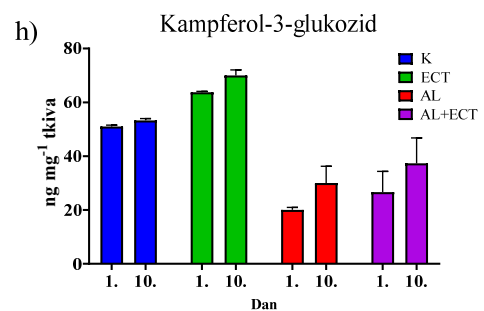
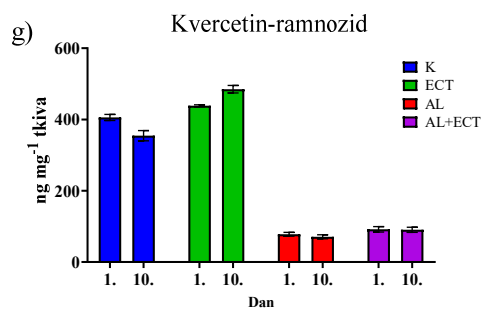
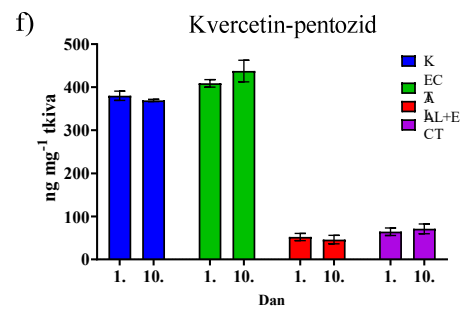
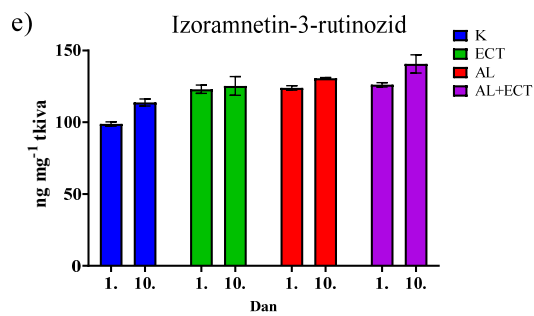
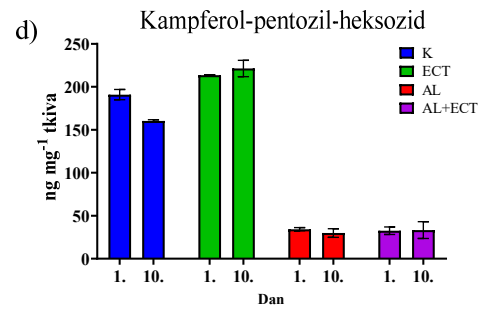
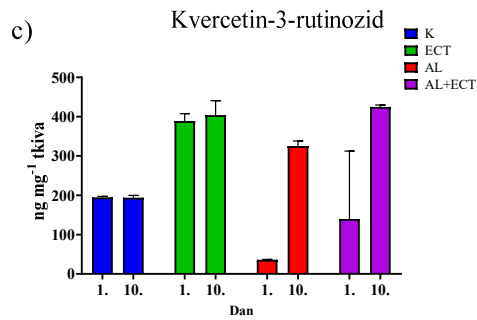
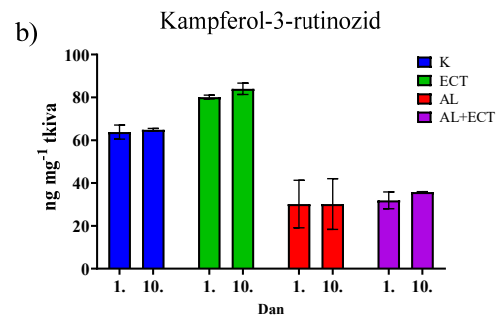
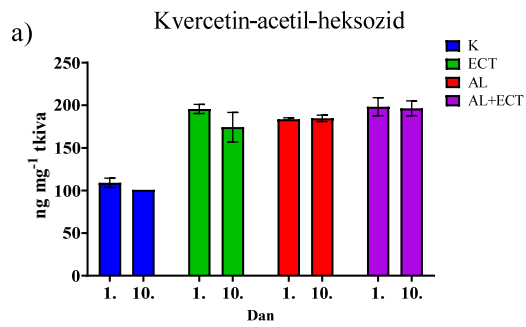
U tkivu bubrega od fenolnih kiselina detektirane su 4-0-kafeikininska kiselina i 4-p-kumaroilkininska kiselina (Slika 15), od flavan-3-ola katehin (Slika 16), dok su od flavonola to kvercetin acetilheksozid, kamferol-3-rutinozid, kvercetin-3-rutinozid, kampferol pendozilheksozid, izoramnetin-3-rutinozid, kvercetin pentozid, kvercetin ramnozid, kampferol-3-glukozid, kampferol ramnozilheksozid te kampferol pentozid (Slika 17). Preostali polifenoli koji su ishodišno detektirani u ECT bili su ispod limita detekcije.



**Slika 15.** Fenolne kiseline u uzorcima tkiva bubrega C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 24 sata i nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase  $\text{dan}^{-1}$ . Broj životinja po skupini ( $n=16$ , 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL+ECT ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Fenolne kiseline u tkivu bubrega a) 4-0-kafeoil kinska kiselina b) 4-p-kumaroil kininska kiselina.



**Slika 16.** Flavan-3-oli u uzorcima tkiva bubrega C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 24 sata i nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ± standardna devijacija. Flavan-3-oli u tkivu bubrega: katehin

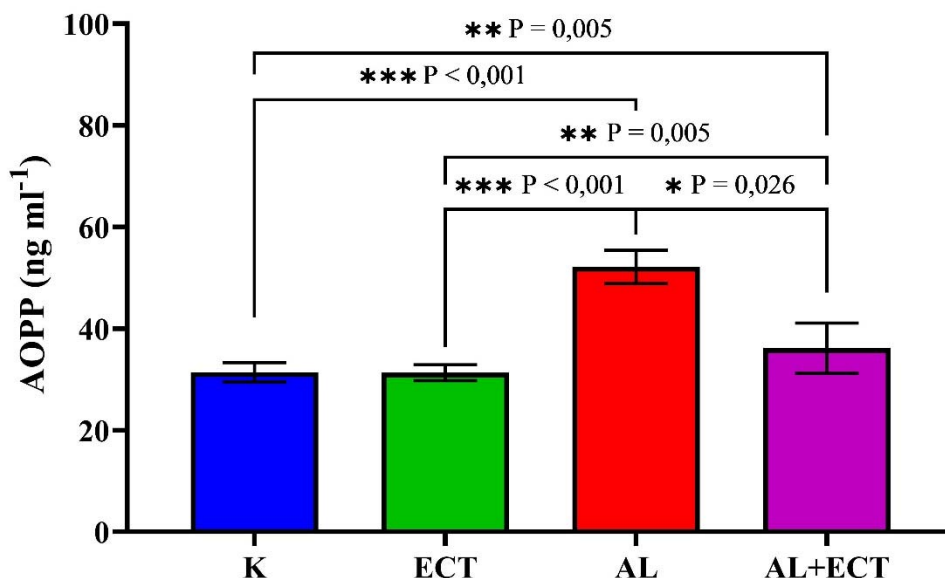


**Slika 17.** Flavonoli u uzorcima tkiva bubrega C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 24 sata i nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ± standardna devijacija. Flavonoli u tkivu bubrega a) kvercetin-acetil-heksozid b) kamferol-3-rutinozid c) kvercetin-3-rutinozid d) kampferol-pendozil-heksozid e) izoramnetin-3-rutinozid f) kvercetin-pentozid g) kvercetin-ramnozid h) kamferol-3-glukozid i) kampferol-ramnozil-heksozid j) kampferol-pentozid

## **4.2. REDOKS STATUS (PROOKSIDATIVNO/ANTIOKSIDATIVNO DJELOVANJE) TKIVA NAKON KONZUMACIJE EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE U NORMALNOM METABOLIZMU I HIPERGLIKEMIJI (ALOKSANSKI MODEL)**

### **4.2.1. Produkti oksidacijskih proteina (AOPP) u tkivima jetre i bubrega**

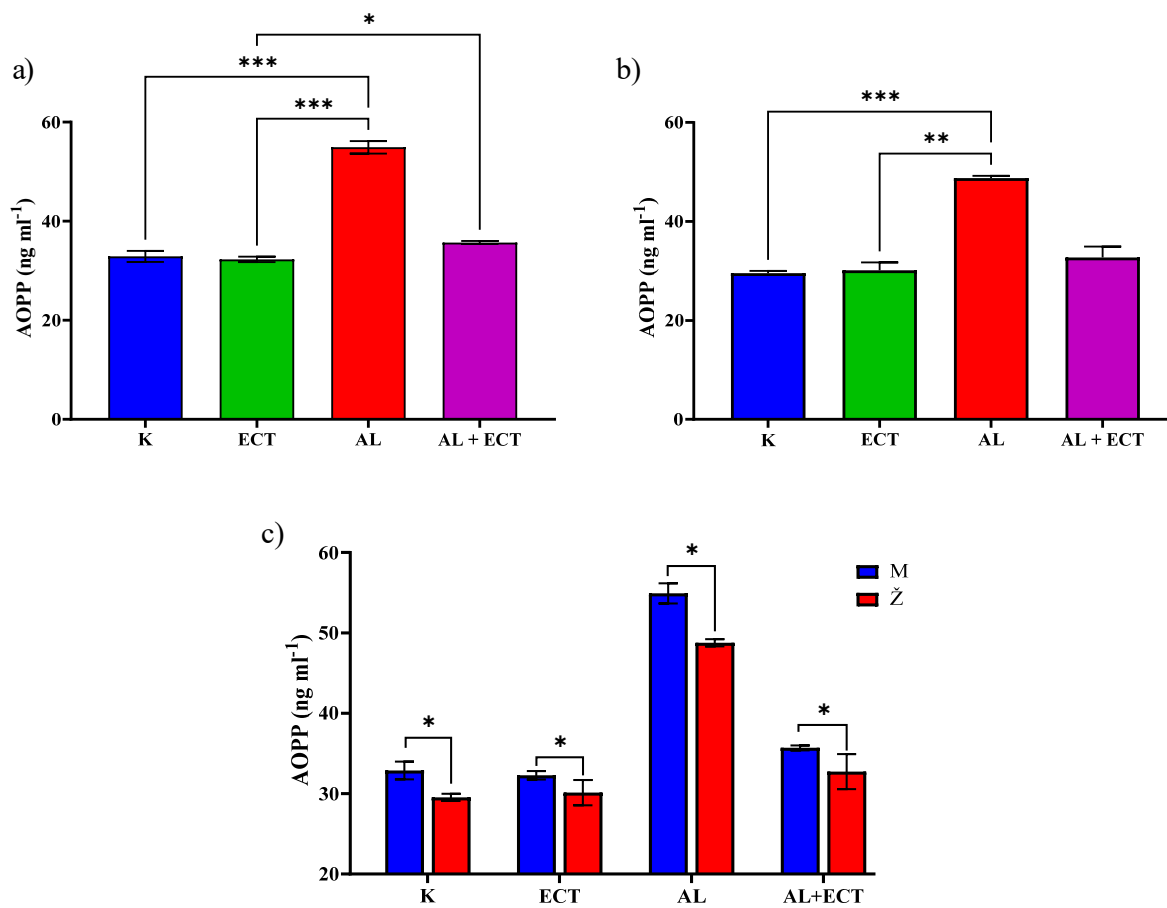
Slika 18 prikazuje mjerene razine AOPP u homogenatu tkiva jetre u miša C57BL/6 nakon 10 dnevnog tretmana ekstraktom cvijeta trnine u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Utvrđena je statistički značajna razlika između aloksanske (52,18±3,293 ng mL<sup>-1</sup>) i kontrolne skupine (31,40±1,909 ng mL<sup>-1</sup>;  $P<0,001$ ), te između aloksanske (52,18±3,293 ng mL<sup>-1</sup>) i aloksanske skupine koja je tretirana sa ECT (36,15±4,964 ng mL<sup>-1</sup>;  $P=0,026$ ), što ukazuje na činjenicu da su razine AOPP značajno niže u stanju hiperglikemije uz tretman ekstraktom cvijeta trnine, koji ima hipoglikemijska svojstva te također snižava razine AOPP. Statistički je značajna razlika između normoglikemijskih miševa koji su primili ECT (31,33±1,553 ng mL<sup>-1</sup>) i aloksanske skupine ( $P<0001$ ). Nema statistički značajne razlike između kontrolne i normoglikemijske skupine koja je primala ECT.



**Slika 18.** AOPP u uzorcima homogenata tkiva jetre C57BL/6 miša, tretiranih ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksans monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ± standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki. Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su P vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom P vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

Na slici 19 (a-c) prikazana je statistički značajna razlika između kontrolne i aloksanske skupine ( $P < 0,001$ ), između normoglikemijske grupe koja je uzimala ECT i aloksanske ( $P < 0,001$ ) te normoglikemijske koja je uzimala ECT i hiperglikemijske koja je uzimala ECT ( $P = 0,011$ ) u mužjaka, te je utvrđena statistički značajna razlika između kontrolne i aloksanske skupine ( $P < 0,001$ ) te između normoglikemijske grupe koja je uzimala ECT i aloksanske ( $P = 0,003$ ) u ženki. Statistički značajne razlike ( $P \leq 0,05$ ) između mužjaka i ženki utvrđene su unutar ispitivanih skupina, Slika 19. a-c.





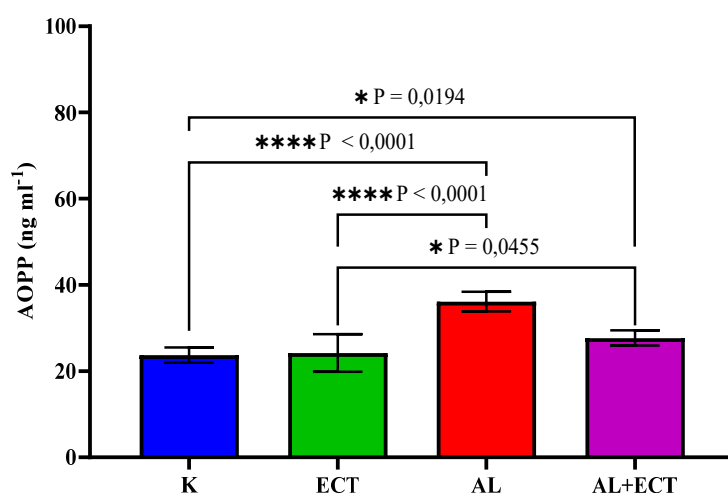
AOPP (ng mL <sup>-1</sup> )	K	ECT	AL	AL+ECT
Mušjaci	32,88±0,537	32,29±0,537	54,92±1,266	35,69±0,306
Ženke	29,54±0,447	30,13±1,584	48,76±0,444	36,73±2,178
<i>P</i>	<0,000001	0,00089	<0,000001	0,000714

**Slika 19. a-c** AOPP u uzorcima homogenata tkiva jetre C57BL/6 miša, tretiranih ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine, 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase, AL-aloksan 150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase, AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ±standardna devijacija. Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno statistički nisu značajno različite nose oznaku ns – nema statističke značajnosti. Rezultati su prikazani za a) mužjake b) ženke c) Rezultati su prikazani usporedno za mužjake i ženke.

Slika 20 prikazuje mjerene razine AOPP u homogenatu tkiva jetre u C57BL/6 miša nakon 10 dnevnog tretmana ekstraktom cvijeta trnine u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne (23,73±1,786 ng mL<sup>-1</sup>) i aloksanske skupine (36,12±2,296 ng mL<sup>-1</sup>,  $P < 0,0001$ ).

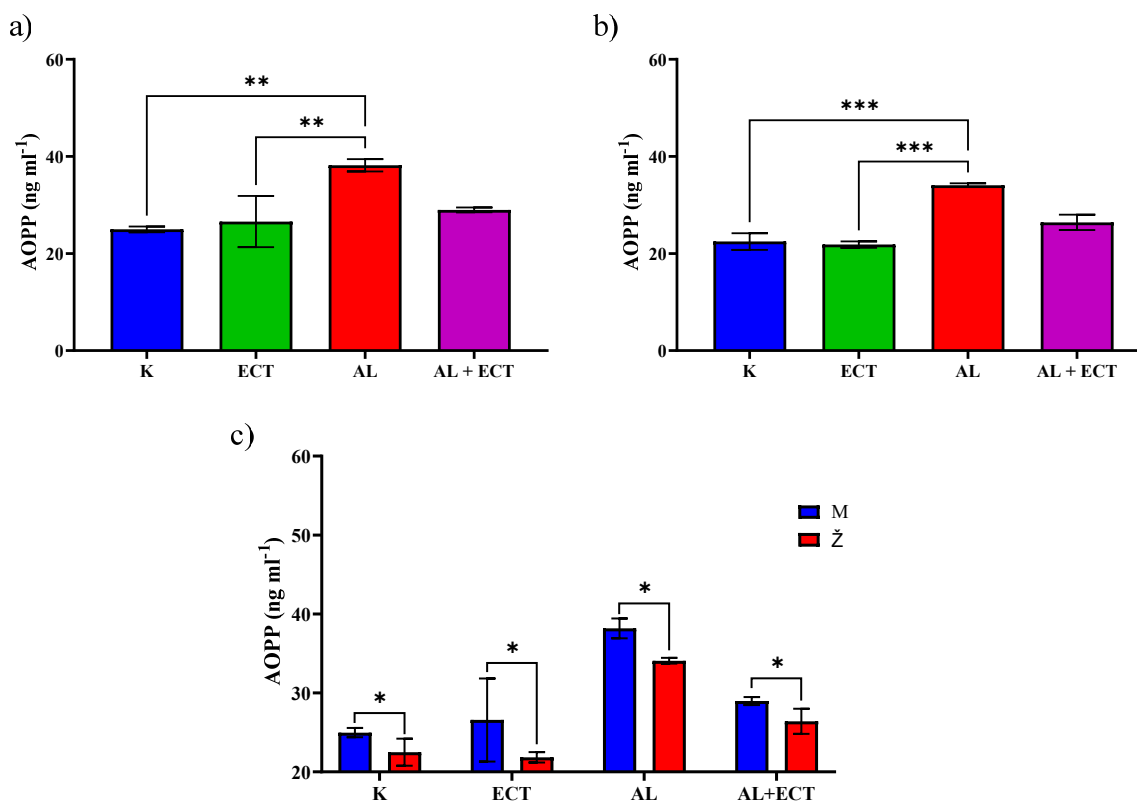
Utvrđena je i statistički značajna razlika između normoglikemijske skupine koja je primala ECT (27,69±1,752 ng mL<sup>-1</sup>) i AL, ( $P < 0,0001$ ), te između normoglikemijske grupe koja je primala ECT i hiperglikemijske grupe koja je primala ECT, ( $P = 0,0455$ ) te kontrolne i hiperglikemijske grupe koja je primala ECT, ( $P = 0,0194$ ).

Nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrolne skupine i normoglikemijske koja je primala ECT.



**Slika 20.** AOPP u uzorcima homogenata tkiva bubrega C57BL/6 miša, tretiranih ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ± standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki. Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su P vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom P vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

Na slici 21 utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne i aloksanske skupine ( $P=0,002$ ) te između normoglikemijske skupine koja je uzimala ECT i aloksanske ( $P=0,0084$ ) u mužjaka, te je utvrđena statistički značajna razlika između kontrolne i aloksanske ( $P=0,0006$ ) te između normoglikemijske skupine koja je uzimala ECT i aloksanske ( $P=0,0006$ ) u ženki. Unutar tretiranih skupina utvrđene su statistički značajne razlike ( $P\leq 0,05$ ) između spolova, Slika 21. a-c. Trend koji je primijećen kod oba spola, primijećen je i kod mužjaka i ženki zasebno i ne odstupa od ukupne populacije.



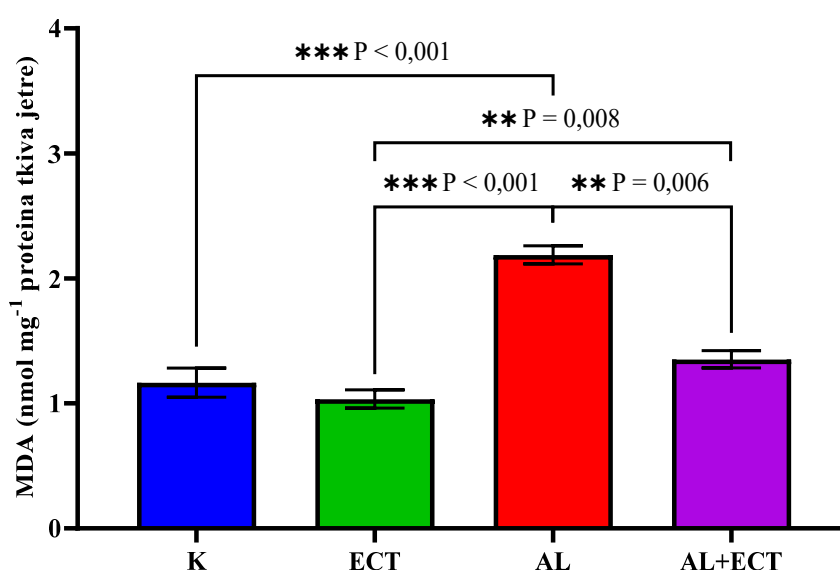
AOPP (ng mL <sup>-1</sup> )	K	ECT	AL	AL+ECT
Mušjaci	24,97±0,592	26,57±5,246	38,17±1,265	28,97±0,5110
Ženke	22,48±1,718	21,83±0,6625	34,08±0,3589	26,40±1,594
<i>P</i>	0,001693	0,02418	<0,000001	0,000676

**Slika 21. a-c** AOPP u uzorcima homogenata tkiva bubrega C57BL/6 miša, tretiranih ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT(25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P\leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno statistički nisu značajno različite nose oznaku ns – nema statističke značajnosti. Rezultati su prikazani za a) mužjake b) ženke c) Rezultati su prikazani usporedno za mužjake i ženke

#### 4.2.2. Lipidna peroksidacija - malondialdehid (MDA) u tkivu jetre i bubrega

Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne skupine (K) ( $1,166 \pm 0,1172$ ) i hiperglikemijske (AL) ( $2,188 \pm 0,07205$ ) ( $P < 0,001$ ), između normoglikemijske skupine koja je tretirana sa ECT (ECT) ( $1,035 \pm 0,07320$ ) i AL ( $P < 0,001$ ), između AL i hiperglikemijske (AL+ECT) ( $1,353 \pm 0,06930$ ) ( $P = 0,006$ ) te između ECT i AL+ECT ( $P = 0,008$ ) (Slika 22).

Najviše vrijednosti malondialdehida utvrđene su za hiperglikemijsku grupu, što je očekivano obzirom da stanje hiperglikemije dovodi do pojačane lipidne peroksidacije, a MDA su produkti lipidne peroksidacije. Tretman sa ECT u hiperglikemijskoj skupini dovodi do smanjenja MDA što ukazuje na pozitivan učinak polifenola iz ECT.

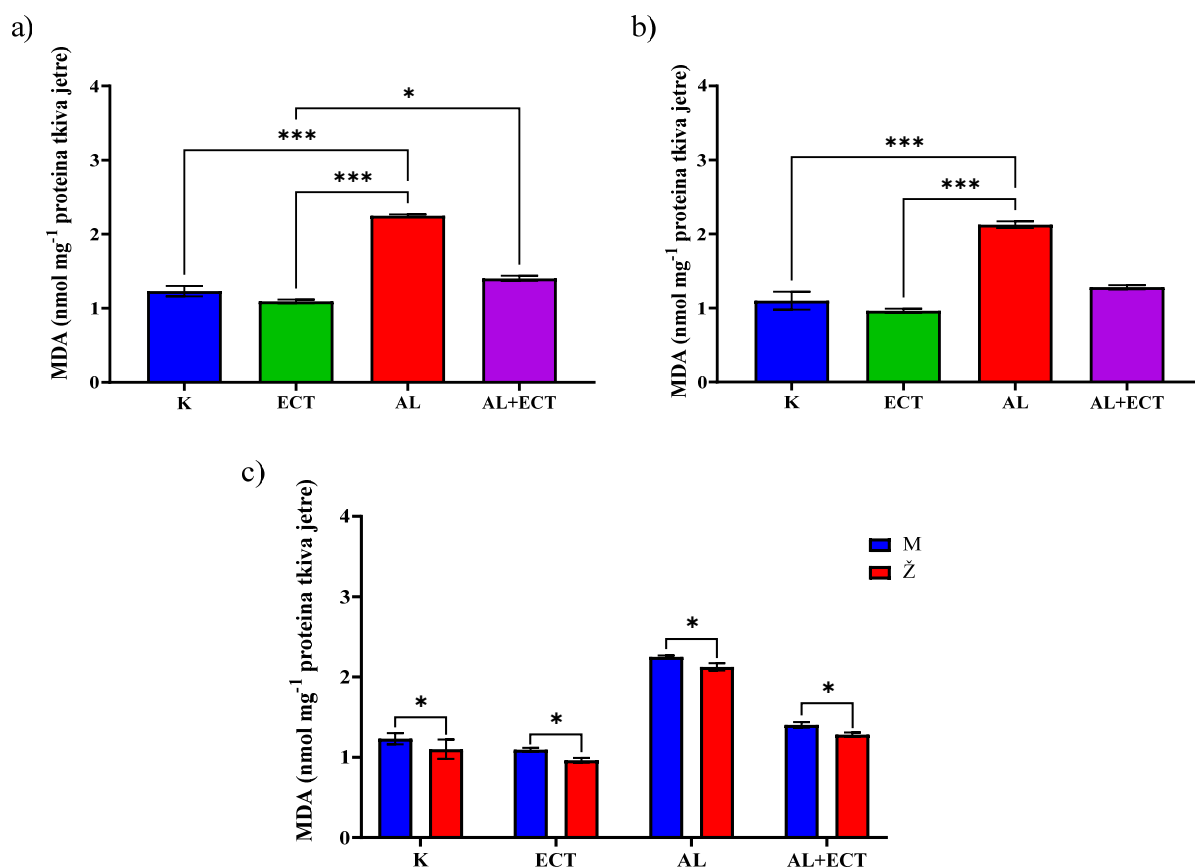


**Slika 22.** Koncentracija malondialdehida (MDA), pokazatelj razine lipidne peroksidacije, u uzorcima homogenata tkiva jetre C57BL/6 miša, tretiranih ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini ( $n=16$ , 8 ženki i 8 mužjaka).

K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL+ECT ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost  $\pm$  standardna devijacija.

Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki. Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su  $P$  vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom  $P$  vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

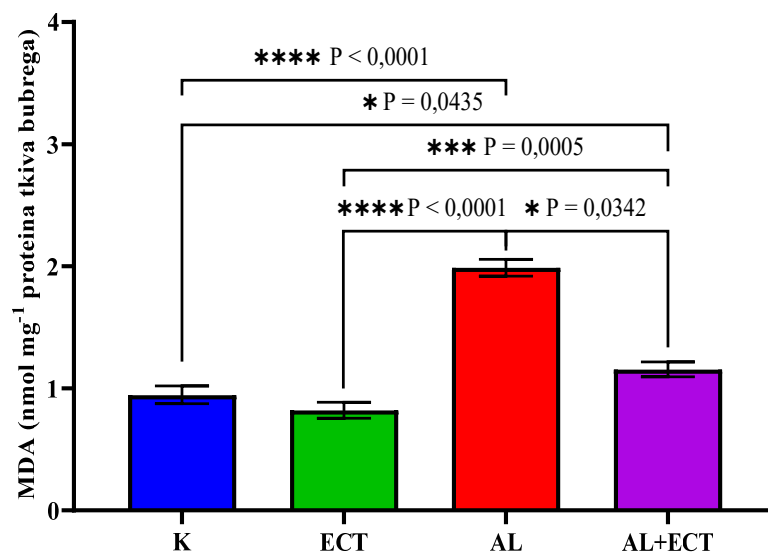
Na slici 23 utvrđena je statistički značajna razlika između K i AL ( $P < 0,001$ ), ECT i AL ( $P < 0,001$ ) te ECT i AL+ECT ( $P = 0,037$ ) u mužjaka te između K i AL ( $P < 0,001$ ) i ECT i AL ( $P < 0,001$ ) u ženki.



MDA Umg <sup>-1</sup> proteina	K	ECT	AL	AL+ECT
Mužjaci	1,231±0,070	1,093±0,024	2,251±0,017	1,403±0,035
Ženke	1,100±0,121	0,9622±0,029	2,126±0,045	1,281±0,028
<i>P</i>	0,019564	0,000169	<0,000001	0,000002

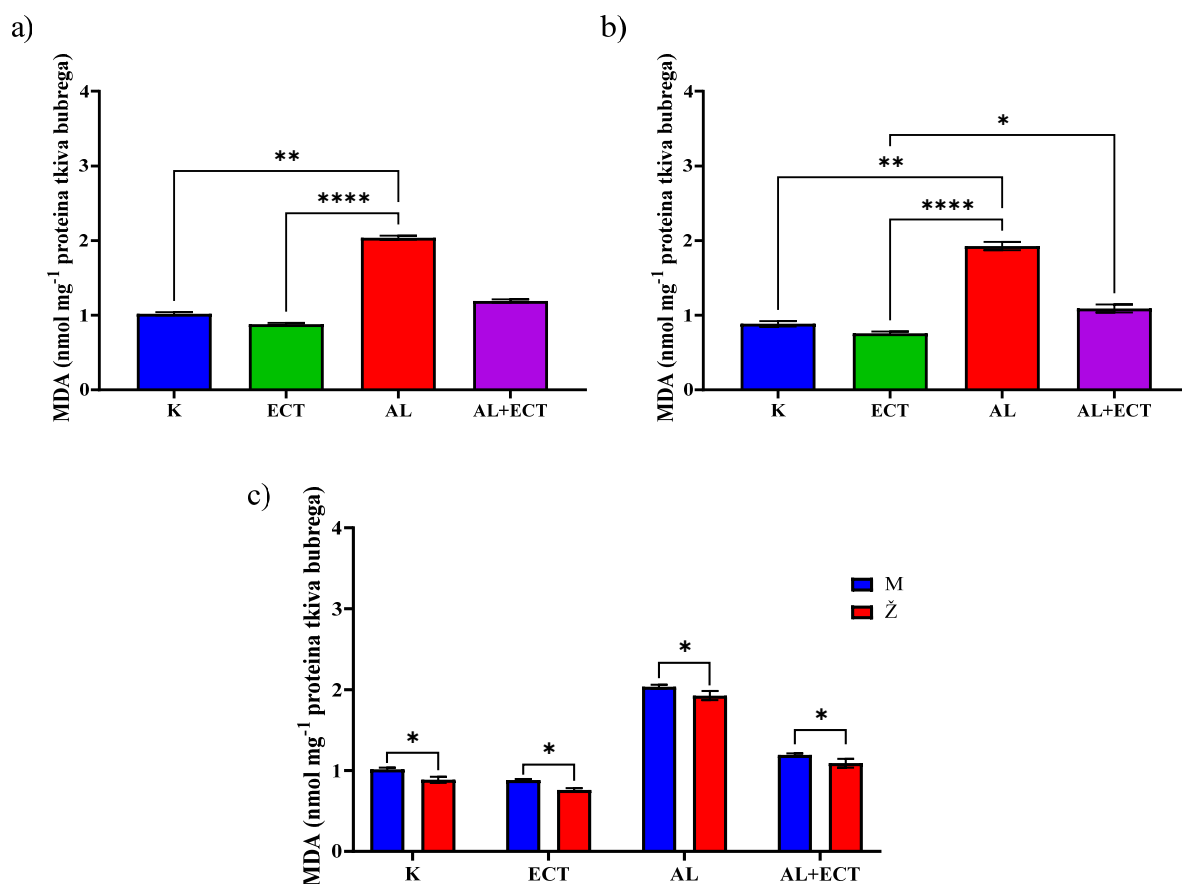
**Slika 23 a-c** Koncentracija malondialdehida (MDA), pokazatelj razine lipidne peroksidacije, u uzorcima homogenata tkiva jetre C57BL/6 miša, tretiranih ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine, 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase, AL-aloksan 150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase, AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ±standardna devijacija. Rezultati su prikazani za a) mužjake b) ženke c) Rezultati su prikazani usporedno za mužjake i ženke. Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-testa unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno statistički nisu značajno različite nose oznaku ns – nema statističke značajnosti.

Na slici 24 utvrđena je statistički značajna razlika između K (0,9464±0,07317) i AL (1,989±0,06163) ( $P < 0,0001$ ), između ECT (0,8203±0,06644) i AL ( $P < 0,0001$ ), između ECT i AL+ECT (1,155±0,06163) ( $P = 0,0005$ ), između AL i AL+ECT ( $P = 0,0342$ ).



**Slika 24.** Koncentracija malondialdehida (MDA), pokazatelj razine lipidne peroksidacije, u uzorcima homogenata tkiva bubrega C57BL/6 miša, tretiranih ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). . K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ±standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki. Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su *P* vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom *P* vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

Na slici 25 utvrđena je statistički značajna razlika između K i AL ( $P=0,0011$ ) te ECT i AL ( $P<0,0001$ ) u mužjaka te između K i AL ( $P=0,0039$ ), ECT i AL ( $P<0,0001$ ) i ECT i AL+ECT ( $P=0,0213$ ).

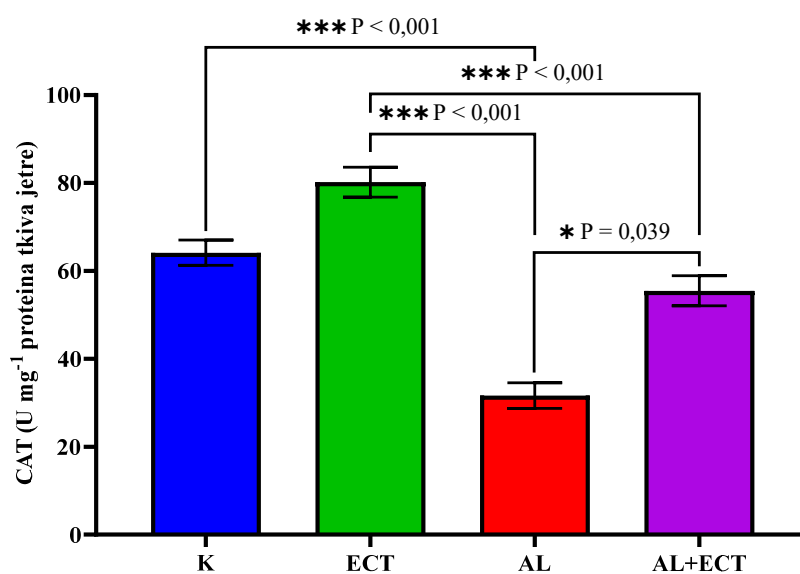


MDA Umg <sup>-1</sup> proteina	K	ECT	AL	AL+ECT
Mušjaci	1,020±0,020	0,8806±0,016	2,038±0,026	1,192±0,019
Ženke	0,8860±0,036	0,7596±0,023	1,927±0,055	1,091±0,053
<i>P</i>	0,000002	0,000008	0,000109	0,000061

**Slika 25. a-c** Koncentracija malondialdehida (MDA), pokazatelj razine lipidne peroksidacije, u uzorcima homogenata tkiva bubrega C57BL/6 miša, tretiranih ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine, 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase, AL-aloksan 150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase, AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ±standardna devijacija. Rezultati su prikazani za a) mužjake b) ženke. Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P\leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno statistički nisu značajno različite nose oznaku ns – nema statističke značajnosti.

### 4.2.3. Katalaza (CAT)

Slika 26 pokazuje mjerenje razine enzima katalaze (CAT) u homogenatu tkiva jetre C57BL/6 miša nakon 10 dnevnog tretmana ekstraktom cvijeta trnine u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>. Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne (65,15±2,882) i hiperglikemijske skupine (AL) (31,63±2,895) ( $P < 0,001$ ), između normoglikemijske skupine koja je primala ECT (80,22±3,420) i AL ( $P < 0,001$ ), između AL i hiperglikemijske skupine koja je primala ECT (AL+ECT) (55,46±3,417) ( $P = 0,039$ ), te između ECT i AL+ECT ( $P < 0,001$ ). Vidljivo je da je aktivnost enzima katalaze smanjena u hiperglikemijskoj grupi, u odnosu na sve druge skupine, što ukazuje na učinak hiperglikemije, odnosno stanja kronično povišene glukoze u krvi, na smanjenu aktivnost antioksidativnih enzima. Polifenoli iz ECT mogli bi imati učinak na povećanje aktivnosti enzima katalaze, što je vidljivo u AL+ECT skupinu u odnosu na AL. Općenito gledajući sve 4 skupine, normoglikemijska skupina koja je primala ECT ima najveću aktivnost CAT.

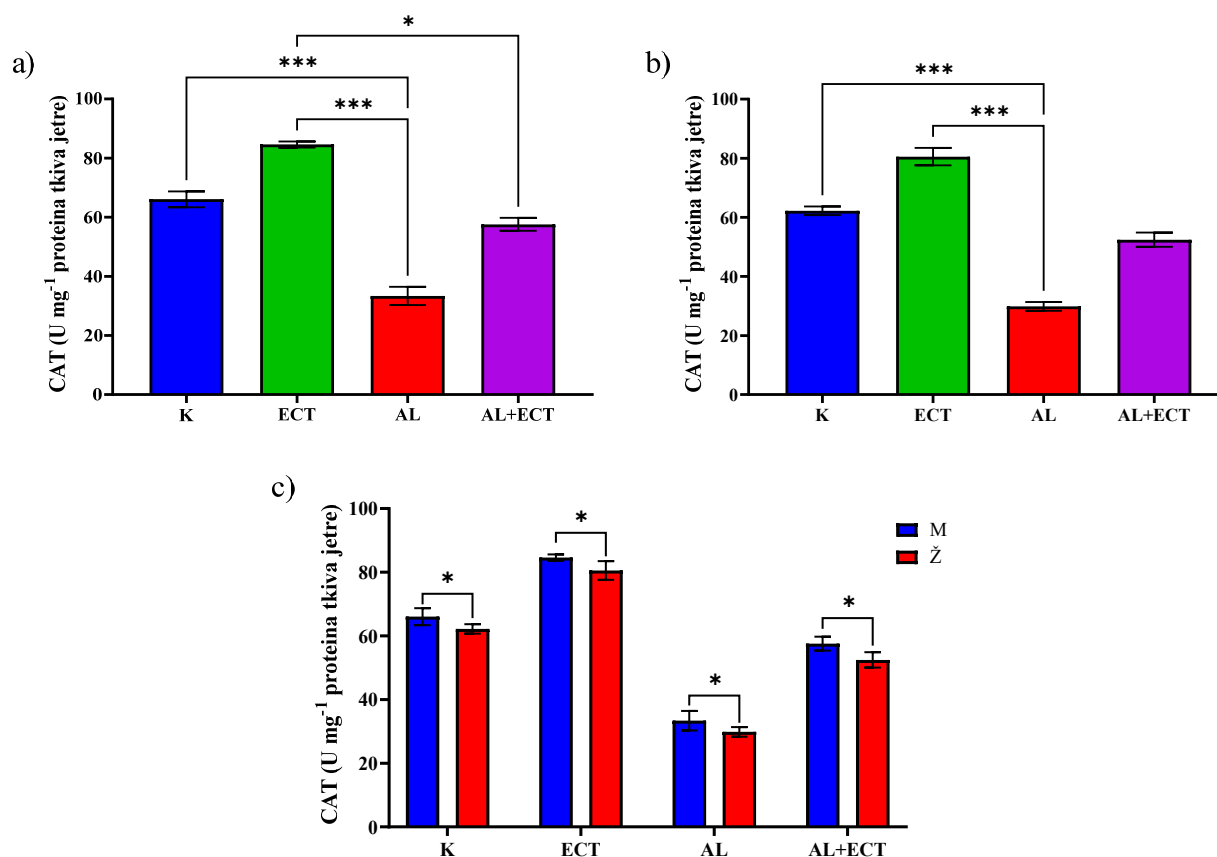


**Slika 26.** Katalaza (CAT) u uzorcima homogenata tkiva jetre C57BL/6 miša, tretiranih ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ±standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki.

Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su  $P$  vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom  $P$  vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.



Utvrđena je statistički značajna razlika između K i AL skupine ( $P<0,001$ ), između ECT i AL ( $P<0,001$ ) te između ECT i AL+ECT ( $P=0,021$ ) u mužjaka te između K i AL ( $P<0,001$ ) i ECT i AL ( $P<0,001$ ) u ženki. Trend koji je primijećen kod oba spola, primijećen je i kod mužjaka i ženki zasebno i ne odstupa od ukupne populacije (Slika 27 a-c).



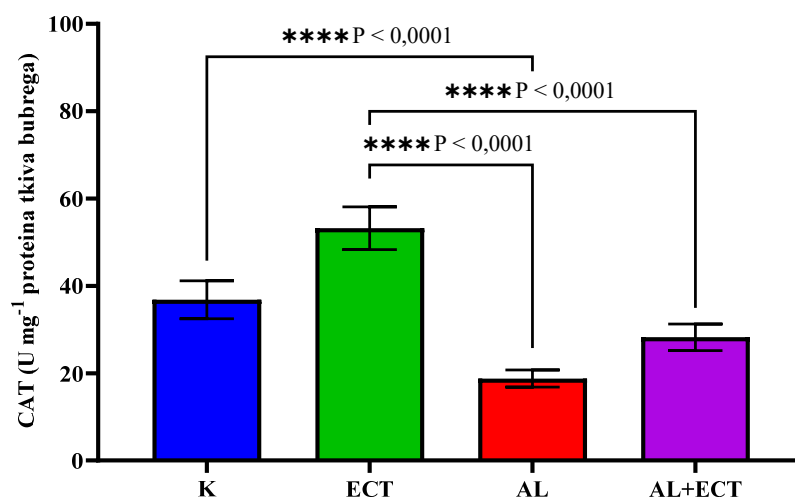
CAT U $\text{mg}^{-1}$ proteina	K	ECT	AL	AL+ECT
Mušjaci	66,07 $\pm$ 2,687	84,60 $\pm$ 1,015	33,39 $\pm$ 3,070	57,58 $\pm$ 2,192
Ženke	62,23 $\pm$ 1,473	80,57 $\pm$ 2,929	29,87 $\pm$ 1,511	52,44 $\pm$ 2,406
<i>P</i>	0,003142	0,022338	0,004357	0,000364

**Slika 27. a-c** Katalaza (CAT) u uzorcima homogenata tkiva jetre C57BL/6 miša, tretiranih ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine, 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase, AL-aloksan 150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase, AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost  $\pm$ standardna devijacija. Rezultati su prikazani za a) mužjake b) ženke c) rezultati su prikazani usporedno za mužjake i ženke Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P\leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno statistički nisu značajno različite nose oznaku ns – nema statističke značajnosti.

Slika 28 pokazuje mjerenje razine enzima katalaze (CAT) u homogenatu tkiva bubrega C57BL/6 miša nakon 10 dnevnog tretmana ekstraktom cvijeta trnine dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>.

Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne (K) (36,81±4,352) i aloksanske (AL) skupine (18,76±1,938) ( $P < 0,001$ ), između normoglikemijske koja je primala ECT (ECT) (53,21±4,905) i AL ( $P < 0,001$ ), između AL i hiperglikemijske skupine koja je primala ECT (AL+ECT) (28,23±3,048) ( $P = 0,039$ ) te između ECT i AL+ETC ( $P < 0,001$ ).

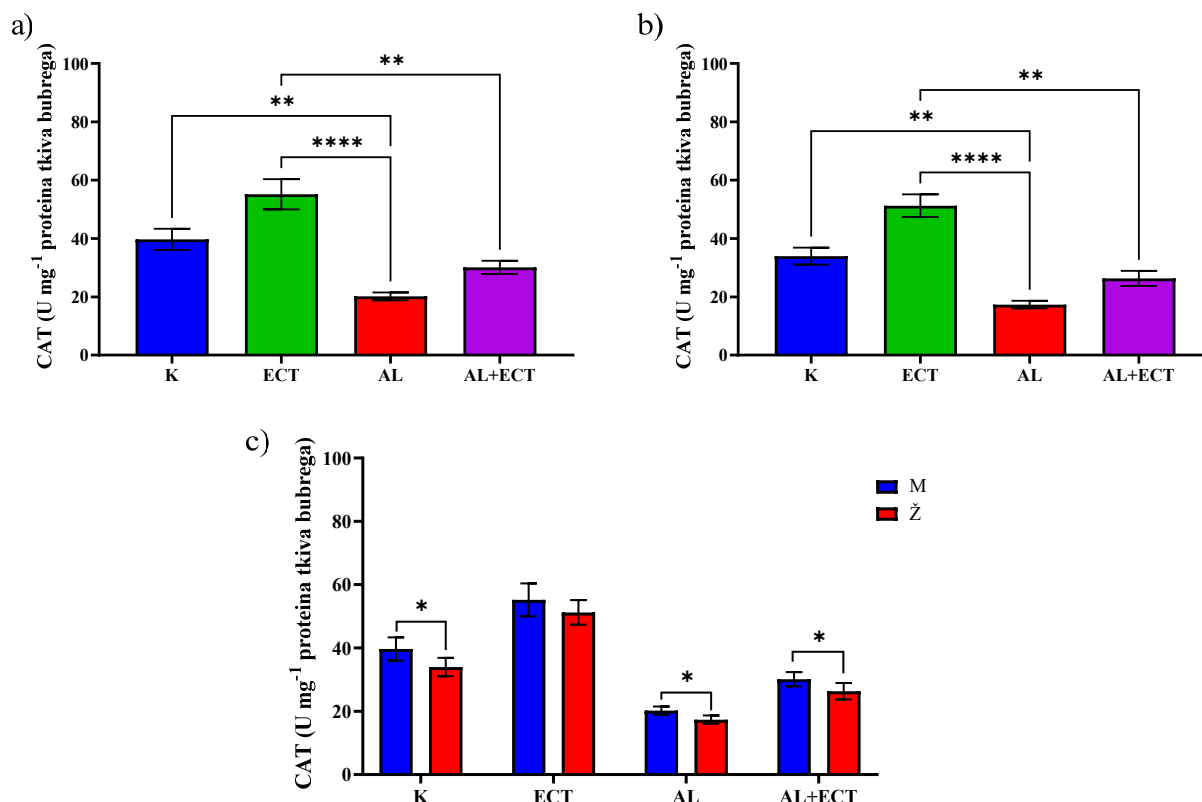
Primijećeno je kao i u jetre, da je aktivnost enzima katalaze smanjena u hiperglikemijskoj grupi, u odnosu na sve druge skupine, što ukazuje na učinak hiperglikemije, odnosno stanja kronično povišene glukoze u krvi, na smanjenu aktivnost antioksidativnih enzima. Međutim u usporedbi sa jetrom, vrijednosti u svim skupinama su niže.



**Slika 28.** Katalaza (CAT) u uzorcima homogenata tkiva bubrega C57BL/6 miša, tretiranih ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ± standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki. Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su P vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom P vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

Primijećena je statistički značajna razlika između K i AL ( $P=0,0060$ ), ECT i AL ( $P<0,001$ ), ECT i AL+ECT ( $P=0,0060$ ) kod mužjaka, te između K i AL ( $P=0,0032$ ), ECT i AL ( $P<0,0001$ ), ECT i AL+ECT ( $P=0,0032$ ) za ženke.

Trend koji je primijećen kod oba spola, primijećen je i kod mužjaka i ženki zasebno i ne odstupa od ukupne populacije (Slika 29).



CAT U $mg^{-1}$ proteina	K	ECT	AL	AL+ECT
Mušjaci	39,66±3,660	55,18±5,196	20,18±1,345	30,11±2,244
Ženke	33,96±2,925	51,24±3,895	17,35±1,292	26,35±2,594
<i>P</i>	0,001183	ns	0,000144	0,002769

**Slika 29. a-c** Katalaza (CAT) u uzorcima homogenata tkiva bubrega C57BL/6 miša, tretiranih ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine, 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase, AL-aloksan 150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase, AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija. Rezultati su prikazani za a) mužjake b) ženke c) rezultati su prikazani usporedno za mužjake i ženke. Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P\leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno statistički nisu značajno različite nose oznaku ns – nema statističke značajnosti.

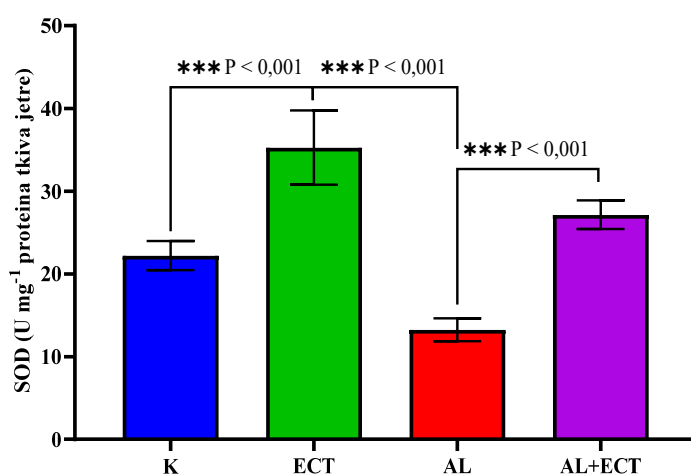
#### 4.2.4. Superoksid dismutaza (SOD)

Slika 30 pokazuje mjerenje razine enzima superoksid dismutaze (SOD) u homogenatu tkiva jetre C57BL/6 miša nakon 10 dnevnog tretmana ekstraktom cvijeta trnine u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>.

Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne skupine (K) (22,21±1,762) i normoglikemijske koja je tretirana sa ECT (ECT) 35,28±4,481) ( $P < 0,001$ ), između ECT i hiperglikemijske (AL) (13,26±1,373) ( $P < 0,001$ ) te između AL i hiperglikemijske skupine koja je tretirana sa ECT (AL+ECT) (27,15±1,736) ( $P < 0,001$ ).

Vidljivo je da je aktivnost enzima SOD smanjena u hiperglikemijskoj grupi, u odnosu na sve druge skupine, što ukazuje na učinak hiperglikemije, odnosno stanja kronično povišene glukoze u krvi, na smanjenu aktivnost antioksidativnih enzima.

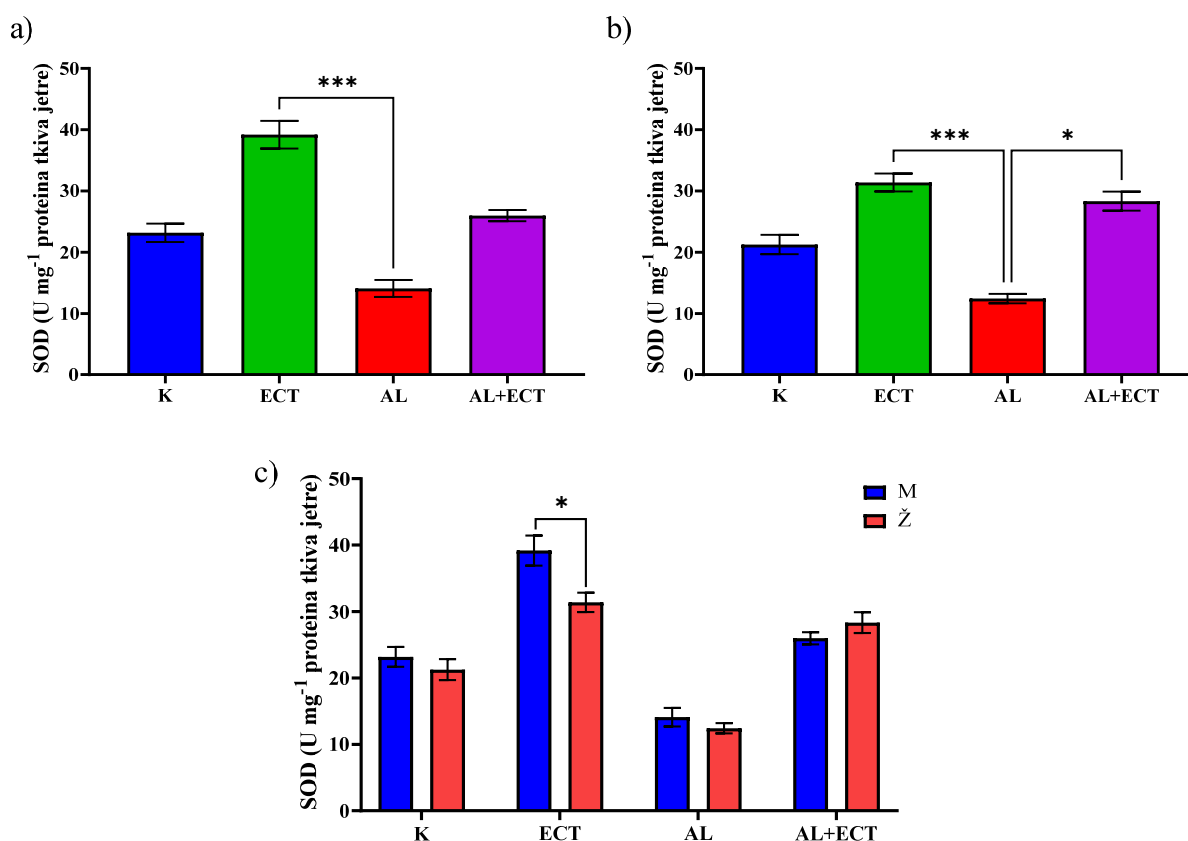
Polifenoli iz ECT mogli bi imati učinak na povećanje aktivnosti enzima SOD, što je vidljivo u ECT skupini, u odnosu na K, kao i u AL+ECT skupinu u odnosu na AL. Općenito gledajući u sve 4 skupine, normoglikemijska skupina koja je primala ECT ima najveću aktivnost SOD.



**Slika 30.** Superoksid dismutaza (SOD) u uzorcima homogenata tkiva jetre C57BL/6 miša, tretiranih ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ±standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki. Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su  $P$  vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom  $P$  vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

Utvrđena je statistički značajna razlika između normoglikemijske skupine koja je tretirana sa ECT (ECT) ( $39,18 \pm 2,257$ ) i hiperglikemijske (AL) ( $14,08 \pm 1,394$ ) ( $P < 0,001$ ) u mužjaka te između ECT ( $31,38 \pm 1,451$ ) i AL ( $12,43 \pm 0,7659$ ) ( $P < 0,001$ ) i AL i hiperglikemijske skupine koja je tretirana sa ECT ( $28,33 \pm 2,563$ ) ( $P = 0,038$ ) u ženki.

Trend koji je primijećen kod oba spola, primijećen je i kod mužjaka i ženki zasebno i ne odstupa od ukupne populacije (Slika 31 a-c).



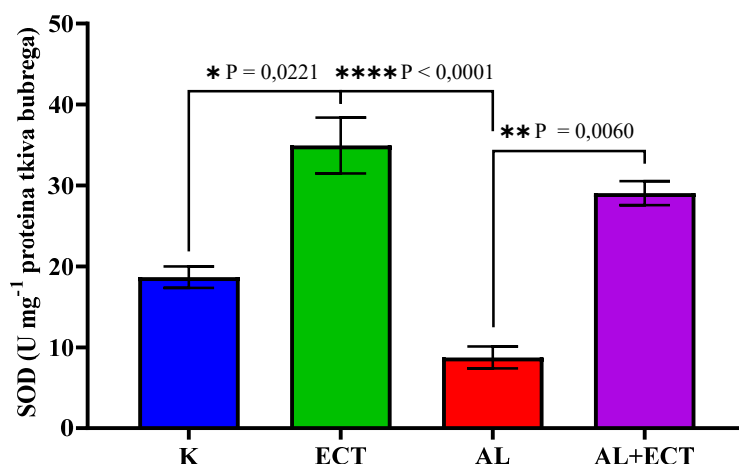
SOD U mg <sup>-1</sup> proteina	K	ECT	AL	AL+ECT
Mušjaci	23,16±1,503	39,18±2,257	14,08±1,394	25,97±0,9157
Ženke	21,25±1,566	31,38±1,451	12,43±0,7659	28,33±1,563
P	ns	0,000189	ns	ns

**Slika 31. a-c** SOD u uzorcima homogenata tkiva jetre C57BL/6 miša, tretiranih ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine, 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase, AL-aloksan 150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase, AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ± standardna devijacija. Rezultati su prikazani za a) mužjake b) ženke c) rezultati su prikazani usporedno za mužjake i ženke. Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke

značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno statistički nisu značajno različite nose oznaku ns – nema statističke značajnosti.

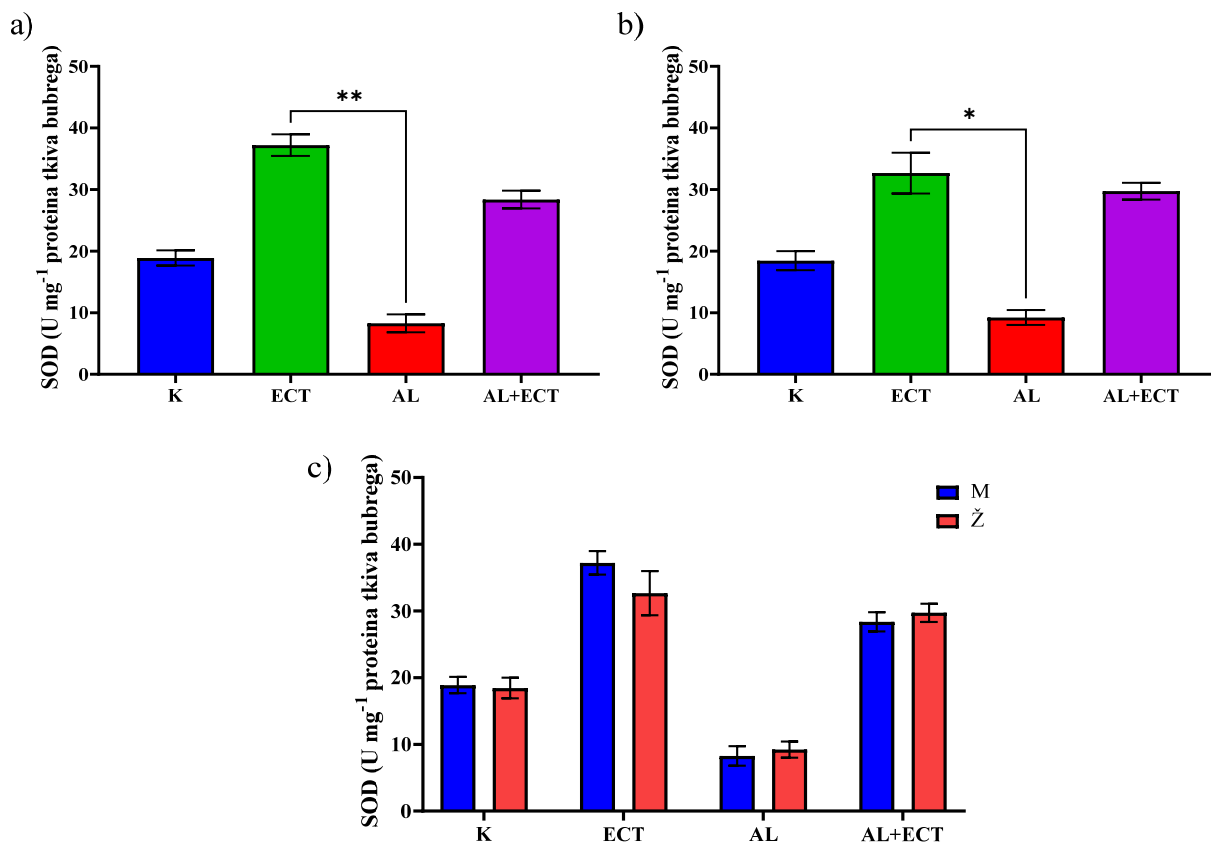
Slika 32 pokazuje mjerenje razine enzima superoksid dismutaze (SOD) u homogenatu tkiva bubrega C57BL/6 miša nakon 10 dnevnog tretmana ekstraktom cvijeta trnine u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>.

Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne (K) (18,67±1,316) i normoglikemijske skupine koja je tretirana sa ECT (ECT) (34,95±3.452) ( $P=0,0221$ ), između ECT i hiperglikemijske skupine (AL) (8,746±1,3649) ( $P<0,0001$ ) te između AL i hiperglikemijske skupine koja je tretirana sa ECT (ECT) (29,05±1,490) ( $P=0,0060$ ).



**Slika 32.** Superoksid dismutaza (SOD) u uzorcima homogenata tkiva bubrega C57BL/6 miša, tretiranih ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ±standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki. Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su  $P$  vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom  $P$  vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

Utvrđena je statistički značajna razlika između ECT ( $37,21 \pm 1,767$ ) i AL ( $8,226 \pm 1,460$ ) ( $P=0,0061$ ) u mužjaka te između ECT ( $32,68 \pm 3,308$ ) i AL ( $9,227 \pm 1,225$ ) ( $P=0,0155$ ) u ženki. Nema utvrđene statistički značajne razlike među spolovima (Slika 33 a-c).



SOD U mg <sup>-1</sup> proteina	K	ECT	AL	AL+ECT
Mušjaci	18,90±1,227	37,21±1,767	8,226±1,460	28,37±1,445
Ženke	18,44±1,549	32,68±3,308	9,227±1,225	29,73±1,367
<i>P</i>	ns	ns	ns	ns

**Slika 33. a-c** SOD u uzorcima homogenata tkiva bubrega C57BL/6 miša, tretiranih ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine, 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase, AL-aloksan 150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase, AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ± standardna devijacija. Rezultati su prikazani za a) mužjake b) ženke c) rezultati su prikazani usporedno za mužjake i ženke. Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno statistički nisu značajno različite nose oznaku ns – nema statističke značajnosti.

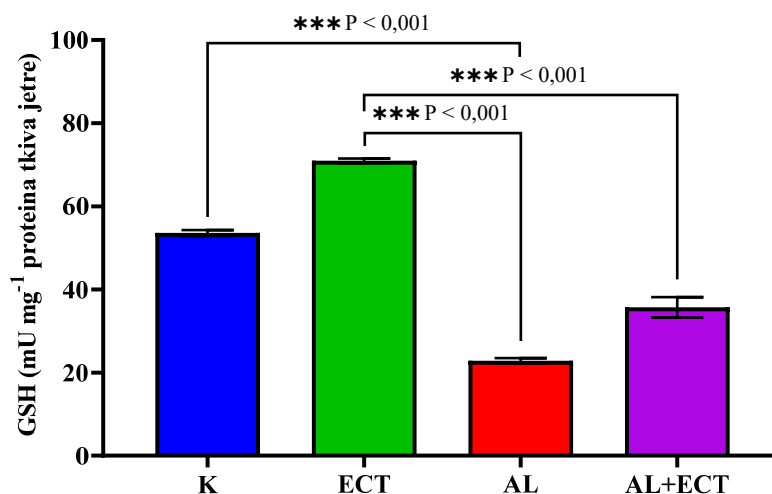
#### 4.2.5. Glutation (GSH)

Slika 34 pokazuje mjerenje razine enzima GSH u homogenatu tkiva jetre C57BL/6 miša nakon 10 dnevnog tretmana ekstraktom cvijeta trnine u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> dan<sup>-1</sup>.

Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne skupine (K) (53,59±0,7044) i hiperglikemijske (AL) (22,86±0,6258) ( $P < 0,001$ ), između normoglikemijske koja je tretirana sa ECT (ECT) (70,96±0,5247) i AL ( $P < 0,001$ ) te između AL i hiperglikemijske grupe koja je tretirana sa ECT (AL+ECT) (35,70±2,468) ( $P < 0,001$ ).

Vidljivo je da je aktivnost enzima GSH smanjena u hiperglikemijskoj grupi, u odnosu na sve druge skupine, što ukazuje na učinak hiperglikemije, odnosno stanja kronično povišene glukoze u krvi, na smanjenu aktivnost antioksidativnih enzima.

Polifenoli iz ECT mogli bi imati učinak na povećanje aktivnosti enzima GSH, što je vidljivo u ECT skupini, u odnosu na K, kao i u AL+ECT skupinu u odnosu na AL. Općenito gledajući u sve 4 skupine, normoglikemijska skupina koja je primala ECT ima najveću aktivnost GSH.

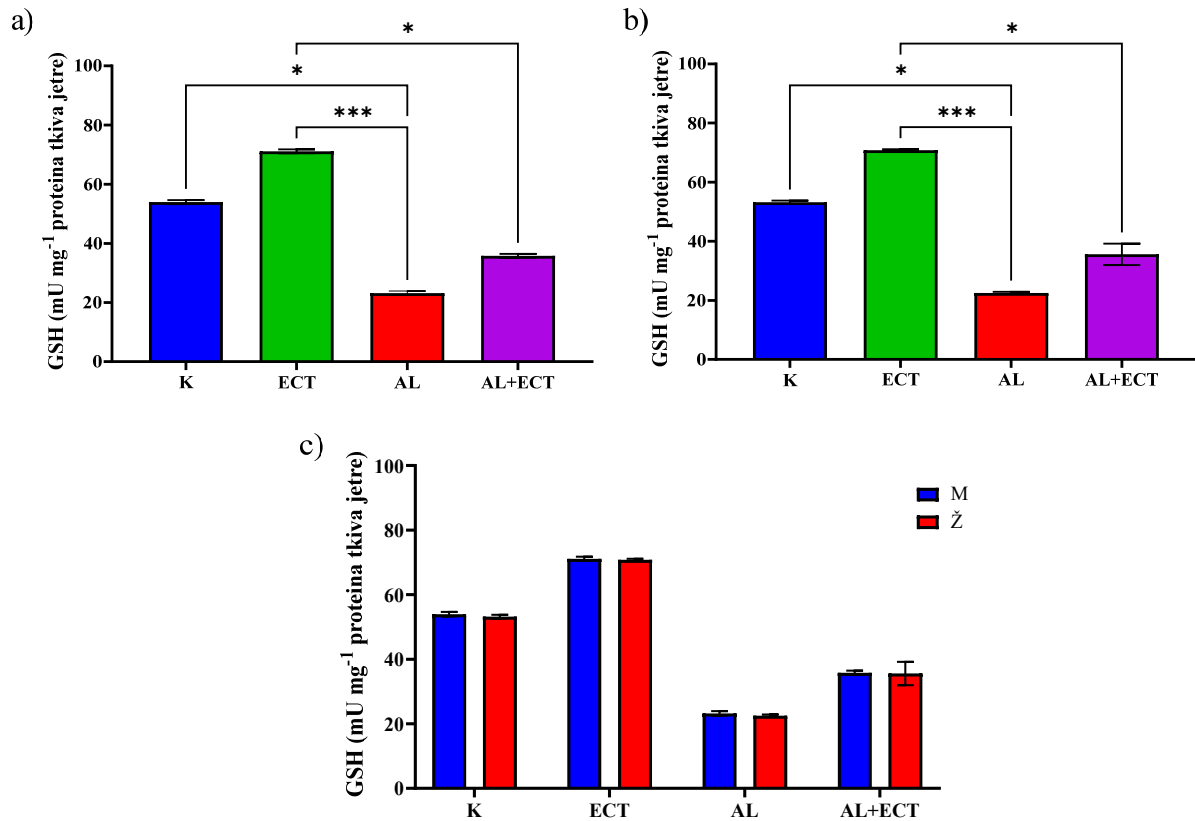


**Slika 34.** GSH u uzorcima homogenata tkiva jetre C57BL/6 miša, tretiranih ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ± standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki. Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su P vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno



nisu povezane linijama i pripadajućom P vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

Utvrđena je statistički značajna razlika između K i AL ( $P=0,045$ ), između ECT i AL ( $P<0,001$ ) te između ECT i AL+ECT ( $P=0,045$ ) kod mužjaka te između K i AL ( $P=0,045$ ), ECT i AL ( $P<0,001$ ) i ECT i AL+ECT ( $P=0,045$ ) (Slika 35 a-c).



GSH Umg <sup>-1</sup> proteina	K	ECT	AL	AL+ECT
Mušjaci	53,98±0,678	71,14±0,647	23,19±0,688	35,82±0,626
Ženke	52,20±0,531	70,78±0,349	22,53±0,364	35,58±3,643
<i>P</i>	ns	ns	ns	ns

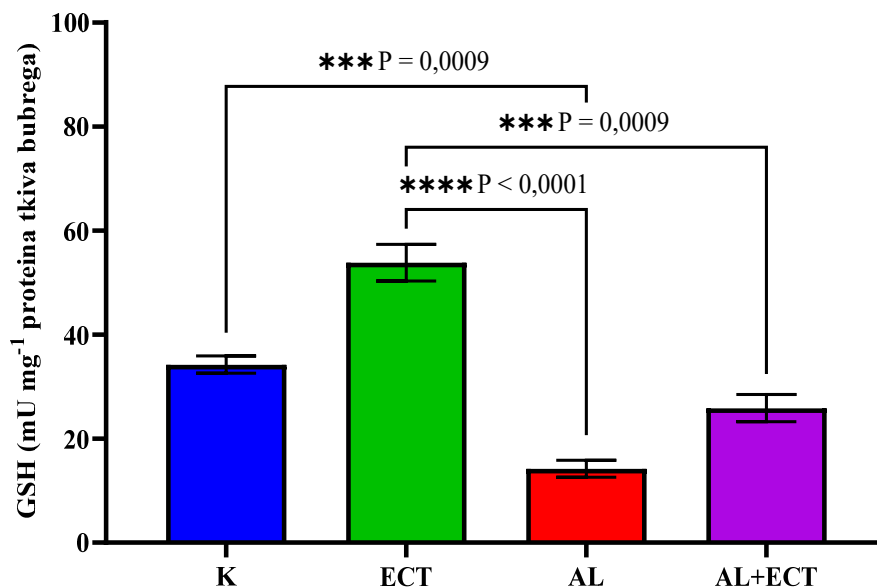
**Slika 35. a-c** GSH u uzorcima homogenata tkiva jetre C57BL/6 miša, tretiranih ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana.

Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine, 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase, AL-aloksan 150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase, AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase).

Stupci prikazuju srednju vrijednost ± standardna devijacija. Rezultati su prikazani za a) mužjake b) ženke c) rezultati su prikazani usporedno za mužjake i ženke.

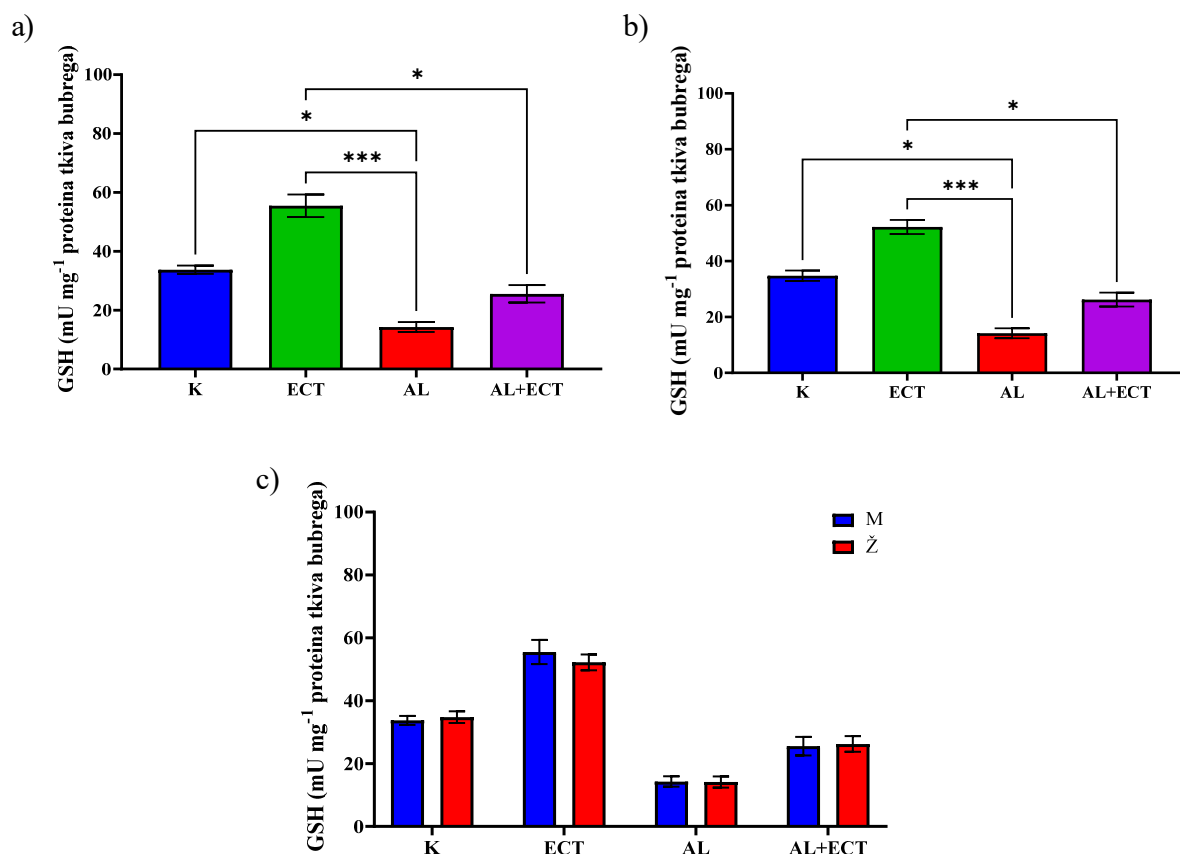
Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P\leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno statistički nisu značajno različite nose oznaku ns – nema statističke značajnosti.

Slika 36 pokazuje mjerenje razine enzima (GSH) u homogenatu tkiva bubrega C57BL/6 miša nakon 10 dnevnog tretmana ekstraktom cvijeta trine u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Utvrđena je statistički značajna razlika između K (34,25±1,669) i AL (14,21±1,638) ( $P=0,0009$ ), između ECT (53,84±3,529) i AL ( $P<0,0001$ ) te između ECT i AL+ECT (25,88±2,631) ( $P=0,0009$ ).



**Slika 36.** GSH u uzorcima homogenata tkiva bubrega C57BL/6 miša, tretiranih ekstraktom cvijeta trine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ± standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki. Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su P vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P\leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom P vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

Utvrđena je statistički značajna razlika između K i AL ( $P=0,0437$ ), ECT i AL(0,0003) te ECT i AL+ECT (0,0437) kod mužjaka te između K i AL ( $P=0,0437$ ), ECT i AL(0,0003) te ECT i AL+ECT (0,0437) kod ženki (Slika 37 a-c).



GSH Umg <sup>-1</sup> proteina	K	ECT	AL	AL+ECT
Mušjaci	33,75±1,435	55,48±3,826	14,28±1,664	25,54±2,956
Ženke	34,75±1,862	52,20±2,508	14,14±1,766	26,22±2,492
P	ns	ns	ns	ns

**Slika 37. a-c** GSH u uzorcima homogenata tkiva bubrega C57BL/6 miša, tretiranih ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana.

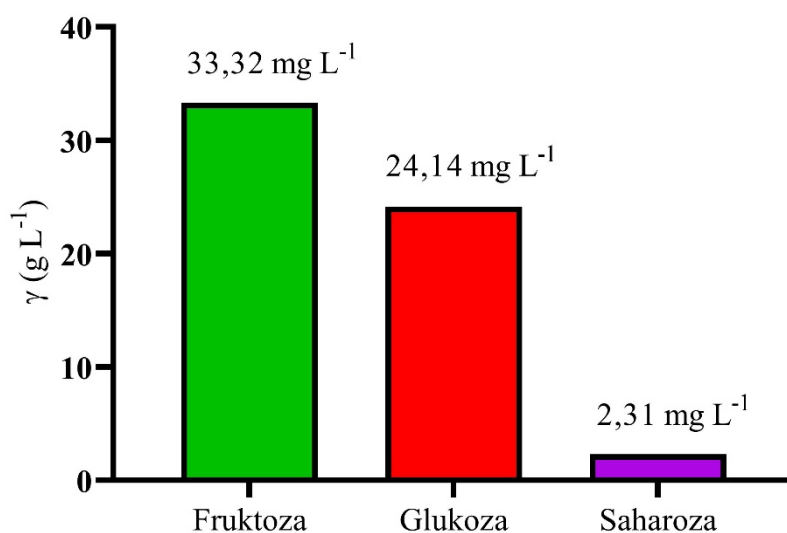
Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine, 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase, AL-aloksan 150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase, AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase).

Stupci prikazuju srednju vrijednost ± standardna devijacija. Rezultati su prikazani za a) mužjake b) ženke c) rezultati su prikazani usporedno za mužjake i ženke Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno statistički nisu značajno različite nemaju oznaku

### 4.3. GLIKEMIJA

#### 4.3.1. Sastav ugljikohidrata u ekstraktu cvijeta trnine (ECT)

Ekstrakt cvijeta trnine (ECT) sadrži značajnu količinu ugljikohidrata (Slika 38), ukupno 59,77 mg L<sup>-1</sup>. Analiza pojedinačnih ugljikohidrata u sastavu ekstrakta pokazala je da je dominantna fruktoza, 55,7% (33,32 mg L<sup>-1</sup>). Zatim slijedi glukoza sa 40,3% (24,314 mg L<sup>-1</sup>) te saharoza sa 3,8% (2,31 mg L<sup>-1</sup>). Stoga je udio ugljikohidrata monosaharida u ECT 96% dok je disaharida samo 3,8%.

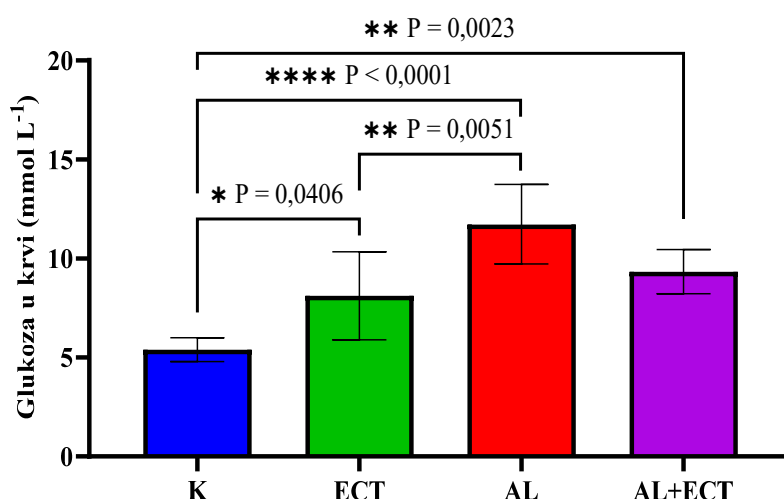


Slika 38. Sastav ugljikohidrata u ekstraktu cvijeta trnine (ECT)

#### 4.3.2. Fiziološka regulacija glukoze u krvi (GUK) nakon konzumacije ekstrakta cvijeta trnine (ECT) u normalnom metabolizmu (normoglikemija) i hiperglikemiji (aloksan model)

Primijećena je statistički značajna razlike između kontrolne (K) ( $5,393 \pm 0,603$ ) i aloksanske (AL) ( $11,73 \pm 2,011$ ) ( $P < 0,0001$ ) te između K i normoglikemijske grupe koja je tretirana sa ECT ( $8,117 \pm 2,219$ ) ( $P = 0,0406$ ). Također je statistički značajna razlika između AL i ECT skupine ( $P = 0,0051$ ) te između K i AL+ECT ( $P = 0,0023$ ). Nije utvrđena statistički značajna razlika između hiperglikemijske skupine koja je tretirana sa ECT i AL (Slika 39).

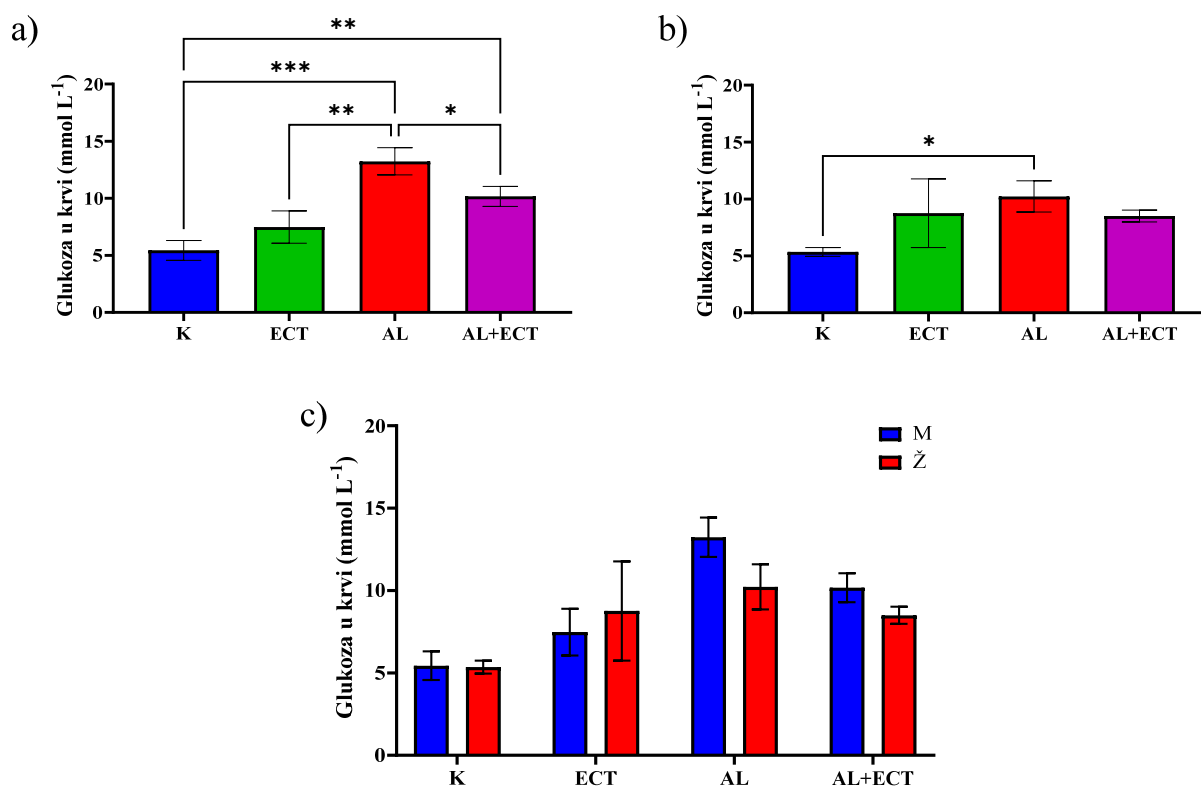
Najveća vrijednost GUK očekivano izmjerena je za hiperglikemijsku skupinu (AL). Međutim u odnosu na kontrolu, utvrđeno je blago ali statistički značajna povećana vrijednost GUK za normoglikemijsku skupinu nakon 24h od tretmana, koja je primala ECT, što ukazuje na potencijalni učinak nevezanih šećera u ECT, kao i na vezane šećere u sastavu polifenola (glikozidi) u ECT.



**Slika 39.** Glukoza u krvi u uzorcima seruma C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 24 sata. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase  $\text{dan}^{-1}$ . Broj životinja po skupini ( $n=16$ , 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL+ECT ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki. Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su P vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom P vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

Na Slici 40. a-c prikazani su rezultati mjerenja glukoze u krvi u uzorcima seruma C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 24 sata.

Utvrđena je statistički značajna razlika između K i AL ( $P=0,0001$ ), K i AL+ECT( $P=0,0036$ ), između ECT i AL( $P=0,0010$ ) te između AL i AL+ECT ( $P=0,0392$ ) u mužjaka te između K i AL ( $P=0,0313$ ) u ženki. Nije utvrđena statistički značajna razlika između spolova (Slika 40 a-c)



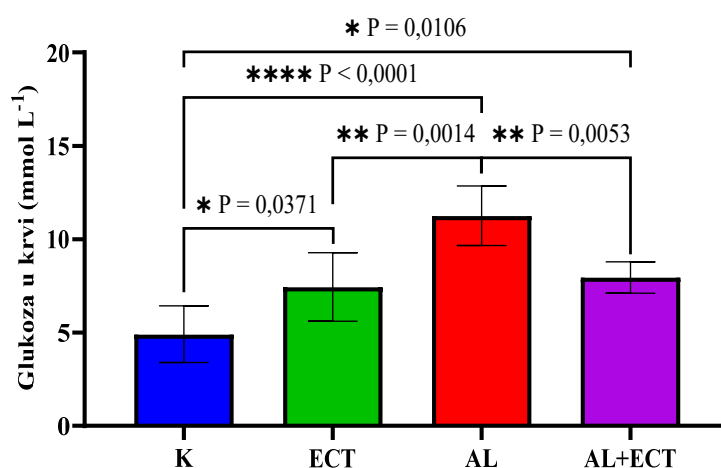
Glukoza u krvi (mmol L <sup>-1</sup> )	K	ECT	AL	AL+ECT
Mušjaci	5,437±0,867	7,477±1,416	13,230±1,193	10,170±0,878
Ženke	5,350±0,391	8,757±3,012	10,220±1,369	8,500±0,519
P	ns	ns	ns	ns

**Slika 40. a-c** Glukoza u krvi u uzorcima seruma C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 24 sata. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani a) za mužjake b) za ženke i c) usporedno za mužjake i ženke. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ±standardna devijacija. Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P\leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno statistički nisu značajno različite nose oznaku ns – nema statističke značajnosti.

Nakon 5 dana tretmana, utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne skupine ( $4,910 \pm 1,518$ ) i ECT ( $7,450 \pm 1,836$ ) ( $P=0,0371$ ), između K i AL skupine ( $11,26 \pm 1,599$ ) ( $P < 0,0001$ ), između ECT i AL ( $P=0,0014$ ), između K i hiperglikemijske skupine tretirane sa ECT AL+ECT ( $7,959 \pm 0,8408$ ) ( $P=0,0106$ ) te između AL i, AL+ECT ( $P=0,0053$ ) (Slika 41).

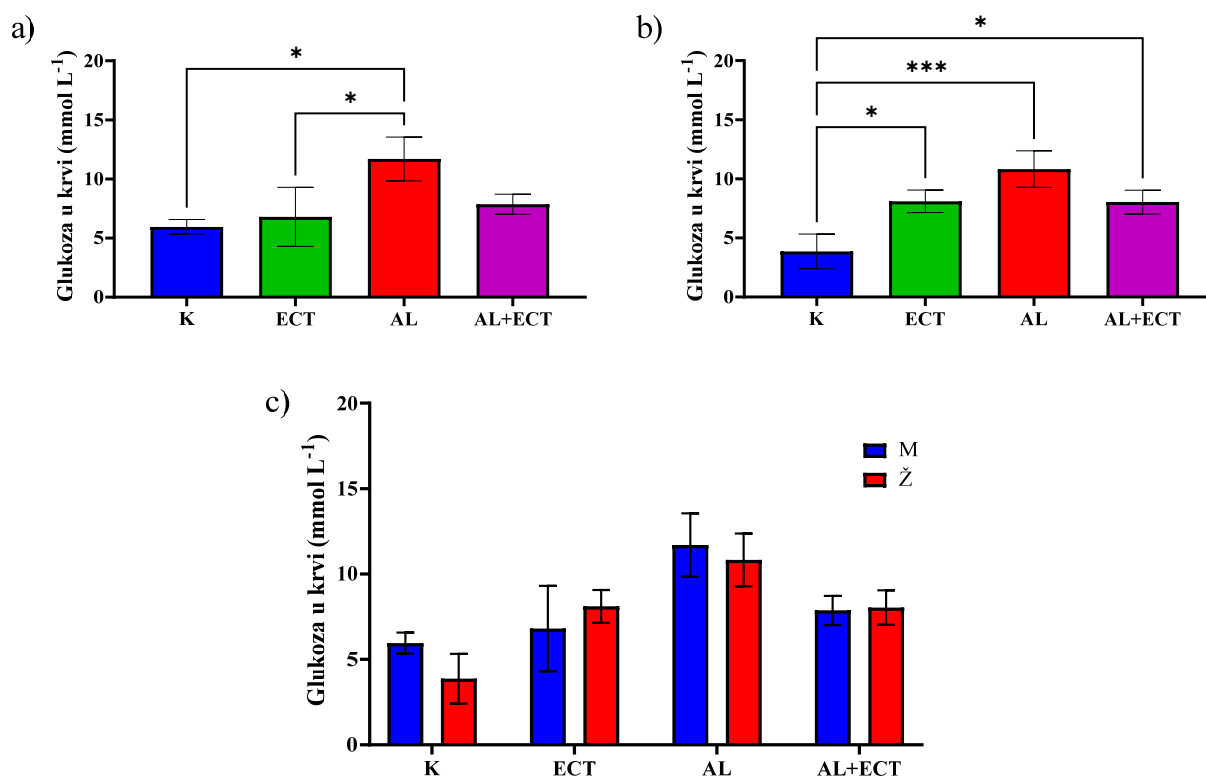
Nakon 5 dnevnog tretmana, utvrđena je statistički značajna razlika između AL i AL+ECT tretiranih skupina što ukazuje na to da duža izloženost tretmanu ECT rezultira smanjenjem GUK u hiperglikemijskog miša.

Također, primijećeno je smanjenje GUK kod normoglikemijske grupe koja je primala ECT, no nedovoljno da bude statistički značajno.



**Slika 41.** Glukoza u krvi u uzorcima seruma C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 5 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase  $\text{dan}^{-1}$ . Broj životinja po skupini ( $n=16$ , 8 ženki i 8 mužjaka). Stupci prikazuju srednju vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki. Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su P vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom P vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

Utvrđena je statistički značajna razlika između K i AL ( $P=0,0115$ ) te između AL i ECT ( $P=0,0268$ ) u mužjaka te između K i ECT ( $P=0,0149$ ), K i AL ( $P=0,0007$ ) te K i AL+ECT ( $P=0,0162$ ). Nije utvrđena statistički značajna razlika između spolova (Slika 42 a-c).



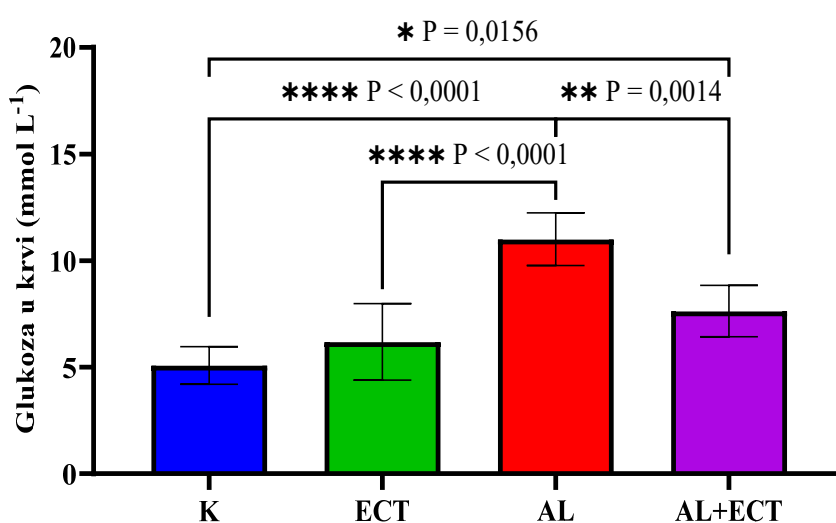
Glukoza u krvi (mmol L <sup>-1</sup> )	K	ECT	AL	AL+ECT
Mušjaci	5,953±0,612	6,800±2,500	11,690±1,853	7,867±0,850
Ženke	3,867±1,457	8,100±0,954	10,820±1,547	8,033±1,012
P	ns	ns	ns	ns

**Slika 42. a-c** Glukoza u krvi u uzorcima seruma C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 5 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za a) mužjake b) ženke i c) usporedno za mužjake i ženke. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje nisu međusobno povezane linija i pripadajućom p vrijednosti nisu statistički značajno različite.



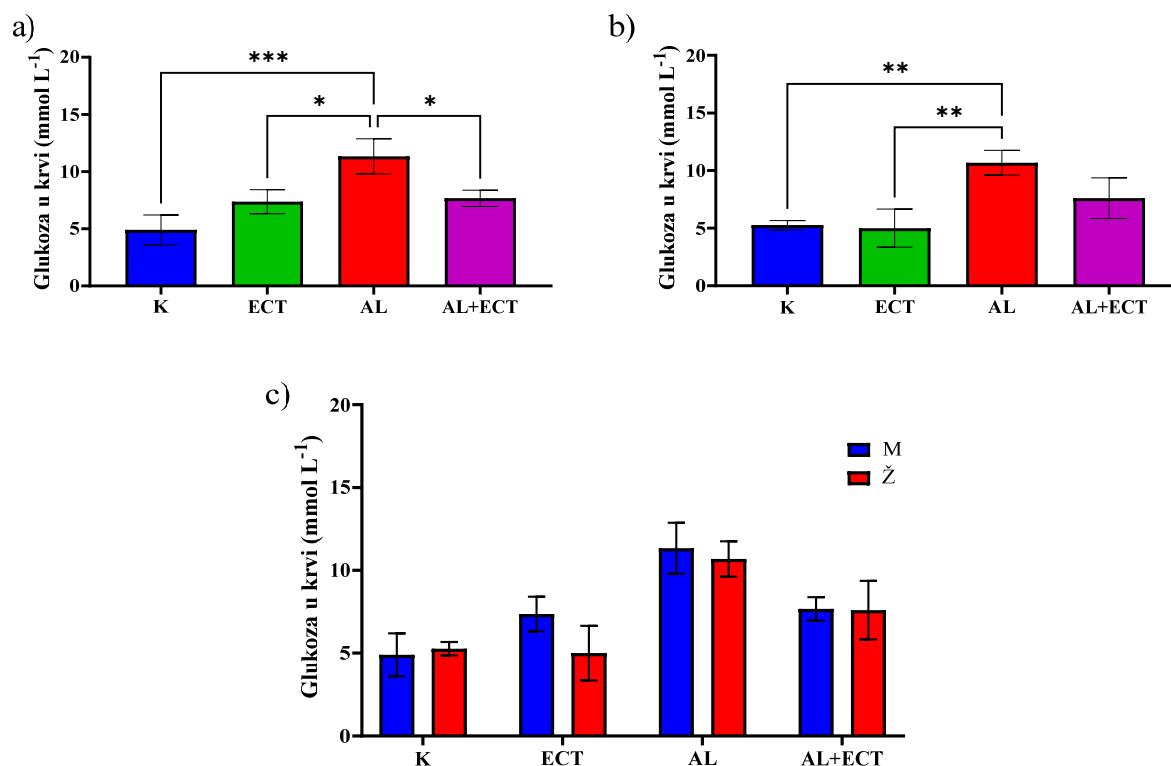
Na Slici 43 koja prikazuje 10 dnevni tretman sa ECT utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između K ( $5,083 \pm 0,8841$ ) i ECT skupine ( $6,183 \pm 1,793$ ), što ukazuje na činjenicu da 10 dnevni, dugotrajniji tretman sa ECT rezultira u nižoj GUK vrijednosti u ECT skupini, u usporedbi sa tretmanom nakon 24 h (Slika 39) i 5 dana (Slika 41).

Utvrđena je statistički značajna razlika između K i AL skupine ( $11,01 \pm 1,233$ ) ( $P < 0,0001$ ), između K i AL+ECT ( $7,633 \pm 1,206$ ) ( $P = 0,0156$ ), između ECT i AL ( $P < 0,0001$ ) te između AL i AL+ECT ( $P = 0,0014$ ). Također primijećeno je da su vrijednosti GUK-a niži u skupini AL+ECT što ukazuje na hipoglikemijski učinak polifenola iz ECT.



**Slika 43.** Glukoza u krvi u uzorcima seruma C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini ( $n=16$ , 8 ženki i 8 mužjaka). K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat ( $100 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL+ECT ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki. Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su P vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom P vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

Utvrđena je statistički značajna razlika između K i AL ( $P=0,0007$ ), ECT i AL ( $P=0,0147$ ) te ECT i AL+ECT ( $P=0,0224$ ) u mužjaka te između K i AL ( $P=0,0049$ ) te ECT i AL ( $P=0,0036$ ) u ženki. Nije utvrđena statistički značajna razlika između spolova (Slika 44 a-c).



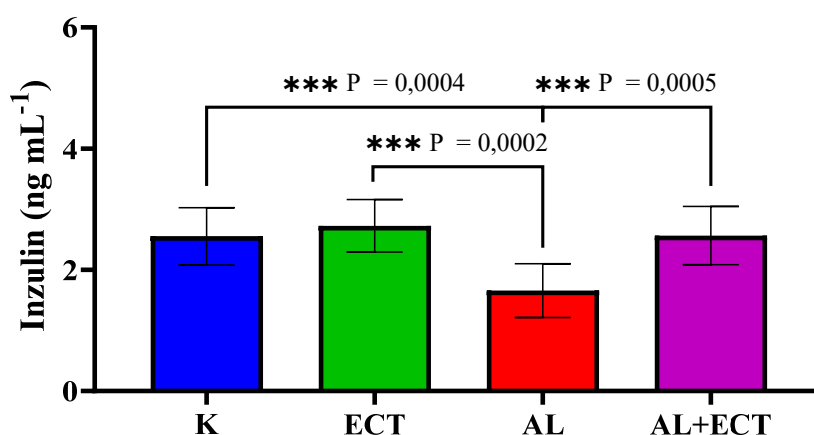
Glukoza u krvi (mmol L <sup>-1</sup> )	K	ECT	AL	AL+ECT
Mušjaci	4,900±1,300	7,367±1,050	11,330±1,531	7,667±0,709
Ženke	5,267±0,404	5,000±1,652	10,680±1,068	7,600±1,769
P	ns	ns	ns	ns

**Slika 44. a-c.** Glukoza u krvi u uzorcima seruma C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženke i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za a) mužjake b) ženke i c) usporedno za mužjake i ženke K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ±standardna devijacija. Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P\leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno statistički nisu značajno različite ne nose oznaku.

Rezultati prikazani na Slikama 39, 41 i 43 pokazuju razine glukoze u krvi u eksperimentalnim skupinama C57BL/6 miša te učinke ECT na razinu glukoze u krvi u normoglikemijskog i hiperglikemijskog miša nakon 1, 5 i 10 dana tretmana. Hiperglikemijska skupina koja je tretirana sa ECT dovela je do statistički značajne redukcije ( $P \leq 0,005$ ) GUK u usporedbi sa aloksanskom skupinom nakon 5 i 10 dana tretmana.

#### 4.3.3. Fiziološka regulacija inzulina u serumu nakon konzumacije ekstrakta cvijeta trnine (ECT) u normalnom metabolizmu (normoglikemija) i hiperglikemiji (aloksanski model)

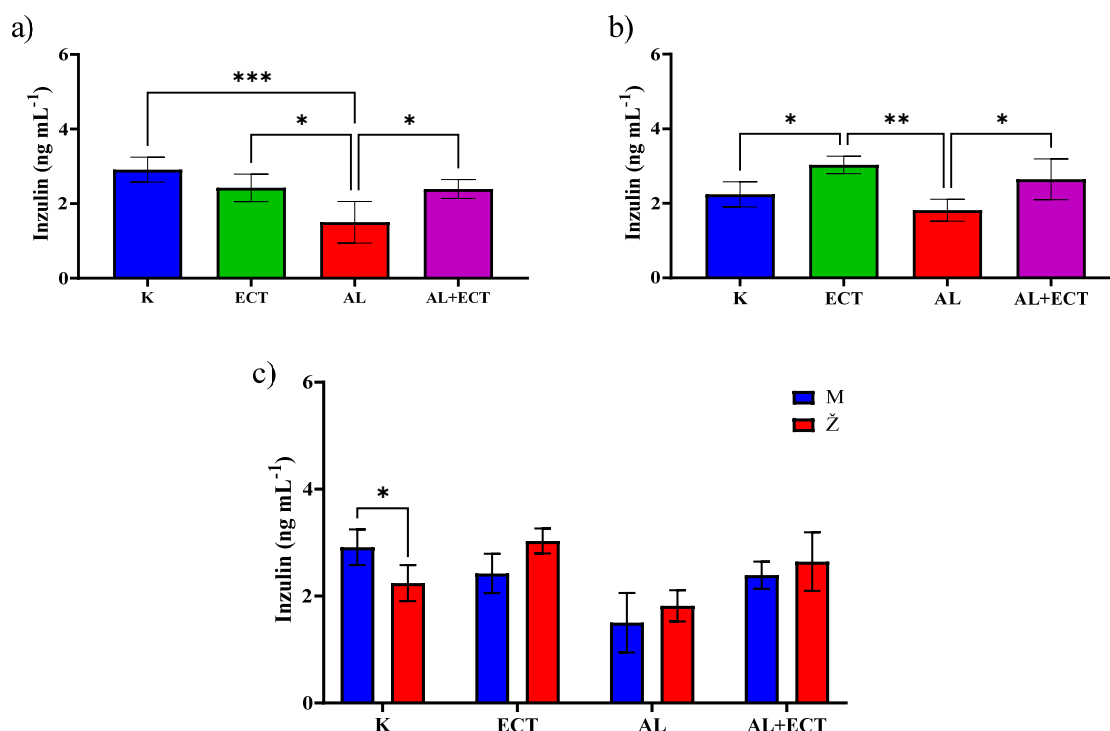
Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne (K) ( $2,554 \pm 0,4733$ ) i aloksanske (AL) ( $1,658 \pm 0,4445$ ) skupine ( $P = 0,0004$ ), između normoglikemijske skupine koja je tretirana sa ECT ( $2,726 \pm 0,4327$ ) i AL ( $P = 0,0002$ ) te između AL i hiperglikemijske skupine koja je tretirana sa ECT (AL+ECT) ( $2,565 \pm 0,4812$ ) ( $P = 0,0005$ ) (Slika 45).



**Slika 45.** Inzulin u uzorcima seruma C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 24 sata. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ± standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki. Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su P vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom P vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

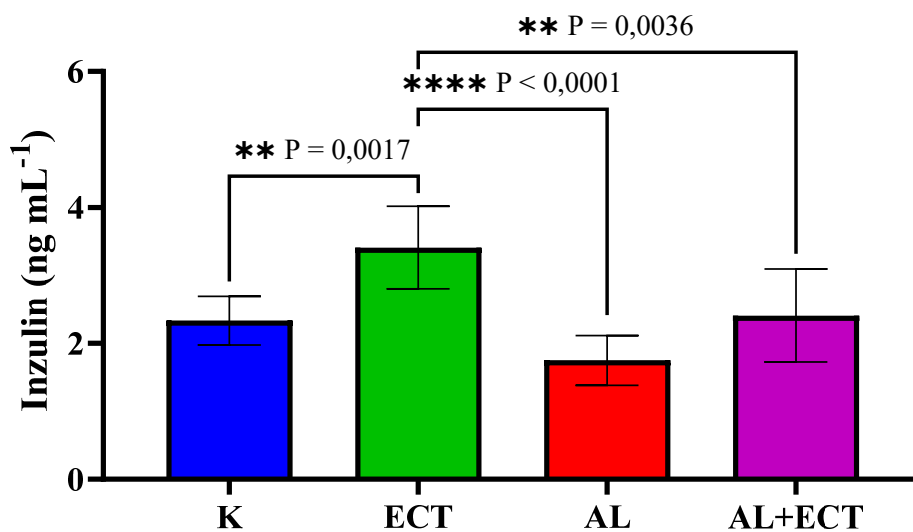
Utvrđena je statistički značajna razlika između K i AL ( $P=0,0002$ ), ECT i AL ( $P=0,0182$ ), AL i AL+ECT ( $P=0,0230$ ) u mužjaka te između K i ECT ( $P=0,0256$ ), ECT i AL ( $P=0,0024$ ) te AL i AL+ECT ( $P=0,0159$ ) u ženki. Između spolova utvrđena je statistički značajna razlika u kontrolnoj skupini ( $P=0,002$ ) (Slika 46. a-c).

Inzulin u serumu ng mL <sup>-1</sup>	K	ECT	AL	AL+ECT
Mušjaci	2,911±0,333	2,423±0,369	1,500±0,556	2,390±0,255
Ženke	2,241±0,336	3,030±0,233	1,815±0,293	2,643±0,548
P	0,002	ns	ns	ns



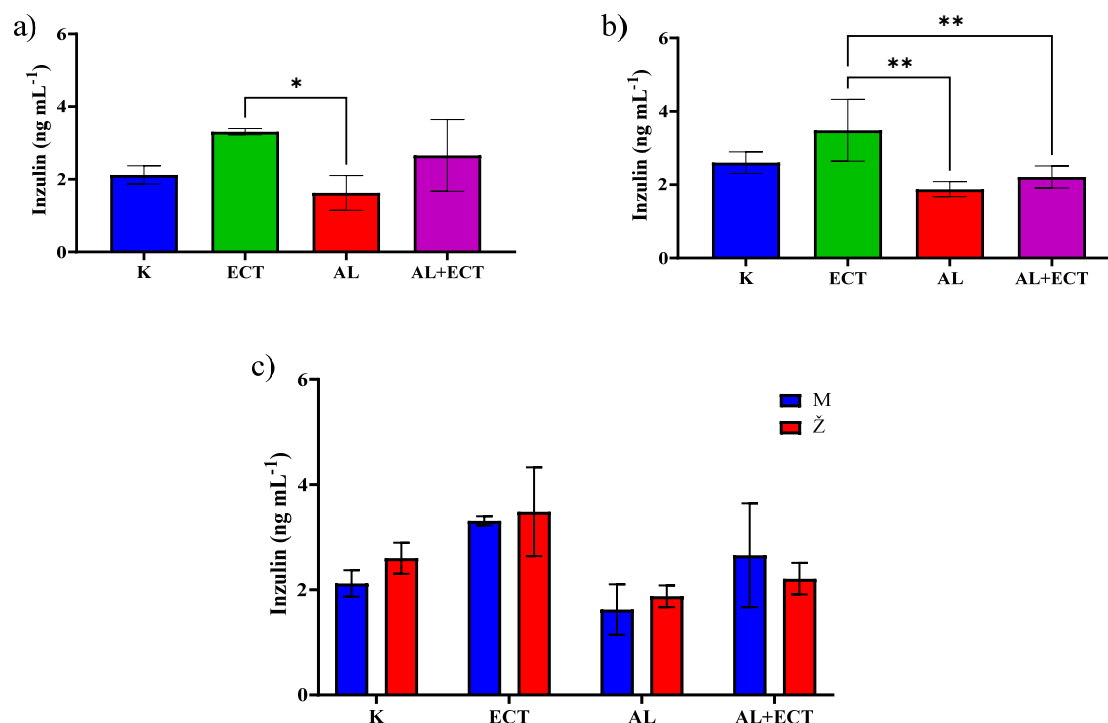
**Slika 46. a-c.** Inzulin u uzorcima seruma C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 24 sata. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani a) za mužjake b) za ženke i c) usporedno za mužjake i ženke. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ± standardna devijacija. Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P\leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno statistički nisu značajno različite nose ne oznaku.

Utvrđena je statistički značajna razlika između K (2,333±0,3580) i ECT (3,409±0,6057) ( $P=0,017$ ), između AL (1,750±0,3665) i ECT ( $P<0,0001$ ) te između AL i AL+ECT (2,409±0,6831) ( $P=0,0036$ ) (Slika 47).



**Slika 47.** Inzulin u uzorcima seruma C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trine nakon 5 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ±standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki. Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su P vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom P vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

Utvrđena je statistički značajna razlika između ECT i AL ( $P=0,0102$ ) u mužjaka te između ECT i AL ( $P=0,0016$ ) te ECT i AL+ECT ( $P=0,0069$ ). Nije utvrđena statistički značajna razlika među spolovima (Slika 48 a-c).

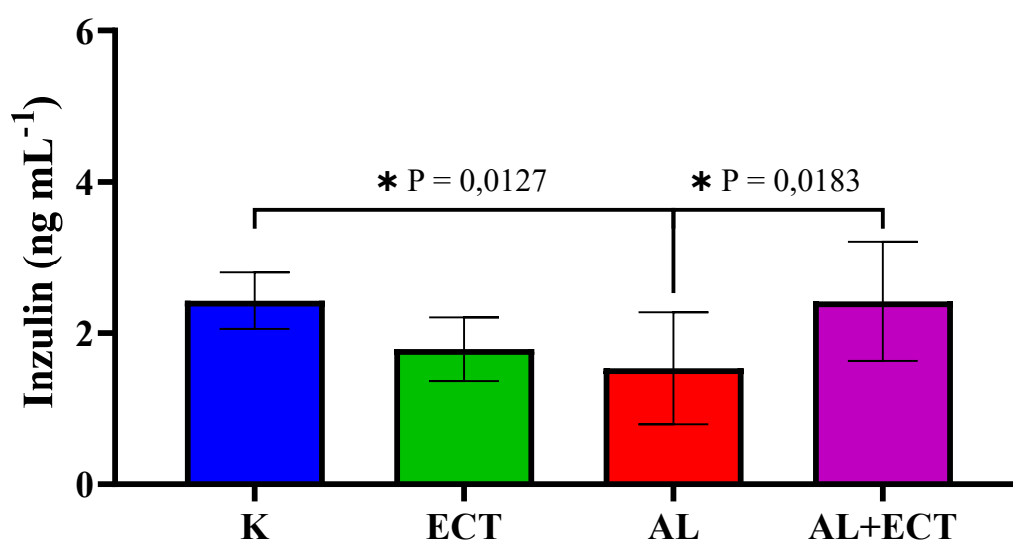


Inzulin u serumu ng m L <sup>-1</sup>	K	ECT	AL	AL+ECT
Mušjaci	2,120±0,252	3,310±0,086	1,625±0,479	2,658±0,987
Ženke	2,600±0,294	3,483±0,844	1,875±0,206	2,210±0,301
P	ns	ns	ns	ns

**Slika 48. a-c** Inzulin u uzorcima seruma C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 5 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani a) za mužjake b) za ženke i c) usporedno za mužjake i ženke. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ±standardna devijacija. Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P\leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno statistički nisu značajno različite ne nose oznaku (Slika 48 a-c).

Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrolne skupine (K) ( $2,430 \pm 0,3742$ ) i aloksanske (AL) ( $1,535 \pm 0,7420$ ) ( $P=0,0127$ ) te između AL i AL+ECT ( $2,420 \pm 0,7892$ ) ( $P=0,0183$ ) (Slika 49).

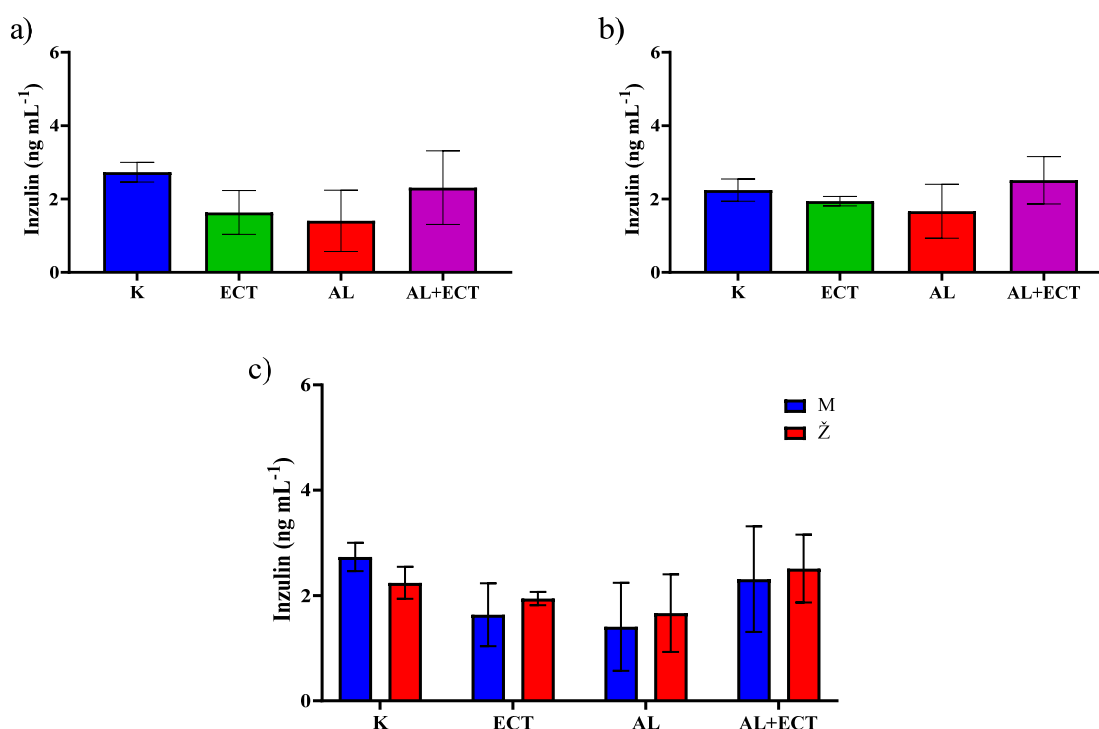
Primijećeno je da je u normoglikemijskog miša tretiranog sa ECT veća koncentracija inzulina u serumu u usporedbi sa kontrolom za prvi i deseti dan eksperimenta, dok aloksanska skupina ima značajno niže razine inzulina u serumu u usporedbi sa kontrolom za prvi i deseti dan. Međutim, tretman sa ECT u hiperglikemijskoj skupini pokazao je značajni rast u razini inzulina u serumu u usporedbi sa aloksanskom za prvi i deseti dan.



**Slika 49.** Inzulin u uzorcima seruma C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase  $\text{dan}^{-1}$ . Broj životinja po skupini ( $n=16$ , 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL+ECT ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki. Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su P vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom P vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

Nije utvrđena statistički značajna razlika između mužjaka, kao niti među ženkama. Nije utvrđena statistički značajna razlika između spolova (Slika 50 a-c).

Inzulin u serumu ng mL <sup>-1</sup>	K	ECT	AL	AL+ECT
Mušjaci	2,732±0,269	1,633±0,597	1,405±0,835	2,310±1,004
Ženke	2,241±0,305	1,943±0,127	1,665±0,737	2,512±0,645
P	ns	ns	ns	ns

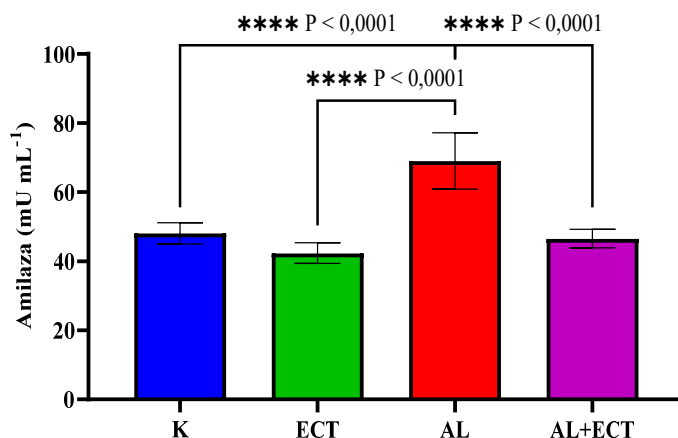


**Slika 50. a-c.** Inzulin u uzorcima seruma C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani a) za mužjake b) za ženke i c) usporedno za mužjake i ženke. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija. Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno statistički nisu značajno različite nose oznaku ns – nema statističke značajnosti.



#### 4.3.4. Fiziološka regulacija $\alpha$ -amilaze u serumu nakon tretmana ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u normalnom metabolizmu (normoglikemija) i hiperglikemiji (aloksanski model)

Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrole (K) ( $48,08 \pm 3,073$ ) i aloksanske skupine (AL) ( $69,04 \pm 8,158$ ) ( $P < 0,0001$ ), između ECT ( $42,33 \pm 3,008$ ) i AL ( $P < 0,0001$ ) te između AL i AL+ECT ( $46,56 \pm 2,699$ ) ( $P < 0,0001$ ) (Slika 51).



**Slika 51.**  $\alpha$ -amilaza u uzorcima seruma C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 24 sata.

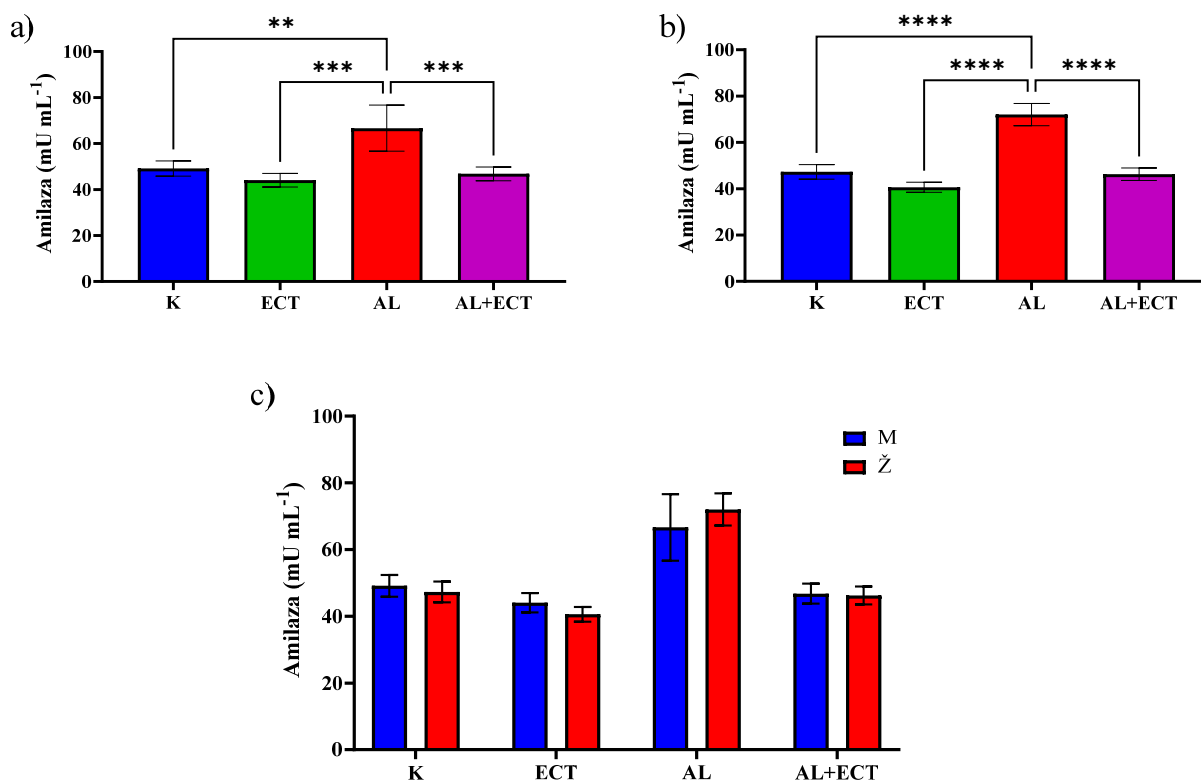
Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini ( $n=16$ , 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola.

K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL+ECT ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost  $\pm$ standardna devijacija.

Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki.

Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su P vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom P vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

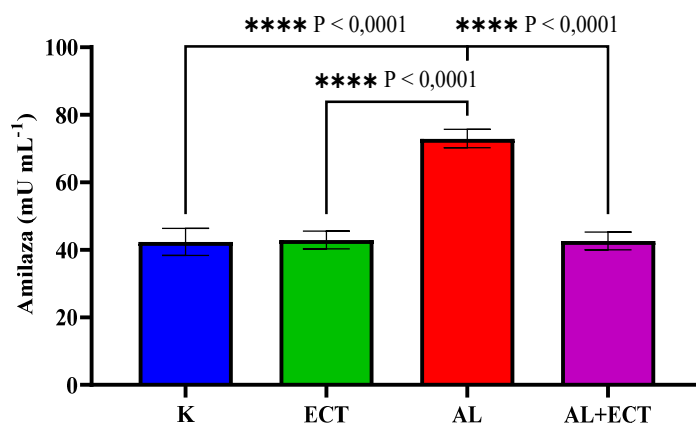
Utvrđena je statistički značajna razlika između K i AL ( $P=0,0080$ ), između ECT i AL ( $P=0,0005$ ), AL i AL+ECT ( $P=0,0009$ ) u mužjaka te između K i AL ( $P<0,0001$ ), ECT i AL ( $P<0,0001$ ) te AL i AL+ECT ( $P<0,0001$ ). Nije utvrđena statistički značajna razlika između spolova (Slika 52 a-c).



$\alpha$ -amilaza u serumu mU mL <sup>-1</sup>	K	ECT	AL	AL+ECT
Mušjaci	49,130±3,260	44,050±2,914	66,660±9,986	46,790±2,991
Ženke	47,300±3,143	40,610±2,180	72,020±4,816	46,260±2,669
P	ns	ns	ns	ns

**Slika 52. a-c**  $\alpha$  -amilaza u krvi u uzorcima seruma C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 24 sata. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani a) za mužjake b) za ženke i c) usporedno za mužjake i ženke K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P\leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno statistički nisu značajno različite nose oznaku ns – nema statističke značajnosti.

Utvrđena je statistički značajna razlika između kontrole (K) ( $42,94 \pm 2,644$ ) i aloksanske skupine (AL) ( $72,97 \pm 2,728$ ) ( $P < 0,0001$ ), između ECT ( $42,94 \pm 2,644$ ) i AL ( $P < 0,0001$ ) te između AL i AL+ECT ( $42,65 \pm 2,637$ ) ( $P < 0,0001$ ) (Slika 53).

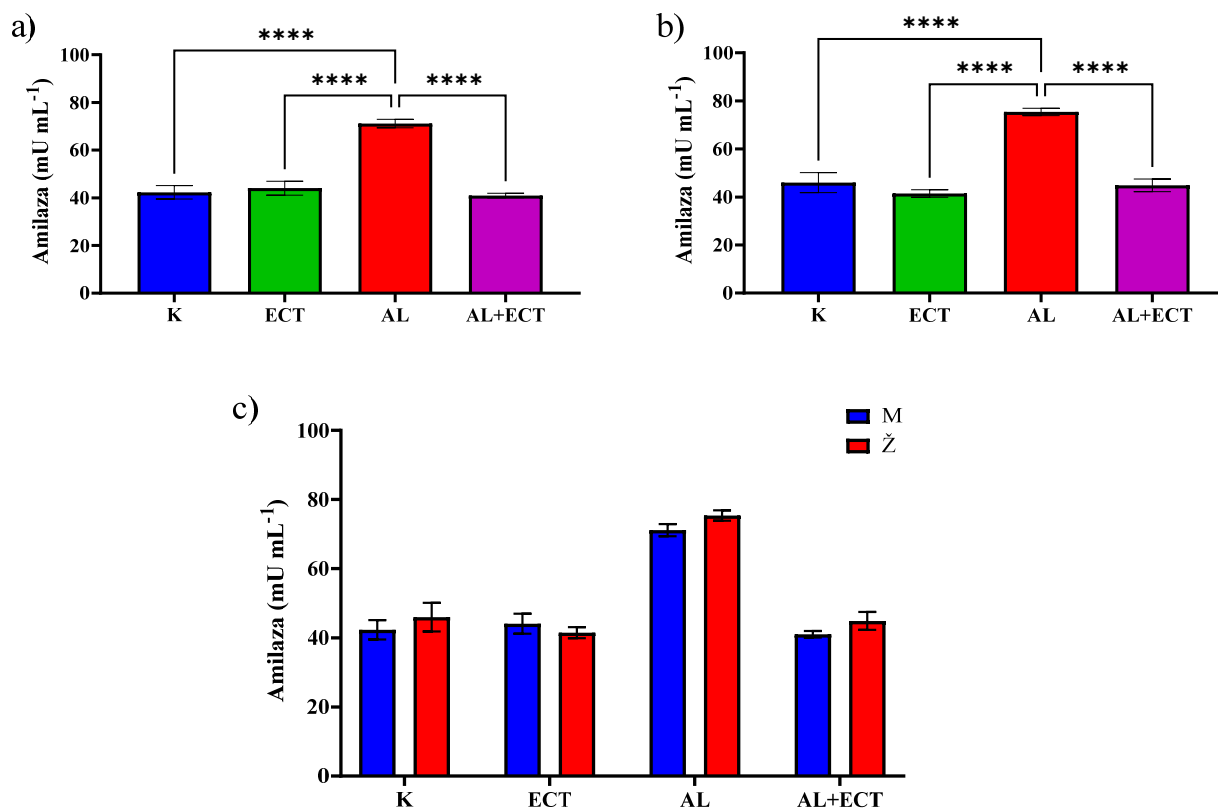


**Slika 53.**  $\alpha$ -amilaza u uzorcima seruma C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 5 dana.

Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini ( $n=16$ , 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL+ECT ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase).

Stupci prikazuju srednju vrijednost  $\pm$ standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki. Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su P vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom P vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

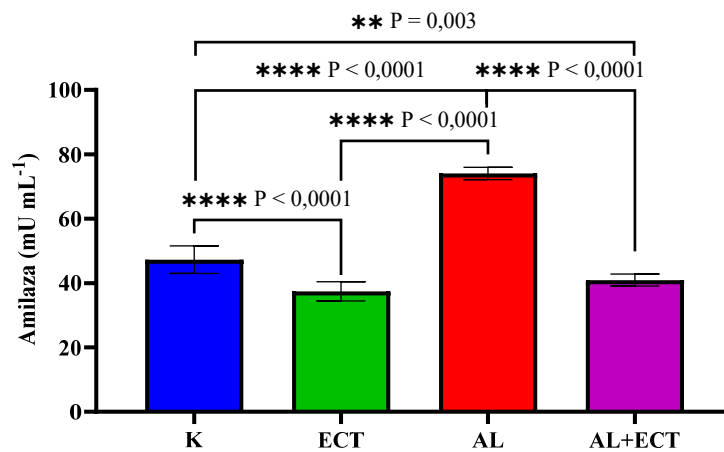
Utvrđena je statistički značajna razlika između K i AL ( $P < 0,0001$ ), ECT i AL ( $P < 0,0001$ ) te AL i AL+ECT ( $P < 0,0001$ ) u mužjaka te između K i AL ( $P < 0,0001$ ), ECT i AL ( $P < 0,0001$ ) te AL i AL+ECT ( $P < 0,0001$ ) u ženki. Nije utvrđena statistički značajna razlika među spolovima (Slika 54 a-c).



$\alpha$ -amilaza u serumu $\text{mU mL}^{-1}$	K	ECT	AL	AL+ECT
Mušjaci	42,310±2,820	44,050±2,914	71,150±1,781	40,990±0,936
Ženke	45,990±4,141	41,460±1,586	75,380±1,498	44,860±2,599
P	ns	ns	ns	ns

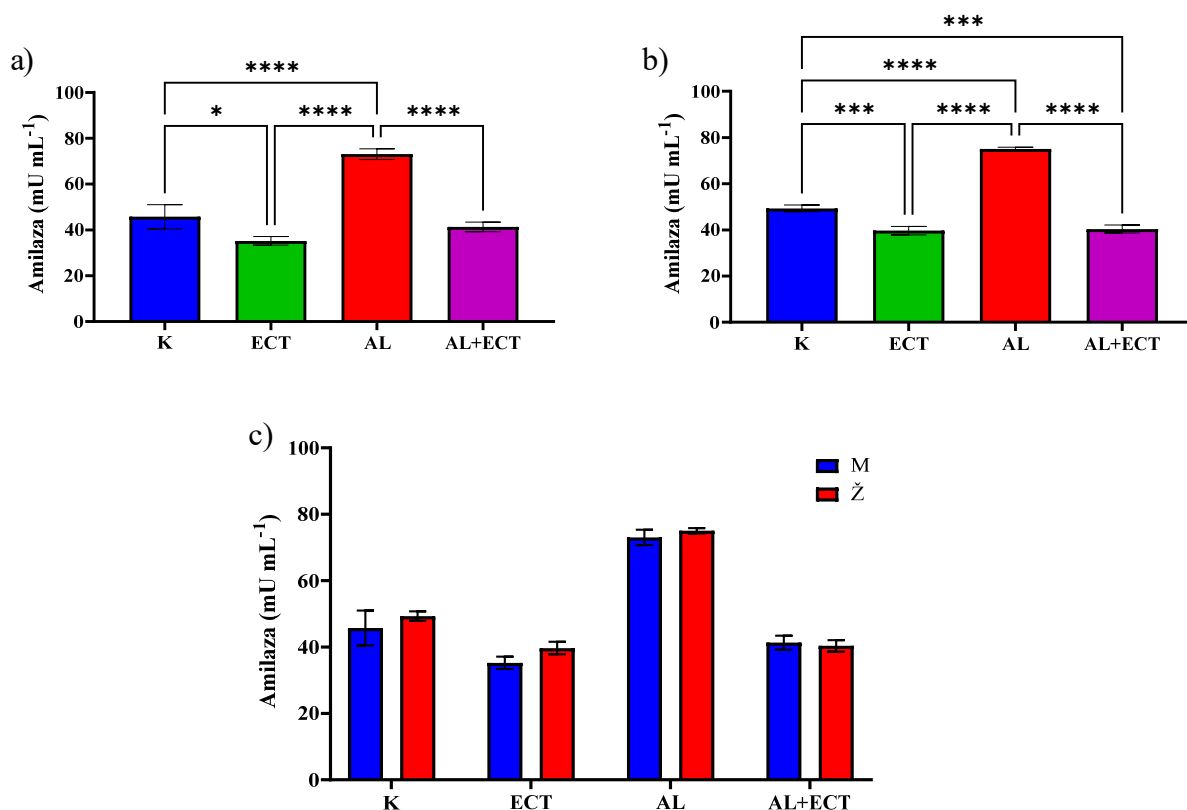
**Slika 54. a -c**  $\alpha$  -amilaza u uzorcima seruma C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 5 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase  $\text{dan}^{-1}$ . Broj životinja po skupini ( $n=16$ , 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za a) mužjake b) ženke i c) usporedno za mužjake i ženke. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL+ECT ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost±standardna devijacija. Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno statistički nisu značajno različite nose oznaku ns – nema statističke značajnosti.

Uočena je statistički značajna razlika između kontrole (K) ( $47,27 \pm 4,226$ ) i normoglikemijske koja je tretirana sa ECT (ECT) ( $37,45 \pm 2,967$ ), ( $P < 0,0001$ ) između ECT i aloksanske (AL) skupine ( $74,04 \pm 1,900$ ) ( $P < 0,0001$ ), između K i AL skupine ( $P < 0,0001$ ), između K i hiperglikemijske skupine koja je tretirana sa ECT (AL+ECT) ( $P = 0,003$ ) te između AL i AL+ECT skupine ( $P < 0,0001$ ) (Slika 55). Iz navedenog se zaključuje da je 10 ponovljenih doza ECT imalo inhibirajući učinak na aktivnost  $\alpha$ -amilaze u serumu. U aloksanskoj skupini, za 1. i 10. dan, primijećeno je statistički značajno povećanje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze u serumu, u usporedbi sa kontrolom. Suprotno tome u skupini AL+ECT za 1. i 10. dan primijećeno je statistički značajno inhibiranje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze u serumu u odnosu na aloksansku.



**Slika 55.**  $\alpha$ -amilaza u uzorcima seruma C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnina nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase  $\text{dan}^{-1}$ . Broj životinja po skupini ( $n=16$ , 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnina ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL+ECT ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki. Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su P vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom P vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

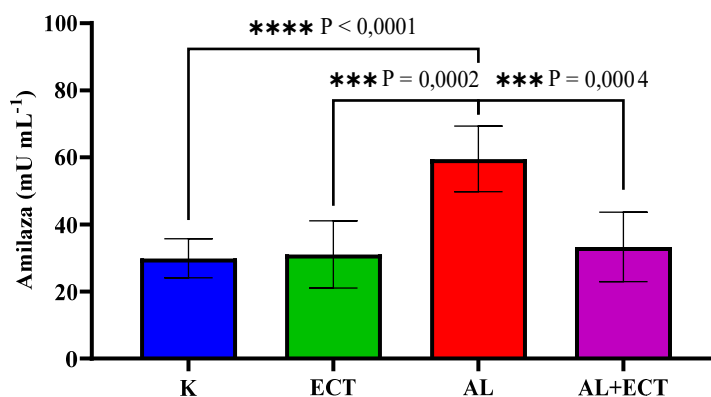
Utvrđena je statistički značajna razlika između K i ECT ( $P=0,0100$ ), K i AL ( $P<0,0001$ ), AL i ECT i AL ( $P<0,0001$ ) i AL+ECT ( $P<0,0001$ ) u mužjaka te između K i ECT ( $P=0,0002$ ), K i AL ( $P<0,0001$ ), AL i ECT i AL ( $P<0,0001$ ) i AL+ECT ( $P<0,0001$ ) te K i AL+ECT ( $P=0,0004$ ) u ženki (Slika 56 a-c).



$\alpha$ -amilaza u serumu $\text{mU mL}^{-1}$	K	ECT	AL	AL+ECT
Mušjaci	45,740±5,226	35,210±1,850	73,050±2,335	44,320±2,113
Ženke	49,300±1,443	39,700±1,857	75,030±0,793	40,360±1,718
P	ns	ns	ns	ns

**Slika 56. a-c**  $\alpha$  -amilaza u uzorcima seruma C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase  $\text{dan}^{-1}$ . Broj životinja po skupini ( $n=16$ , 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za a) mužjake b) ženke i c) usporedno za mužjake i ženke. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL+ECT ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost  $\pm$ standardna devijacija. Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P\leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno statistički nisu značajno različite nose oznaku ns – nema statističke značajnosti.

Utvrđena je statistički značajna razlika između K ( $29,91 \pm 5,832$ ) i AL ( $59,56 \pm 9,801$ ) ( $P < 0,0001$ ), između ECT ( $31,09 \pm 9,990$ ) i AL ( $P = 0,0002$ ) te između AL i AL+ECT ( $33,33 \pm 10,33$ ) ( $P = 0,0004$ ) (Slika 57).



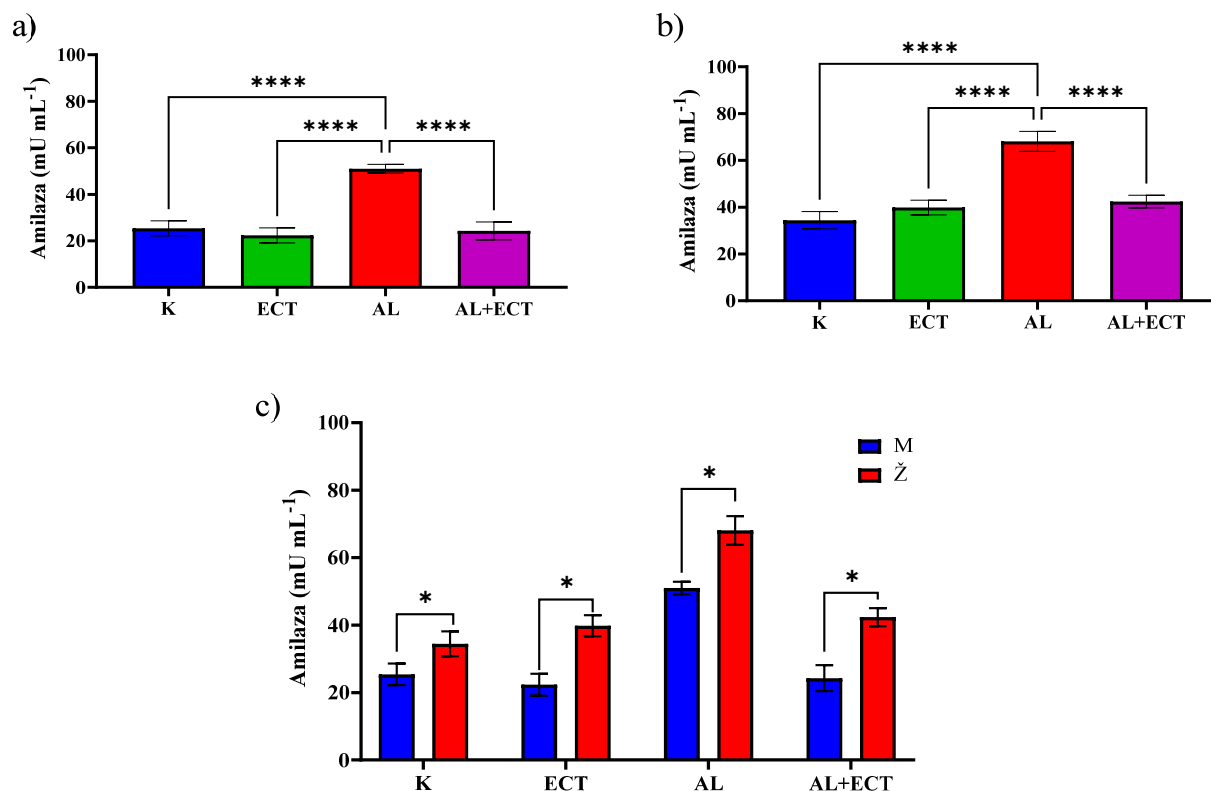
**Slika 57.**  $\alpha$ -amilaza u uzorcima homogenata tkiva jetre C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi  $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase  $\text{dan}^{-1}$ . Broj životinja po skupini ( $n=16$ , 8 ženki i 8 mužjaka).

Rezultati su prikazani za oba spola. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat ( $150 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase), AL+ECT ( $25 \text{ mg kg}^{-1}$  tjelesne mase).

Stupci prikazuju srednju vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki.

Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su P vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom P vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

Utvrđena je statistički značajna razlika između K i AL ( $P<0,0001$ ), ECT i AL ( $P<0,0001$ ), AL i AL+ECT ( $P<0,0001$ ) u mužjaka te između K i AL ( $P<0,0001$ ), ECT i AL ( $P<0,0001$ ), AL i AL+ECT ( $P<0,0001$ ) u ženki. Utvrđena je statistički značajna razlika između spolova (Slika 58 a-c).



$\alpha$ -amilaza u jetri mU mL <sup>-1</sup>	K	ECT	AL	AL+ECT
Mušjaci	25,400±3,199	22,350±3,253	51,020±1,863	24,300±3,860
Ženke	34,430±3,691	39,820±3,152	68,090±4,261	42,360±2,673
P	0,0329	0,0003	0,0003	0,0003

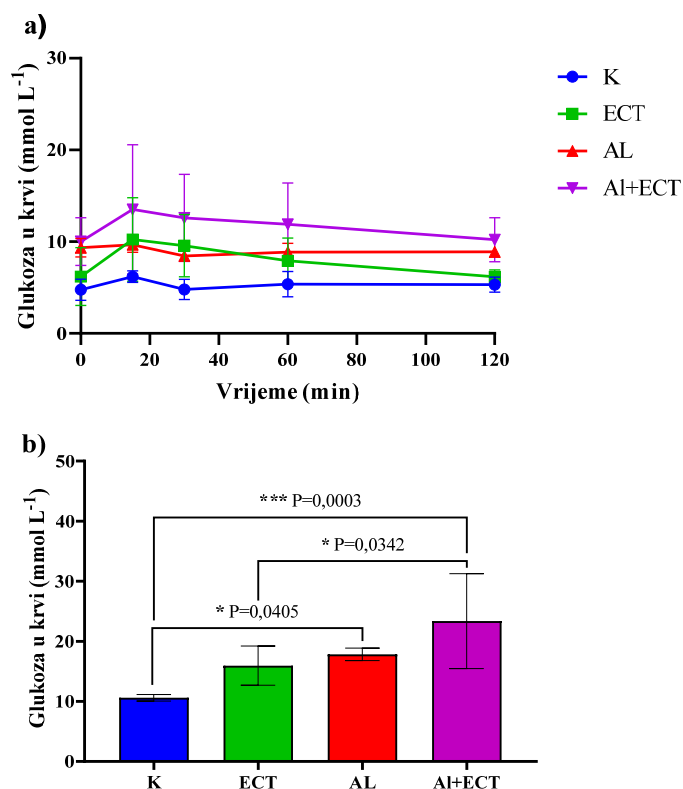
**Slika 58. a-c**  $\alpha$ -amilaza u uzorcima homogenata tkiva jetre C57BL/6 miša, tretiranog ekstraktom cvijeta trnine nakon 10 dana. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za a) mužjake b) ženke i c) usporedno za mužjake i ženke. Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P\leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno statistički nisu značajno različite nose oznaku ns – nema statističke značajnosti.



#### 4.3.5. Učinak na oralni glukozni tolerans test (OGTT)

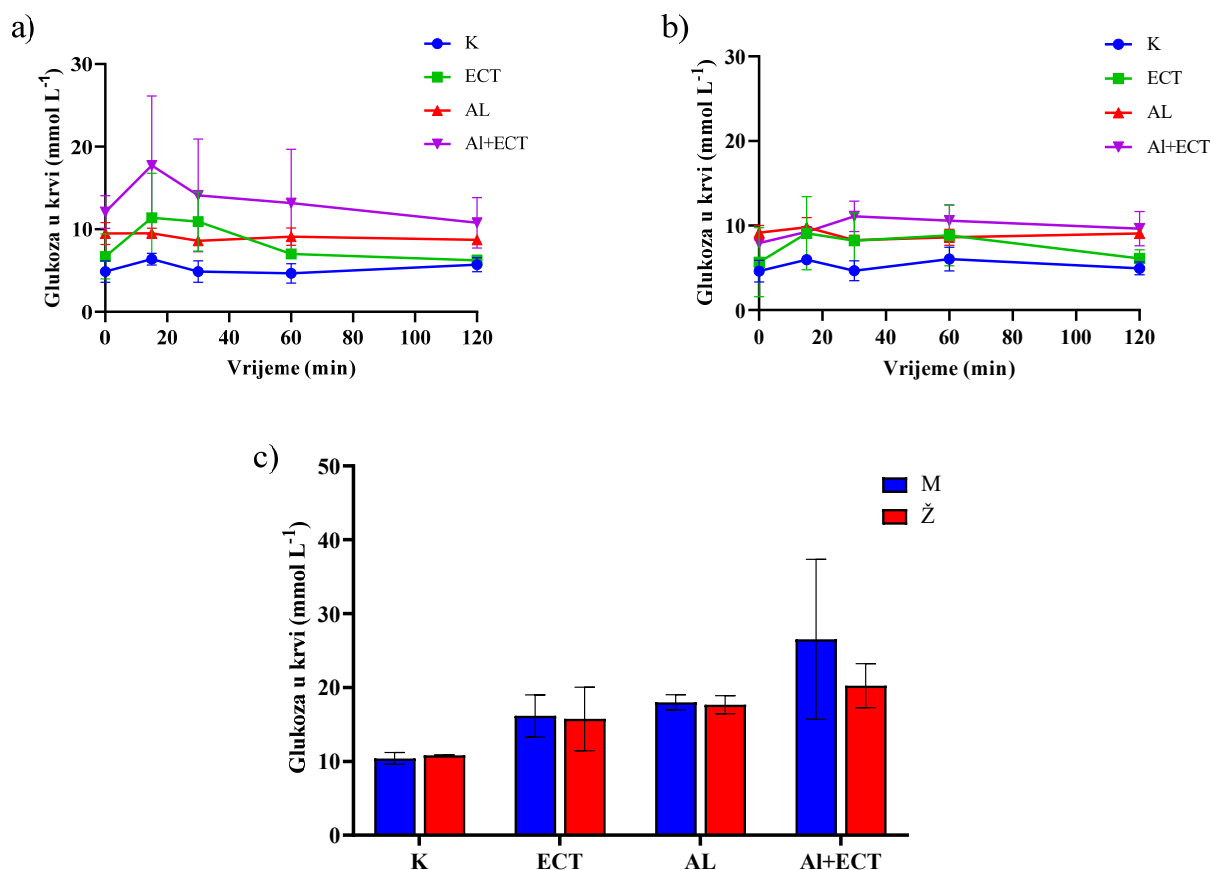
OGTT prikazuje 120 minutnu dinamiku apsorpcije glukoze u krvi. Razine glukoze u krvi prikazane su modelom farmakokinetičkih krivulja i njihove površine (AUC) za sve eksperimentalne skupine nakon unosa glukozne otopine. Učinak tretmana ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u normoglikemijskoj skupini kao i u hiperglikemijskoj, istražen je OGTT testom kroz 10 eksperimentalnih dana, nakon davanja 1., 5. i 10. dana eksperimentalnih doza.

Za početno mjerenje OGTT bez glukozne otopine utvrđena je značajna statistička razlika između kontrolne skupine i hiperglikemijske ( $P=0,0405$ ), između kontrolne i hiperglikemijske koja je tretirana sa ECT ( $P=0,003$ ), te između normoglikemijske koja je tretirana sa ECT i hiperglikemijske koja je tretirana sa ECT ( $P=0,0342$ ) (Slika 59 a-b).



**Slika 59. a-b** OGTT početno mjerenje (bez glukozne otopine) u uzorcima krvi C57BL/6 miša. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola a) OGTT krivulja i b) AUC područje ispod krivulje. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). . Stupci prikazuju srednju vrijednost ±standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki. Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su P vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P\leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom P vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

Za mužjake i za ženke pokazano je da kombinirani tretman AL+ECT poboljšava homeostazu glukoze i smanjuje GUK te dovodi do brže uspostave homeostaze, u usporedbi sa AL skupinom (a i b). Za početno mjerenje OGTT bez glukozne otopine utvrđeno je da nema statističke značajnosti između spolova (c) (Slika 60 a-c).



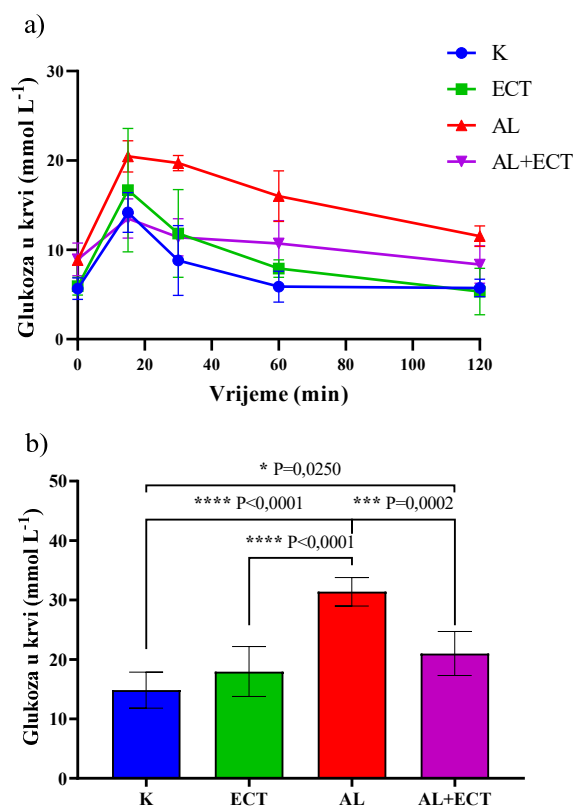
**Slika 60. a-c** OGTT početno mjerenje bez glukozne otopine u uzorcima krvi C57BL/6 miša. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola a) OGTT krivulja mužjaci b) OGTT krivulja ženke i c) AUC područje ispod krivulje. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ±standardna devijacija. Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ).

Utvrđena je statistički značajna razlika između AL i ECT ( $P < 0,0001$ ), AL i K ( $P < 0,0001$ ), AL+ECT i K ( $P = 0,0250$ ) i AL+ECT i AL ( $P = 0,0002$ ) (Slika 61 a-b).

Najveću površinu ispod krivulje (AUC) ima očekivano hiperglikemijska grupa, što je vidljivo iz grafa a) (gdje ima i tendenciju naglog skoka u 15' ali i usporenog opadanja prema 120').

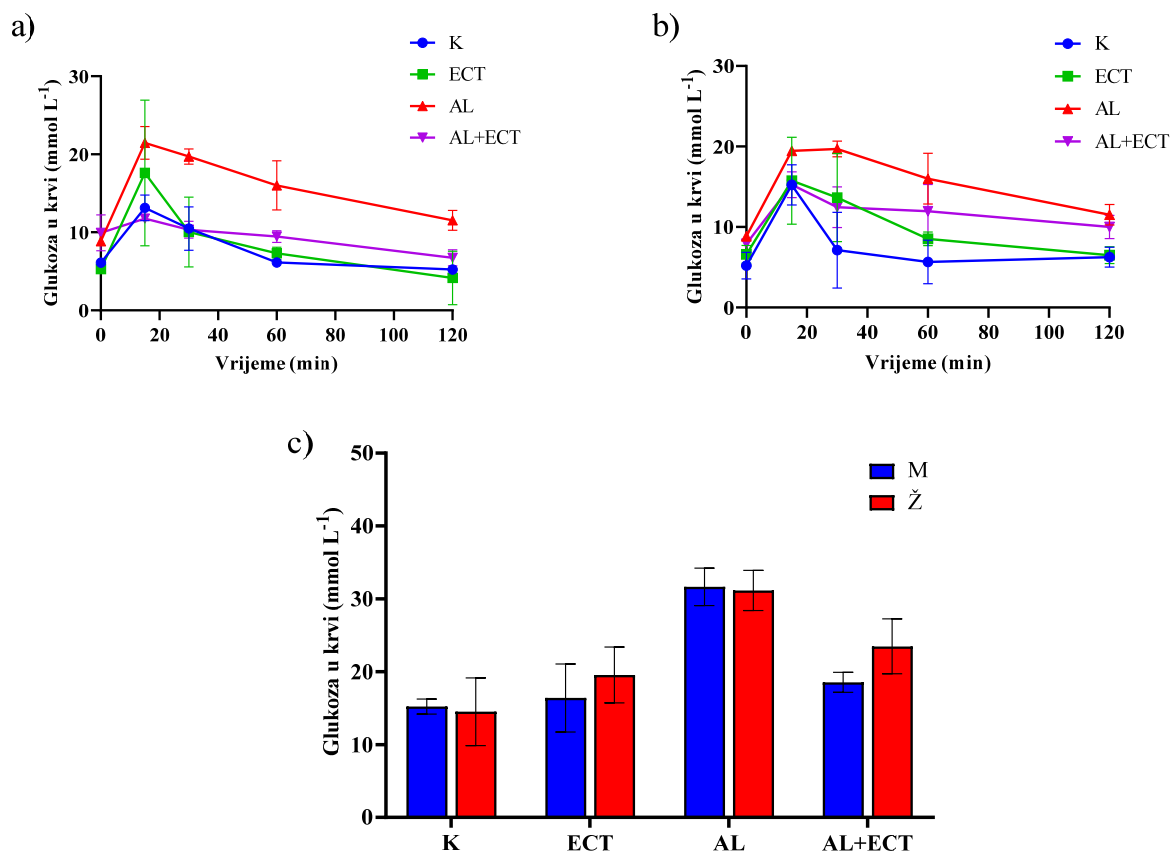
Normoglikemijska grupa koja je tretirana sa ECT, ima tendenciju bržeg opadanja i uspostavljanja normalne krivulje glukoze, a slično kao u kontrolne grupe.

Ukupne vrijednosti kretanja glukoze u krvi tijekom 120 minuta, kao i površine ispod krivulje (AUC) su veće nego u početnom mjerenju, budući da je u 0.danu počelo tretiranje glukoznom otopinom, što je i očekivani porast.



**Slika 61. a-b** OGTT nulti dan tretmana glukoznom otopinom, u uzorcima krvi C57BL/6 miša. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola a) OGTT krivulja i b) AUC područje ispod krivulje. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ±standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki. Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su P vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom P vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

Na Slici 62 (a-c) za mužjake i za ženke pokazano je da kombinirani tretman AL+ECT poboljšava homeostazu glukoze i smanjuje GUK te dovodi do brže uspostave homeostaze, u usporedbi sa AL skupinom (a i b). Za nulti dan tretmana OGTT utvrđeno je da nema statističke značajnosti između spolova (c).

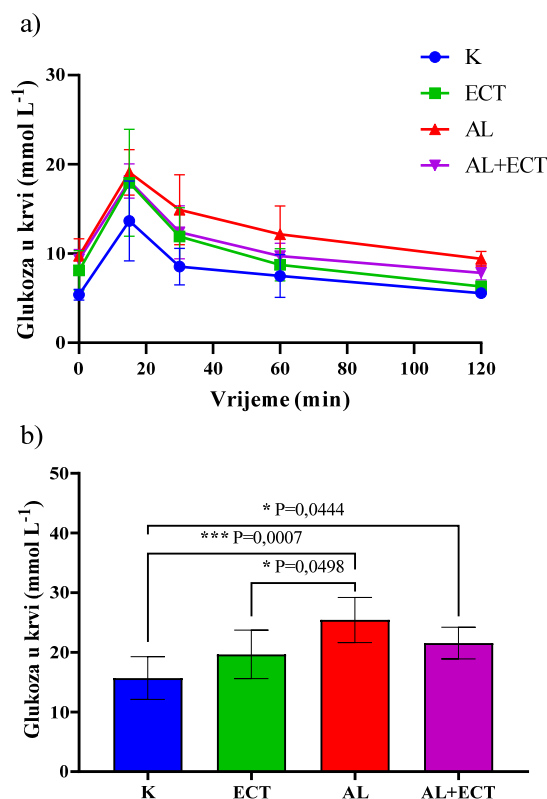


**Slika 62. a-c** OGTT nulti dan u uzorcima krvi C57BL/6 miša. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola a) OGTT krivulja mužjaci b) OGTT krivulja ženke i c) AUC područje ispod krivulje. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ±standardna devijacija. Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ).

Utvrđena je statistički značajna razlika između AL i ECT ( $P=0,0498$ ), AL i K ( $P=0,0007$ ), AL+ECT i K ( $P=0,0444$ ) (Slika 63 a-b).

Površina ispod krivulje (AUC) najveća je za hiperglikemijsku skupinu što je vidljivo iz grafa a) da hiperglikemijskoj skupini treba najduže za uspostavljanje normalne krivulje glukoze, dok je ta površina najmanja za kontrolnu skupinu i normoglikemijsku skupinu tretiranu sa ECT, a koje vrlo brzo uspostavljaju homeostazu glukoze.

U usporedbi sa nultim danom, sve skupine imaju brži pad odnosno brže uspostavljenu homeostazu glukoze prema 120-oj minuti nego što je bilo za 0.dan, time i niže AUC krivulje.



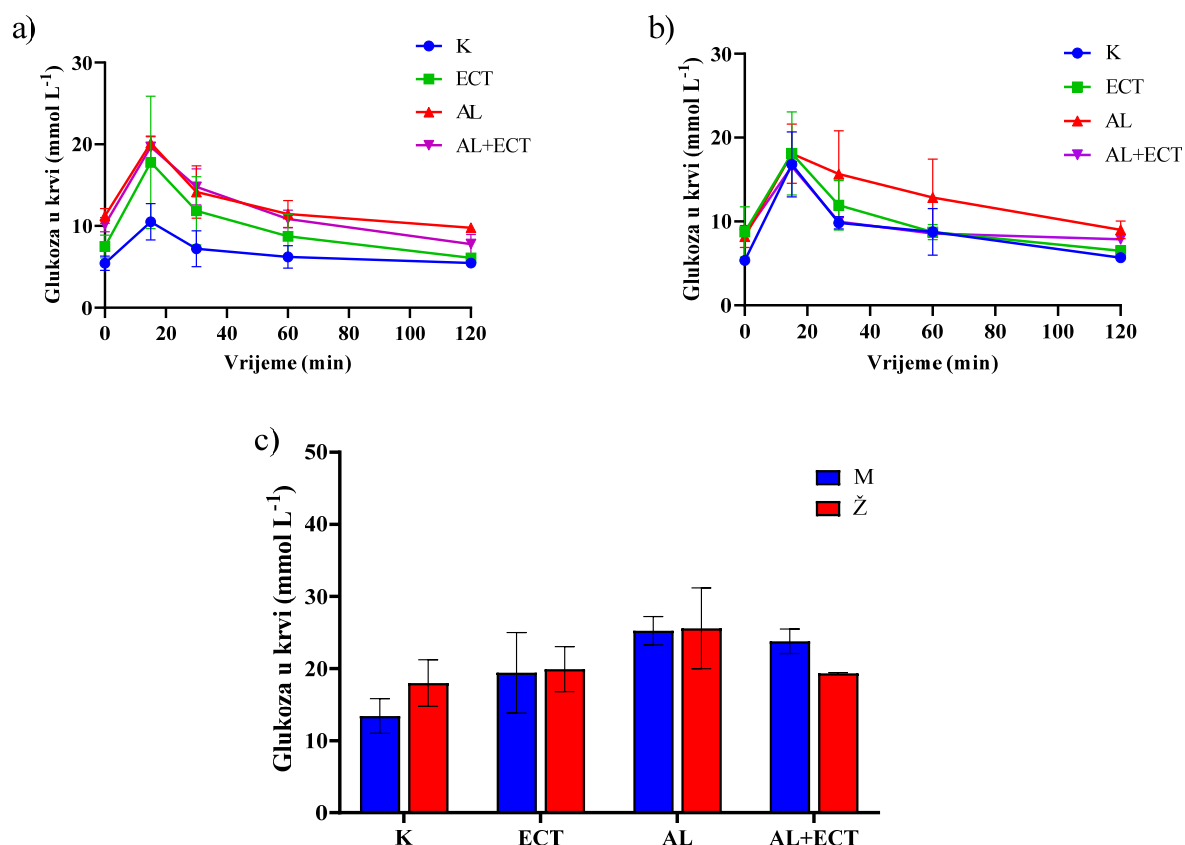
**Slika 63. a-b** OGTT prvi dan tretmana, u uzorcima krvi C57BL/6 miša. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola a) OGTT krivulja i b) AUC područje ispod krivulje.

K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ±standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki.

Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su P vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ).

Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom P vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

Na Slici 64 (a-c) za mužjake i za ženke pokazano je da kombinirani tretman AL+ECT poboljšava homeostazu glukoze i smanjuje GUK te dovodi do brže uspostave homeostaze, u usporedbi sa AL skupinom (a i b). Za prvi dan tretmana, OGTT utvrđeno je da nema statističke značajnosti između spolova (c).

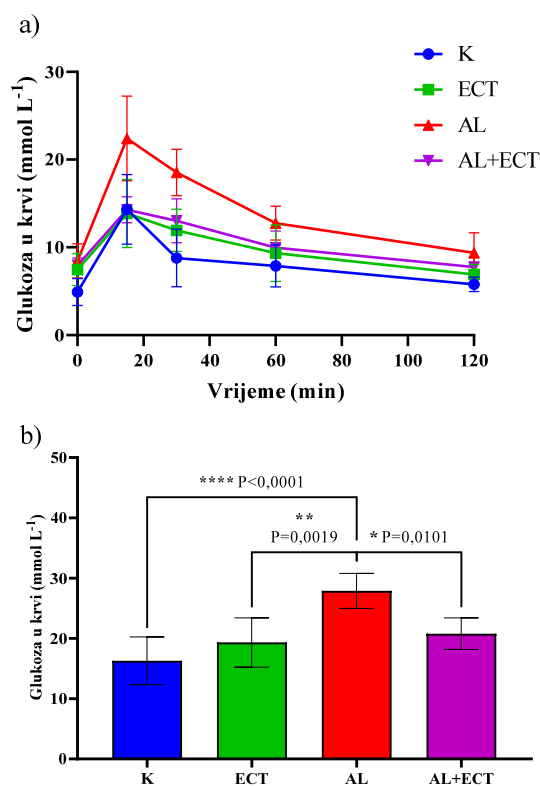


**Slika 64.** a-c OGTT prvi dan u uzorcima krvi C57BL/6 miša. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola a) OGTT krivulja mužjaci b) OGTT krivulja ženke i c) AUC područje ispod krivulje. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ±standardna devijacija. Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ).

Utvrđena je statistički značajna razlika između AL i K ( $P < 0,0001$ ), AL i ECT ( $P = 0,0019$ ), AL+ECT i AL ( $P = 0,0101$ ) (Slika 65 a-b).

Statistički značajna razlika pokazana je između kontrolne skupine i aloksanske ( $P < 0,0001$ ), zatim između normoglikemijske skupine koja je tretirana sa ECT i hiperglikemijske ( $P = 0,0019$ ) te između hiperglikemijske i hiperglikemijske koja je tretirana sa ECT ( $P = 0,0101$ ).

Najveća površina ispod krivulje (AUC) za aloksansku skupinu, što slijedi i slika a) gdje hiperglikemijskoj skupini prema krivulji treba najdulje vrijeme za iskorištenje glukoze u stanice, odnosno za uspostavu homeostaze glukoze, dok se ostale skupine "oporavljaju" brže.



**Slika 65. a-b** OGTT peti dan tretmana, u uzorcima krvi C57BL/6 miša. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka).

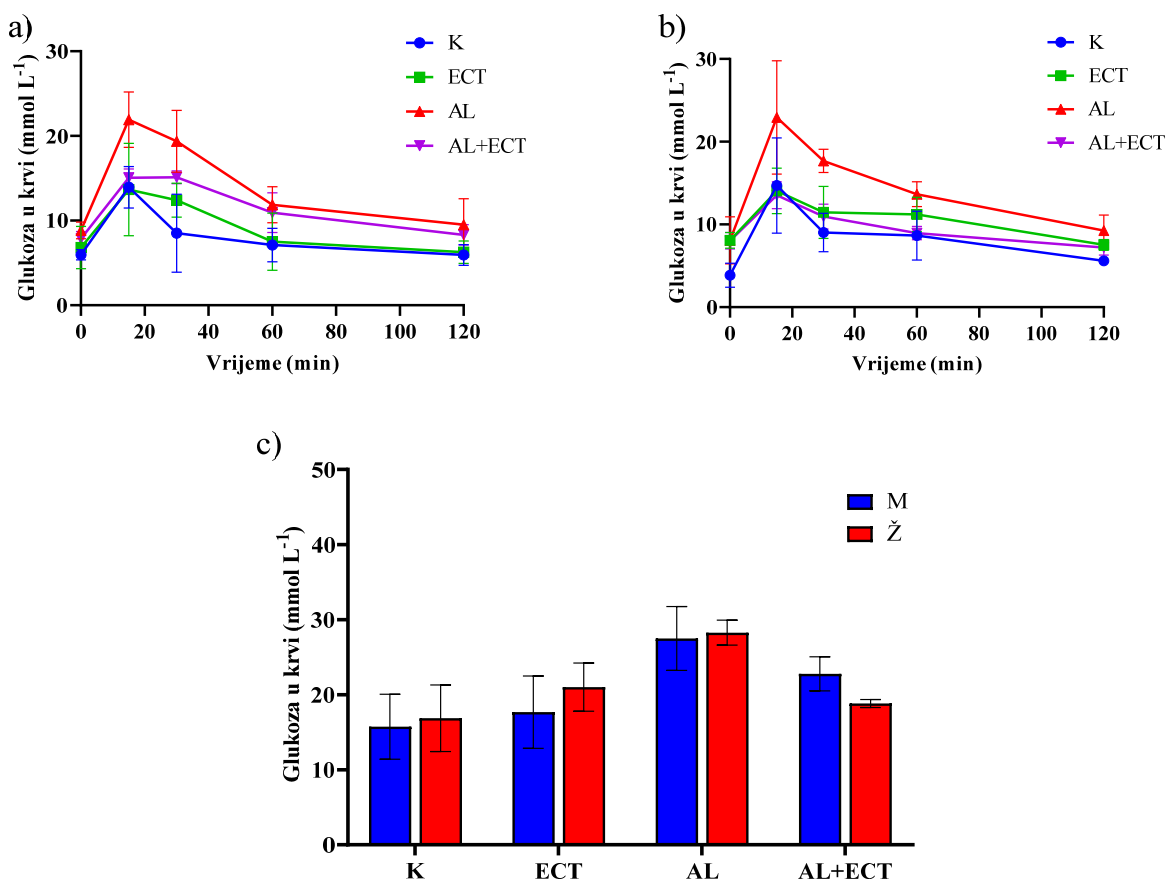
Rezultati su prikazani za oba spola a) OGTT krivulja i b) AUC područje ispod krivulje.

K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ±standardna devijacija.

Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki.

Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su P vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ). Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom P vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

Na Slici 66 (a-c) za mužjake i za ženke pokazano je da kombinirani tretman AL+ECT poboljšava homeostazu glukoze i smanjuje GUK te dovodi do brže uspostave homeostaze, u usporedbi sa AL skupinom (a i b). Za peti dan tretmana OGTT utvrđeno je da nema statističke značajnosti između spolova (c).



**Slika 66. a-c** OGTT peti dan u uzorcima krvi C57BL/6 miša. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka).

Rezultati su prikazani za oba spola a) OGTT krivulja mužjaci b) OGTT krivulja ženke i c) AUC područje ispod krivulje.

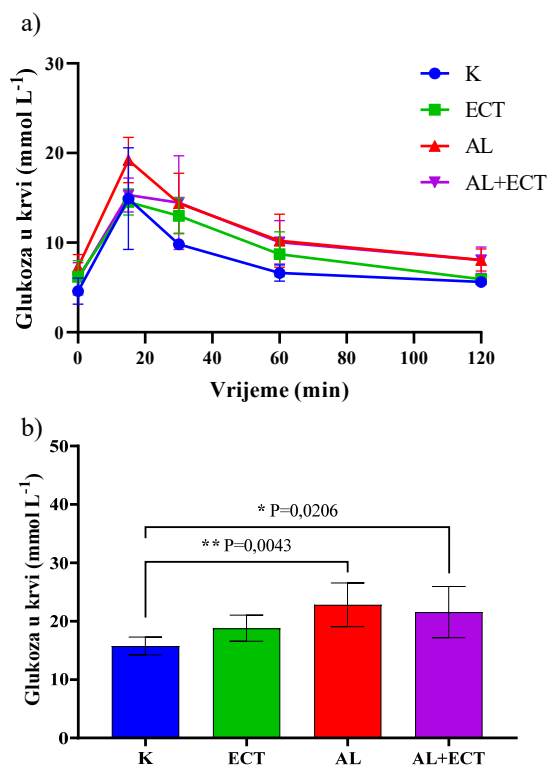
K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ±standardna devijacija.

Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ).

Utvrđena je statistički značajna razlika između AL i K ( $P=0,0043$ ) i AL+ECT i K ( $P=0,0206$ ) (Slika 67 a-b). Također je najmanja statistička značajnost među skupinama u odnosu na ostale dane. Najveću površinu ispod krivulje (AUC) ima hiperglikemijska grupa, no ne značajno veću od hiperglikemijske koja je tretirana sa ECT, kao što je bio slučaj u 5. danu.



U odnosu na 5. dan, primjećena je tendencija brže uspostave homeostaze glukoze što se vidi iz strmijega pada krivulje i manjih površina ispod krivulje (AUC), što ukazuje na mogući hipoglikemijski učinak polifenolnih spojeva iz ekstrakta cvijeta trnine.



**Slika 67. a-b** OGTT deseti dan tretmana, u uzorcima krvi C57BL/6 miša. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka).

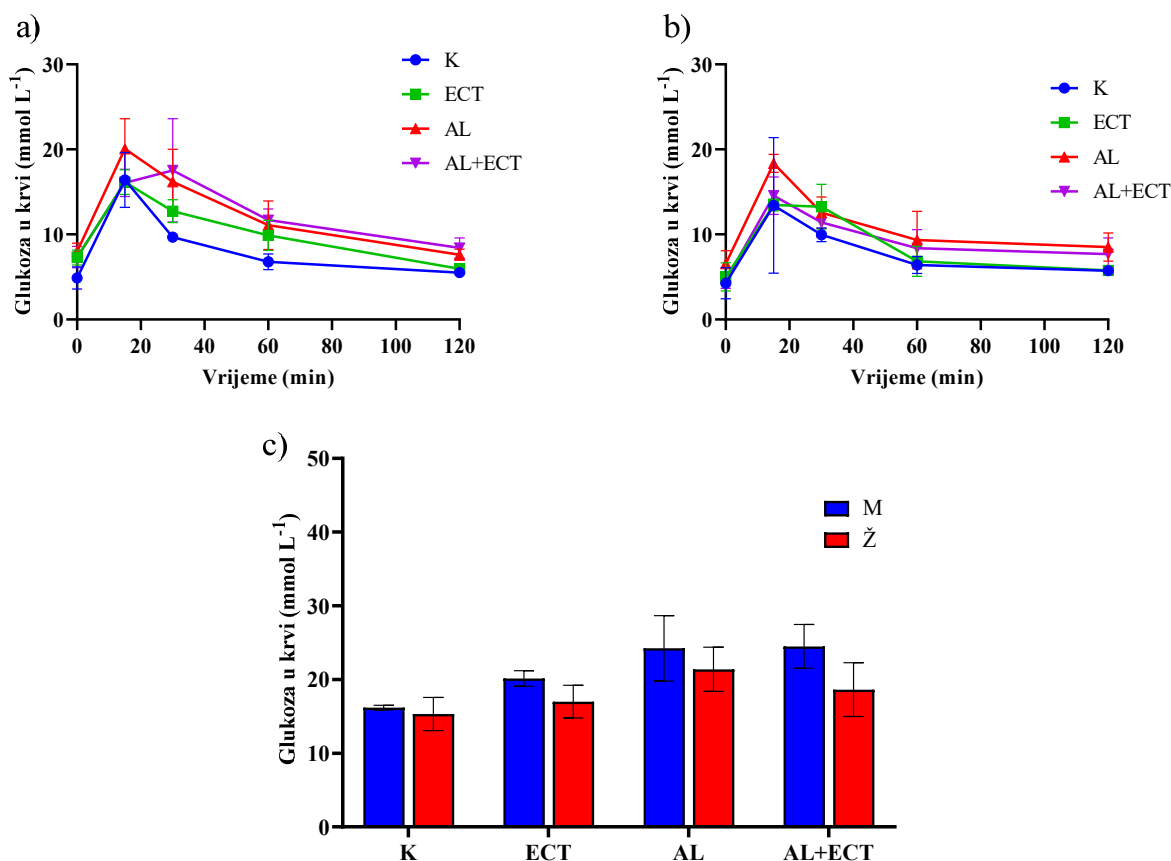
Rezultati su prikazani za oba spola a) OGTT krivulja b) AUC područje ispod krivulje.

K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ±standardna devijacija. Svaka skupina prikazuje zajedno vrijednosti muških i ženskih jedinki.

Razlike između skupina prikazane su linijama iznad kojih su P vrijednosti statističke analize metodom Kruskal Wallis ANOVA sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ).

Skupine koje međusobno nisu povezane linijama i pripadajućom P vrijednosti nisu međusobno statistički značajno različite.

Na Slici 68 (a-c) za mužjake i za ženke pokazano je da kombinirani tretman AL+ECT poboljšava homeostazu glukoze i smanjuje GUK te dovodi do brže uspostave homeostaze, u usporedbi sa AL skupinom (a i b). Za deseti dan tretmana OGTT utvrđeno je da nema statističke značajnosti između spolova (c).



**Slika 68. a-c** OGTT deseti dan u uzorcima krvi C57BL/6 miša. Životinje su tretirane intragastričnom sondom sa ECT u dozi 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup>. Broj životinja po skupini (n=16, 8 ženki i 8 mužjaka). Rezultati su prikazani za oba spola a) OGTT krivulja mužjaci b) OGTT krivulja ženke i c) AUC područje ispod krivulje. K-kontrola, ECT-ekstrakt cvijeta trnine (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL-aloksan monohidrat (150 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase), AL+ECT (25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase). Stupci prikazuju srednju vrijednost ±standardna devijacija. Razlike između spolova prikazane su linijama statističke analize metodom t-test unutar pokusne skupine između spolova sa razinom statističke značajnosti ( $P \leq 0,05$ ).

## 5. RASPRAVA

Ovo znanstveno istraživanje provedeno je u dva dijela. U prvom dijelu određena je biodostupnost polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) unešenog intragastičnim putem, u jetri i bubrezima, normoglikemijskog i hiperglikemijskog C57BL/6 miša. Biodostupnost polifenola u organima miša određena je pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti povezane sa spektrom masa (UPLC-MS/MS). Istražen je *in vivo* učinak polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine (ECT) na vrijednosti biljega oksidacijskog stresa: lipidna peroksidacija – malondialdehid (MDA) te napredni oksidirani proteinski proizvodi (AOPP) i enzimske aktivnosti: glutation (GSH), superoksid dismutaza (SOD) te katalaza (CAT).

U drugom dijelu istraživanja određeni su glikemijski parametri: glukoza u krvi (GUK), inzulin u serumu,  $\alpha$ -amilaza u serumu i jetri te oralni glukoza tolerans test (OGTT).

### 5.1. BIODOSTUPNOST POLIFENOLA IZ EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE U TKIVIMA JETRE I BUBREGA C57BL/6 MIŠA

Najviše dostupnih podataka u znanstvenoj literaturi o biodostupnosti polifenola postoji o biodostupnosti kvercetina i katehina. Studije o apsorpciji, metabolizmu i biodostupnosti polifenola iz biljaka i biljnih ekstrakata provedene su na *in vitro* modelima ali i na *in vivo* animalnim modelima.

Do sada je potvrđeno da je redovita konzumacija namirnica bogatih polifenolima obrnuto proporcionalna riziku od oboljenja povezanih sa oksidacijskim stresom, kao što su kardiovaskularne bolesti i hiperglikemija. Međutim, mnogo je čimbenika o kojima ovisi biodostupnost polifenola, a neki od njih su fiziološko stanje organizma, metabolizam i doza koja je primijenjena i o formi u kojoj se polifenoli nalaze (Shahidi i Peng, 2018).

Za polifenole je u ranijim istraživanjima potvrđeno da imaju ulogu "hvatača" slobodnih radikala, što je glavna uloga antioksidanasa u zaštiti od oksidacijskog stresa i njegovih posljedica. U posljednjem desetljeću sve je jasnija kompleksna uloga polifenola (Masella i sur., 2005; D'Archivio i sur., 2008; Romier i sur., 2009).

Premda određena biomolekula može imati jaka antioksidativna svojstva ili druge biološke učinke *in vitro*, vrlo će malu biološku aktivnost pokazati *in vivo* ako ista ne iskaže svoj učinak u tkivima. Vrlo često polifenoli koji su najčešće prisutni u hrani ili ekstraktima, nisu i oni koji imaju najbolju biodostupnost te je potrebno poznavati oba podatka. Važno je znati koliko je od unijete količine polifenola stiglo do nekog tkiva organa kako bi se iskazao njegov biološki učinak (D'Archivio i sur., 2010).

Polifenoli iz hrane se uglavnom slabo apsorbiraju te njihova apsorpcija ovisi o stupnju polimerizacije, glikolizacije, polarnosti kao i međureakcijama sa drugim nutrijentima (D'Archivio i sur., 2010).

Do sada provedena *in vivo* istraživanja, ukazuju da se flavonoidni glukozidi apsorbiraju učinkovitije od njihovih aglikona, što objašnjava više teorija (Hollman i Arts, 2000; Morand i sur., 2000; Petersen i sur., 2016). Flavonoidni glikozidi su slabo lipofilni, stoga ne mogu pasivno difundirati kroz biološke membrane kao što to mogu aglikoni koji su hidrofobni. Prvo objašnjenje uključuje membranski prijenosnik SGLT-1, koji prenosi glukozide u lumen enterocita gdje su oni supstrati za citosolnu-glukozidazu (CBG) široke specifičnosti (Guo i Bruno, 2015). Drugo objašnjenje uključuje laktaza-florizin hidrolazu (LPH) smještenu na membrani enterocita koja ima aktivno mjesto vezanja okrenuto prema lumenu crijeva. LPH otpušta aglikone koji zatim pasivno difundiraju preko membrane (Day i sur., 2003; Arts i Hollman, 2005). Glikolizirani polifenoli imaju bolju mogućnost prolaska kroz sloj crijevne sluzi, nakon čega se deglikoliziraju na površini stanica što dovodi do bolje apsorpcije (Béduneau i sur., 2014).

Prema Đikić i sur. (2018) u plazmi C57BL/6 miša tretiranog sa ekstraktom cvijeta trnine (ECT) (24h tretman), UPLC-MS/MS metodom detektirano je 17 polifenola od ukupno 32 prisutna u ECT (53,1%), prethodno detektirana također UPLC-MS/MS metodom. Od tih 17 polifenola u tretiranim skupinama, samo 10 je pokazalo statistički značajnu razliku ( $P \leq 0,05$ ) u odnosu na kontrolu. Glavne skupine koje su detektirane bile su fenolne kiseline, flavan-3-oli, kampferoli, kvercetini te apigenin i luteolin. Od navedenih polifenola, fenolne kiseline se najbolje apsorbiraju. Od fenolnih kiselina, kafeinska kiselina i p-kumarinska bile su prisutne u plazmi 3 sata nakon unošenja ECT u organizam. Nakon fenolnih kiselina pokazano je da se kampferol i njegovi derivati dobro apsorbiraju. Iz skupine flavan-3-ola, (+)-katehin i (-)-epigalokatehin-3-galat premda su detektirani u plazmi, nemaju statistički značajno veću koncentraciju nego u kontrolnoj skupini koja nije tretirana sa ECT. Od 7 različitih kvercetina prisutnih u ekstraktu cvijeta trnine, samo su 4 detektirana u plazmi.

Nijedan od detektiranih polifenola nije se zadržao dulje od 6 sati u plazmi životinja koje su primale ekstrakt cvijeta trnine, a 5 od 11 ih je detekirano unutar 3 sata od tretmana ekstraktom cvijeta trnine. Maksimalne koncentracije apsorbiranih polifenolnih komponenti nisu prelazile  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , što ukazuje na relativno nisku biodostupnost. Slične rezultate potvrđuju Terao (2017) te Teng i Chen (2019). Rezultati ukazuju na to se najbolje apsorbiraju fenolne kiseline, nakon njih flavonoli (kampferol i kvercetin, apigenin i luteolin), dok se flavan-3-oli (katehini) se vrlo slabo apsorbiraju.

Obzirom na naše dobivene rezultate i usporedbu sa literaturom, zaključuje se da su vrlo male koncentracije posljedica niže inicijalne koncentracije katehina u ekstraktu cvijeta trnine, u usporedbi recimo sa ekstraktom čaja koji se smatra prirodnim izvorom katehina.

Nakon što se apsorbiraju, katehini prolaze procese glukuronidacije, sulfatacije i metilacije. Takvi metabolički procesi su katalizirani različitim enzimima poput UDP-glukuronizil transferaze (UGT), katehol-o-metiltransferaze (COMT) i citosolne sulfotranferaze (SULT). Jetra je primarni organ biotransformacija. Međutim, glukuronidacija i sulfatacija također se događaju i u drugim tkivima (bubreg). Osim toga, (-)-epikatehin se brzo razgrađuje i metabolizira u galoil epikatehin, epikatehin galat u enterocitima ili hepatocitima (Ganguly i sur., 2016; Teng i Chen, 2019).

Razlog za nisku koncentraciju flavan-3-ola u plazmi može biti i u tome što često tvore makromolekule zajedno sa proteinima i polisaharidima što može biti razlogom niske biodostupnosti u plazmi (rezultati na temelju unosa ekstrakta cvijeta trnine). Literaturni podaci navode da je biodostupnost polifenola mnogo niža nego drugih biomolekula, premda je njihova konzumacija viša i usporediva sa konzumacijom vitamina u hrani. Istraživači su zaključili da polifenoli u višim koncentracijama mogu imati čak i neke štetne učinke, zbog čega je njihova apsorpcija ograničena (Terao, 2017).

Polifenoli koji imaju visok stupanj polimerizacije, ne mogu biti apsorbirani u tankom crijevu, nego odlaze u debelo crijevo gdje podliježu modifikaciji crijevnom mikrobiotom. Mikrobiom svojim djelovanjem formira polifenole male molekulske mase koji onda mogu ući u jetru gdje prolaze konjugaciju i vraćaju se u krvotok. Polifenoli koji prolaze fazu II metabolizma, u jetri i putem mikrobioma dospijevaju u krvotok, a putem krvotoka u druge organe i tkiva te se kasnije izlučuju putem urina. Polifenoli koji su ušli u krvotok odlaze u fazu lučenja ili bioakumulacije kroz organe što uglavnom traje do 2 sata nakon akutne doze. Vrijeme do izlučivanja iz plazme je uglavnom između 3 i 6 sati, što može ukazivati na dobru sustavnu biodostupnost u organima, kao i na brz metabolizam i sustave eliminacije.

Da bi se utvrdio točan razlog potrebno je daljnje praćenje koncentracija u različitim organima (tanko crijevo, jetra, bubreg i mozak). Biodostupnost polifenola *in vivo* pokazala se mnogo nižom nego u *in vitro* istraživanjima, što je glavni razlog ograničenosti u terapijskom pristupu polifenolima. Niska biodostupnost polifenola uglavnom je posljedica faze II metabolizma, reakcije katalizirane enzimima (glukuroniltransferaze, sulfotransferaze i drugi) pomoću kojih nastaju visoko hidrofilni konjugati, koji se lagano izlučuju iz tijela.

Prema dobivenim rezultatima u ovom istraživanju očekivano najveća koncentracija polifenola bila je u normoglikemijskoj skupini koja je dobivala ekstrakt cvijeta trnine (ECT), kao i u kontrolnoj skupini gdje su polifenolni spojevi bili prirodno prisutni u hrani za glodavce. Primijećeno je blago povećanje koncentracije polifenola koji su se zadržali u tkivu jetre i bubrega hiperglikemijskog miša tretiranog sa ECT u odnosu na hiperglikemijsku skupinu. Od prvog do desetog dana tretmana vidljiv je vrlo blagi porast koncentracije kao posljedica subkroničnog unosa ECT.

Mnoga su istraživanja ispitivala biodostupnost kvercetina (Heim i sur., 2002; Yoo i sur., 2010; Guo i Bruno, 2015), a najčešće se kvercetin pronalazi u formi glikozida i to kvercetin-3-glikozida ili u formi kvercetin rutinozida. Neki autori su potvrdili da kvercetin-ramnozid i kvercetin-3-rutinozid u odnosu na kvercetin-3-glukozid imaju dulje vrijeme zadržavanja u organizmu i produljeno deglikoliziranje djelovanjem crijevne mikrobiote (Kim i sur., 2008; Lee i sur., 2017). Takav učinak primjećuje se za kampferol-pentozid i kampferol-3-glukozid, a navedeno je potvrđeno u istraživanju Đikić i sur. (2018). Za metabolite kvercetina potvrđeno je da se iz organizma eliminiraju sporo sa vremenom polu-života između 11 i 28 sati, što se produljuje ponavljanim unosom (Manach i sur., 2005).

Katehini se brzo apsorbiraju iz tankoga crijeva. Biodostupnost različitih monomernih katehina je uglavnom slična, ali dimerizacija umanjuje biodostupnost (Hollman, 2004). Katehini se također vrlo brzo eliminiraju iz organizma i rijetko se detektiraju u urinu (Manach i sur., 2005).

Antocijanini se brzo apsorbiraju, ali njihova biodostupnost je najmanja od svih flavnoida (Hollman, 2004). Neka istraživanja koje su se bavile istraživanjem biodostupnosti antocijanina (Rein i sur., 2013; Carbonell-Capella i sur., 2014; Yousuf i sur., 2016; Teng, 2017) potvrđuju njihovu nisku biodostupnost. Antocijanini izlučeni urinom pronađeni su u 0,1% slučajeva u istraživanjima kod ljudi (Ludwig i sur., 2015). U dosadašnjim animalnim istraživanjima biodostupnost antocijanina uglavnom je između 0,26% do 1,8% (Norberto i sur., 2013; Chen i sur., 2015). Biodostupnosti flavan-3-ola se pokazala višom nego ostalih flavonoida. U plazmi se pojavljuju u znatno drugačijim oblicima nego li ishodišno u hrani ili biljnom ekstraktu (Margalef i sur., 2017).

Del Rio i sur. (2013) u svom istraživanju pokazali su da se urinom izluči oko 10% unešenih flavan-3-ola iz ekstrakta zelenog čaja, dok neka druga istraživanja pokazuju da je biodostupnost flavan-3-ola iz zelenog čaja od 2 do 8,1% (Manach i sur., 2005; Stalmach i sur., 2009).

Stalmach i sur. (2009) pokazali su da su u plazmi detektirani flavan-3-oli u formi *o*-metiliranih, sulfatiranih i glukuroniranih konjugata katehina i galokatehina što ukazuje na njihovu apsorpciju u tankom crijevu. Nakon što su se apsorbirali u crijevu, (-)-epikatehini se brzo metaboliziraju u epikatehin galat, epigalokatehin galat i to putem enterocita i hepatocita te se transformacije tih metabolita odvijaju putem UDP-glukuronil transferaze i katehol-O-metiltransferaze (Wang i sur., 2019).

Harada i sur. (1999) pokazali su da (-)-epikatehin ima veću biodostupnost nego li (+)-katehin, što je potvrđeno i ovim istraživanjem, međutim pokazano je da kombinacija oba polifenola uzrokuje kompetitivnu apsorpciju bez razjašnjenog mehanizma djelovanja. Apsorbirani polifenoli iz probavnog sustava koji su se detektirali u plazmi uglavnom su u konjugiranim i metiliranim formama a koji onda imaju mnoge biološke potencijale.

U ovom istraživanju prikazani su polifenolni spojevi iz ECT koji su detektirani u tkivima bubrega i jetre u C57BL/6 normoglikemijskog i hiperglikemijskog miša. U tkivu bubrega i jetre od fenolnih kiselina detektirane su 4-*o*-kafeoilkininska kiselina i 4-*p*-kumaroilkininska kiselina (Slike 12 i 15), od flavan-3-ola katehin (Slike 13 i 16), dok su od flavonola to kvercetin acetilheksozid, kamferol-3-rutinozid, kvercetin-3-rutinozid, kampferol pendozidheksozid, izoramnetin-3-rutinozid, kvercetin pentozid, kvercetin ramnozid, kamferol-3-glukozid, kampferol ramnozid i heksozid te kampferol pentozid. U tkivu jetre od flavonola detektirani svi polifenoli kao u bubregu osim kamferol-3-glukozida (Slike 14 i 17). Preostali polifenoli koji su ishodišno detektirani u ECT bili su ispod razine detekcije.

Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pokazuju da polifenoli iz ekstrakta cvijeta trnine (ECT) poboljšavaju ukupan antioksidacijski kapacitet analiziranih tkiva.

Antioksidacijska djelotvornost polifenola iz ECT praćena je preko enzima oksidacijskog stresa u jetri i bubrezima. Također, istražena je poveznica između biodostupnosti pojedine vrste molekula polifenola s aktivacijom antioksidacijskog sustava obrane u organskim sustavima miša. Ovim istraživanjem utvrđeno je da polifenoli koji su detektirani UPLC-MS/MS metodom u značajnijoj koncentraciji u tkivima jetre i bubrega imaju pozitivan učinak na osnaživanje aktivnosti antioksidacijskih enzima, kao i na poboljšanje glikemije, poboljšanu aktivnost  $\alpha$ -amilaze, inzulina i poboljšane tolerancije prema glukozu. Takav pozitivan učinak

mogao bi se pripisati u prvom redu fenolnim kiselinama, pojaviše 4-0-kafeoilkininskoj i 4-p-kumaroilkininskoj, flavan-3-olima i to katehinima te flavonima, uglavnom glikozidima kampferola i kvercetina.

Biodostupnost je ispitivana u vrlo malo istraživanja, a uglavnom su ispitivanja bila u serumu u usporedbi sa brojem istraživanja koja su ispitivala fiziološki učinak polifenola na tkiva. Istraživanja o biodostupnosti polifenola često ispituju samo jedan polifenolni spoj, a vrlo rijeko biodostupnost kombinirane primjene različitih polifenola (Chen, 2013) kao što je ispitano u ovom istraživanju. Dobiveni rezultati o raspodjeli polifenola u različitim organima mogu biti dobra smjernica za buduća istraživanja prema praktičnoj uporabi ECT.

Dosadašnja istraživanja pokazuju korelaciju između antidijabetičkog i antiradikalnog učinka polifenola na način da hipoglikemijski učinak iz polifenola utječe pozitivno na sposobnost hvatanja slobodnih radikala, to uspješnije što je biodostupnost toga spoja veća (Gajera i Hirpara, 2018).

Subkronični tretman C57BL/6 miša sa ECT, bogat polifenolima, rezultira u poboljšanoj apsorpciji metabolita polifenola u tkivima jetre i bubrega u odnosu na akutnu primjenu ekstrakta, odnosno utvrđena je veća bioakumulacija tih spojeva. Bioakumulacijski potencijal se povećava ponovljenim doziranjem. Mogući mehanizmi djelovanja su vazodilatacijski sa dobrim hemodinamičkim učinkom što poboljšava protok krvi u jetri i bubrezima. Potrebna su daljnja istraživanja biodostupnosti da bi se utvrdio *in vivo* učinak ECT i razumijevanje mehanizma djelovanja. Ovo istraživanje može biti dobra podloga kako provesti buduća istraživanja.

## **5.2. UČINAK POLIFENOLA IZ (ECT) NA VRIJEDNOSTI BILJEGA OKSIDACIJSKOG STRESA I VRIJEDNOSTI ANTIKOSIDACIJSKIH ENZIMA U TKIVIMA BUBREGA I JETRE U C57BL/6 MIŠA**

Posljednjih godina intenzivno se istražuje uloga oksidacijskog stresa u patofiziologiji hiperglikemije kao i njezinih mnogobrojnih komplikacija, a neka istraživanja ukazuju da kronična izloženost povišenim razinama glukoze u krvi i hiperlipidemija dovode do akumulacije slobodnih radikala i oslabljene funkcije antioksidacijskih enzima: superoksid dismutaza (SOD), reducirani glutation (GSH), katalaza (CAT), što je dokazano na humanom i na animalnom modelu (West, 2000; Piwkowska i sur., 2011).



Lipidna peroksidacija je oksidacija polinezasićenih masnih kiselina čiji su rezultat produkti toksični za stanicu, od kojih je najznačajniji malondialdehid (MDA), korišten kao biljeg oksidacijskog stresa (Bukan i sur., 2003).

Tkiva i stanice koje su izložene oksidacijskom stresu brže podliježu lipidnoj peroksidaciji, što je posljedica slabljenja djelovanja antioksidacijskog sustava (Štefan i sur., 2007). Kemijska promjena aminokiselina tijekom lipidne peroksidacije rezultira formiranjem lipooksidacijskih produkata koji su onda mjerljivi biljezi oksidacijskog stresa *in vivo*.

Pojačan oksidacijski stres i posljedično snižen antioksidacijski kapacitet smatraju se važnim faktorima u patogenezi razvoja kronične hiperglikemije. Generiranje slobodnih radikala je povezano sa autooksidacijom glukoze, poremećenim metabolizmom GSH, promjenama na antioksidacijskim enzimima kao i formiranjem produkata lipidne peroksidacije (Al-Numair i sur., 2015).

Do sada objavljena istraživanja o polifenolima koji imaju djelotvornost kao antioksidansi daju brojne dokaze o njihovom pozitivnom zdravstvenom učinku. Učinkovit antioksidans djeluje tako da sprječava nastanak slobodnih radikala, kelira redoks-metale, sinergistički djeluje sa drugim antioksidansima te se dobro apsorbira u organizmu (Valko i sur., 2006). U stanju hiperglikemije može doći do inaktivacije antioksidativnih enzima glikacijom proteina odnosno pojačanim oksidacijskim stresom.

AOPP se koristi kao biljeg oksidacijskih promjena na proteinima koje nastaju u reakcijama kloriranih oksidansa, kao što su kloramini, hipokloritna kiselina, sa proteinima plazme, te su mjerljivi biljezi oksidacijskog stresa u različitim bolestima. Karbonilacija proteina s druge strane podrazumijeva direktnu oksidaciju lizina, arginina, prolina i rezidua treonina ili kroz međureakciju sa ROS-om ili neoksidativne reakcije sa oksidiranim lipidima koji sadrže karbonilnu skupinu u svojoj strukturi (Gryszczyńska i sur., 2017).

Sedlak i sur. (2018) potvrdili su svojim istraživanjem da je razina AOPP u dijabetičnog štakora bila očekivano statistički značajno viša nego u kontrolnoj skupini ( $P < 0,05$ ). U usporedbi AOPP razine u netretiranog dijabetičkog štakora i dijabetičnog štakora tretiranog resveratrolom ( $10 \text{ g kg}^{-1}$  i  $30 \text{ g kg}^{-1}$  tjelesne mase tijekom 4 tjedna) pokazalo se da je u tretiranoj skupini došlo do statistički značajnog smanjenja razine AOPP u odnosu na netretiranu dijabetičnu skupinu ( $P < 0,05$ ;  $P < 0,0001$ ). Što se tiče MDA, koncentracija je bila očekivano viša u dijabetičnih štakora nego u kontrolnoj skupini ( $P < 0,001$ ).

Tretman sa resveratrolom u dijabetičnoj skupini rezultirao je sniženim MDA u usporedbi sa dijabetičkom skupinom koja nije tretirana ( $P < 0,05$ ). Takvi učinci se pripisuju resveratrolu, a podupiru brojne dokaze o djelovanju polifenola na poboljšan antioksidacijski sustav.

Kaczmarczyk-Sedlak i sur. (2019) ispitali su utjecaj kafeinske kiseline na biljege oksidacijskog stresa mjerene u leći i u serumu dijabetičnog štakora. Utvrdili su da su aktivnosti antioksidacijskih enzima SOD, CAT, i GSH bile snižene, dok su biljezi oksidacijskog stresa AOPP i MDA povećani u dijabetičnog štakora. U dijabetičnog štakora tretiranog sa kafeinskom kiselinom povećala se aktivnost SOD, CAT i GSH dok se aktivnost AOPP i MDA snizila. Aktivnost katalaze u dijabetičnog miša viša je nego u nedijabetičnog, međutim nakon tretmana kafeinskom kiselinom, smanjuje se aktivnost katalaze u odnosu na dijabetičkog štakora, ali ne statistički značajno. U dijabetičnog štakora, pokazano je statistički značajno sniženje GSH ( $P < 0,05$ ) u odnosu na ne dijabetičku skupinu. Nakon tretmana dijabetične skupine sa kafeinskom kiselinom, povećala se razina GSH u usporedbi sa dijabetičnom skupinom.

Našim istraživanjem potvrđeno je da se nakon tretmana ECT u hiperglikemijskog miša statistički značajno povećava aktivnost katalaze u tkivu jetre u odnosu na netretiranu hiperglikemijsku skupinu za 44% ( $P = 0,039$ ) (Slika 26) dok u tkivu bubrega to nije statistički značajno ali je primijećeno povećanje (Slika 28). Također, potvrđeno je da polifenoli imaju sposobnost podizanja aktivnosti antioksidacijskih enzima SOD i GSH u tretiranog hiperglikemijskog miša što je u korelaciji sa prethodnim istraživanjima. Za SOD primijećeno je povećanje tretirane hiperglikemijske skupine za 50% u odnosu na netretiranu, u tkivu jetre, dok je u tkivu bubrega to povećanje 70%. U slučaju GSH povećanje je 36% u tkivu jetre i 48% u tkivu bubrega. Ovakvi rezultati mogu se protumačiti kao vrlo dobar učinak polifenola iz ECT na poboljšan rad antioksidacijskih enzima u stanju kronične izloženosti hiperglikemiji.

Što se tiče biljega oksidacijskog stresa, Kaczmarczyk-Sedlak i sur. (2019) utvrdili su da je koncentracija AOPP u serumu dijabetičnog štakora statistički značajno veća u odnosu na ne dijabetičnog štakora ( $P < 0,01$ ), čime se potvrđuje da u stanju dijabetesa intenzivno dolazi do oštećenja proteinske strukture. Suprotno tome, tretman dijabetičnog štakora kafeinskom kiselinom smanjuje razine AOPP u odnosu na dijabetičku kontrolu, što se poklapa i sa rezultatima našeg istraživanja (Slike 18 i 20).

U tretirane hiperglikemijske skupine došlo je do smanjenja AOPP za 33% u tkivima jetre te za 18% u tkivima bubrega što pokazuje oporavak oštećenja proteina na tkivima koji je nastao djelovanjem izloženosti kronično povišenoj glukozi u krvi i oksidativnom stresu. Koncentracija MDA u serumu u dijabetičnog štakora statistički je značajno veća nego u ne dijabetičnog, dok se nakon tretmana kafeinskom kiselinom ta koncentracija smanjila, kao i u našem istraživanju (Slike 22 i 24). U tretirane hiperglikemijske skupine smanjila se koncentracija MDA za 38% u tkivu jetre te za 41% u tkivu bubrega, u odnosu na netretiranu, nakon 10 dana tretmana. Takvi učinci oporavka od oštećenja na proteinima i lipidima mogu se pripisati sinergijskom djelovanju polifenola iz ECT, što ima jači utjecaj nego samo jednog polifenola kao u prethodnom istraživanju koje su proveli Kaczmarczyk-Sedlak i sur. (2019).

Ben Salem i sur. (2017) utvrdili su da etanolni ekstrakt biljke *C. Scolymus* statistički značajno povećava aktivnosti CAT, SOD i GSH a smanjuje MDA i AOPP u tkivu gušterače tretiranog dijabetičnog štakora. Smanjenjem MDA i AOPP može se zaključiti da tretman ekstraktom u dijabetičnoj skupini dovodi do oporavka oštećenja na lipidima i proteinima, a to govori o reverzibilnosti promjena na strukturi. Takvi učinci pripisuju se u najvećoj mjeri kvercetin i apigenin-7-glikozidu. Dijabetes je induciran aloksanom a karakteristično je za njegovo djelovanje da izaziva generaciju ROS-a, što vodi u toksičnost za  $\beta$ -stanice gušterače, redukciju sinteze te otpuštanja i lučenja inzulina. Snižene razine antioksidacijskih enzima kao i povećana lipidne peroksidacija katarakteristične su za aloksanom izazvan dijabetes.

Papandreou i sur. (2011) istraživali su učinak polifenola iz ekstrakta ploda divlje borovnice na oksidacijski status mozga u Balb/C miševima. Rezultati su pokazali da skupina koja je dobivala ekstrakt ploda borovnice rezultira smanjenom koncentracijom MDA te povećanom koncentracijom GSH u tkivu mozga tretiranih miševa, što ukazuje da polifenoli smanjuju oksidacijski stres, a potvrđuje dobivene rezultate ovog istraživanja za 10. dan eksperimenta (Slike 22, 24, 34 i 36).

Kim i sur. (2013) ispitivali su učinak praha brusnice na status antioksidacijskih enzima u C57BL/KsJ-*db/db* miša. Pokazalo se da su aktivnosti SOD, CAT i GSH statistički značajno niže u pretilih dijabetičnih štakora tretiranih sa prahom brusnice u usporedbi sa dijabetičnim koji nisu tretirani. Učinak se pripisuje procijanidinima iz brusnice za koje se smatra da imaju sposobnost hvatati slobodne radikale i time smanjivati oksidacijski stres što se potvrđuje i smanjenjem razine karboniliranih proteina nakon tretmana dijabetične skupine.

Abolfathi i sur. (2012) mjerili su antioksidacijsku aktivnost u jetri putem biljega oksidacijskog stresa. Primijećeno je značajno povećanje razine MDA za dijabetičnu skupinu ( $P < 0,05$ ), dok je u dijabetičnoj skupini koja je primala ekstrakt zelenoga čaja (1,5% w/v) statistički značajno smanjena razina MDA u odnosu na dijabetičnu skupinu ( $P < 0,05$ ). GSH, SOD, CAT razine su u dijabetične skupine značajno pale u usporedbi sa kontrolom ( $P < 0,05$ ), a iste su se povećale u dijabetičkoj skupini koja je primala ekstrakt zelenog čaja u usporedbi sa netretiranom dijabetičkom skupinom ( $P < 0,05$ ).

Wojnar i sur. (2018) ispitivali su utjecaj oralne doze naringenina od 50 i 100 mg kg<sup>-1</sup> u dijabetičnog štakora tijekom 4 tjedna te su mjerili parametre oksidacijskog stresa (karbonilirane proteini, AOPP, MDA) kao i antioksidacijske enzime (SOD, CAT, GPx, GSH) u tkivima leće. U usporedbi sa kontrolnom skupinom, SOD aktivnost je statistički značajno viša u dijabetičnoj skupini. U dijabetičnoj skupini tretiranoj sa naringeninom aktivnost SOD bila je viša nego u kontrolnoj skupini. Isto tako aktivnost katalaze se povećala nakon izazvanog dijabetesa i nakon oralne doze od 50 mg kg<sup>-1</sup>, iako se isto nije potvrdilo za primijenjenu dozu od 100 mg kg<sup>-1</sup>. Samo u skupini koja je primala dozu od 100 mg kg<sup>-1</sup> je primijećeno je smanjenje aktivnosti katalaze, u usporedbi sa netretiranim dijabetičnim štakorima. GSH u dijabetičnih štakora je statistički značajno niža nego u kontrolnoj skupini. Razine AOPP bile su statistički značajno više u dijabetičnih štakora u usporedbi sa kontrolom grupom. Niža doza naringenina rezultirala je sniženjem razine AOPP u tretirane dijabetične skupine, bez statistički značajnih razlika između različitih doza. Statistički značajno povećanje razine MDA zabilježeno je u dijabetičnih štakora. Naringenin u obje doze je reducirao MDA statistički značajno u tretiranoj dijabetičkoj skupini u usporedbi sa netretiranim dijabetičkim štakorima. Nije utvrđena statistički značajna razlika među dozama. Naringenin je prema dosadašnjim istraživanjima dokazan hvatač slobodnih radikala zahvaljujući svojoj strukturi (Hernandez-Aquino i Muriel, 2018). Osim toga naringenin inhibira Fentonovu reakciju (Cheng i Breen, 2000) te neke izoforme protein kinaze C koje su također odgovorne za produkciju ROS-a (Kongpichitchoke i sur., 2015; Qin i sur., 2016). Naši rezultati pokazali su suprotni učinak polifenola na antioksidacijske enzime u odnosu na Wojnar i sur. (2018). Moguće objašnjenje za takav efekt je u tome što različiti tipovi tkiva drugačije odgovaraju na oksidacijski stres uzrokovan kroničnom hiperglikemijom, no ovisi i o drugim čimbenicima kao što su duljina izloženosti oksidacijskom stresu (Wojnar i sur., 2018).

Roy i sur. (2008) ispitivali su učinak tretmana antocijanidinom pelargonidinom na parametre oksidacijskog stresa i glikemiju u dijabetičkih štakora.

Što se tiče glikemijskih parametara, razina glukoze u krvi na tašte u dijabetičnih štakora statistički je značajno viša nego u normoglikemijskog štakora, a tretman pelarogonidinom u dozi od 3 mg kg<sup>-1</sup> reducirao je tijekom prvog tjedna tretmana koncentracije GUK na normalnu razinu te se tako stabilno zadržalo tijekom pet tjedana eksperimenta. Takav učinak pripisuje protektivnom djelovanju pelargonidina na β-stanice gušterače i ojačavanju njihove funkcije, međutim pravi mehanizam nije opisan. Indukcija dijabetesa u štakora izazvala je statistički značajno smanjenje SOD i CAT u usporedbi sa normalnom skupinom ( $P < 0,01$ ). Isto tako u dijabetičnoj skupini evidentno je povećanje MDA produkata lipidne peroksidacije. Dva tjedna nakon tretmana dijabetične skupine pelarogonidinom smanjuje se razina MDA, a povećava koncentracija SOD i CAT u odnosu na dijabetičnu skupinu ( $P < 0,01$ ).

Al-Numair i sur. (2015) ispitivali su utjecaj kampferola u dozi od 100 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase na oksidacijski stres u dijabetičnog štakora, tijekom 45 dana. Aktivnost GSH statistički je značajno reducirana u plazmi dijabetičnog štakora. Tretman sa kampferolom pokazuje povećanu aktivnost GSH u usporedbi sa dijabetičnim štakorom. U istraživanju su pokazali da tretman dijabetičnog štakora kampferolom u dozi 100 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase povećava koncentraciju GSH u plazmi, jetri i bubregu u odnosu na dijabetičnu skupinu koja nije tretirana, što indicira da kampferol potiče biosintezu GSH ili da reducira oksidacijski stres koji dovodi do njegove razgradnje. Očekivano, u dijabetičnoj skupini aktivnost GSH znatno je smanjena u odnosu na kontrolnu, što se objašnjava pretpostavkom da u stanju oksidacijskog stresa dolazi do smanjene sinteze ili povećane razgradnje GSH. Rezultati našeg istraživanja potvrđuju ovu tezu (Slike 34-37). Prema autorima pokazano je da se aktivnost CAT smanjila u dijabetičkih štakora tretiranih kampferolom, što dokazuje na antioksidacijsku sposobnost polifenola. Za SOD pokazano je da je povećana aktivnost ovog antioksidacijskog enzima u tkivima u dijabetičnim štakora pri oralnom tretmanu sa kampferolom u usporedbi sa netretiranom dijabetičnom skupinom, čak na razinu normoglikemijskog štakora, što upućuje na antioksidacijsku sposobnost flavonoida. SOD aktivnost znatno pada u dijabetične skupine u odnosu na kontrolu, što može biti rezultat inaktivacije H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> putem glikacije enzima. Smanjenje CAT aktivnosti u dijabetičnoj skupini u odnosu na kontrolu moglo bi se također pripisati inaktivaciji glikacije enzima. CAT reducira vodikov peroksid i sprječava generaciju slobodnih radikala te na taj način štiti peroksisome od oksidacijskog stresa.

Prema Monavar Feshani i sur. (2011) u dijabetičnih štakora mjerene su vrijednosti biljega oksidacijskog stresa u eritrocitima. SOD, CAT i GPx za dijabetičnu skupinu koja je tretirana sa etanolnim ekstraktom kavkaske borovnice od 400 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase tijekom 21 dan, pokazali su značajno povećanje ( $P<0,0001$ ), ( $P<0,004$ ) i ( $P<0,017$ ) u usporedbi sa dijabetičnom skupinom koja nije tretirana. Za dijabetičnu grupu koja je tretirana ekstraktom borovnice od 200 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase tijekom 21 dan, SOD aktivnost je porasla ( $P<0,0001$ ), dok za CAT i GPx nema statistički značajnog porasta.

Chen i sur. (2018) ispitivali su utjecaj ekstrakta iz zrna crne soje na parametre oksidacijskog stresa u dijabetičkog miša. U skupini netretiranog dijabetičnog miša pokazan je statistički značajan pad aktivnosti SOD, CAT i GPx i porast MDA, u usporedbi sa normalnom kontrolom ( $P<0,01$ ). Nakon tretmana sa ekstraktom iz zrna crne soje, aktivnosti CAT i GPx su se povećale, a koncentracija MDA se snizila ( $P<0,01$ ) u usporedbi sa dijabetičnom skupinom koja nije tretirana ekstraktom. Navedena svojstva pripisuju se polifenolnima identificiranim u ekstraktu: cijanidin-3-O-glikozid, delphinidin-3-O-glikozid i peonidin-3-O-glikozid.

Sheweita i sur. (2016) ispitivali su učinak ekstrakta *Alhagi mourorum* na parametre oksidacijskog stresa, SOD, GPx u dijabetičnog štakora. Određivanjem polifenolnog sastava utvrđeno je da su dominantni flavonoidi galna kiselina i rutin. Razina MDA značajno se povećala u skupini dijabetičnog štakora u usporedbi sa kontrolom ( $P\leq 0,05$ ), dok je aktivnost GSH i SOD u jetri statistički značajno snižena u usporedbi sa kontrolom skupinom ( $P\leq 0,05$ ). Nakon tretmana dijabetične skupine ekstraktom pokazalo se da se statistički značajno smanjuje razina MDA produkata a povećava se aktivnost SOD i GPx u jetri u usporedbi sa netretiranom dijabetičnom skupinom.

Fehresti Sani i sur. (2011) ispitivali su učinak metanolnih ekstrakata *Allium sativum* L. (ASE), *Allium ascalonicuom* L., (AAE) i *Salvia officinalis* L. (SOE) tijekom 21 dana tretmana na antioksidacijske enzime SOD, GPx i CAT u dijabetičnog štakora. Rezultati su pokazali kako tretman dijabetičnog štakora sa ekstraktom ASE dovodi do statistički značajnog povećanja aktivnosti SOD, GPx i CAT u usporedbi sa dijabetičnom netretiranom skupinom (60%  $P<0,0001$ ; 27%  $P<0,001$ ; 63%  $P<0,043$ ). Tretman sa AAE statistički je značajno povećao aktivnost SOD, GPx i CAT u odnosu na dijabetičku netretiranu skupinu (65%  $P<0,0001$ ; 43%  $P<0,0001$ ; 55%  $P<0,0043$ ). Tretman sa SOE statistički je značajno povećao aktivnost SOD i GPx u odnosu na dijabetičku netretiranu skupinu (33%  $P<0,0001$  i 24%  $P<0,0043$ ).

Takvi učinci pripisuju se flavonoidima, glikozidima i fenolnim komponentama koje su odgovorne za antioksidacijski učinak.

U našim prethodnim istraživanjima objavljenim u znanstvenim radovima ispitivan je utjecaj ekstrakta cvijeta trnine na antioksidacijski status u C57BL/6 miša. Balta i sur. (2020) ispitali su utjecaj unosa ECT na antioksidacijski status u tkivu miša tijekom 28 dana u dozi od 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase. U usporedbi sa kontrolnom skupinom, tretman sa ECT statistički je značajno snizio koncentraciju produkata lipidne peroksidacije u tkivima tankog crijeva, jetre i bubrega ( $P < 0,05$ ) nakon 3 tjedna tretmana. Slične rezultate pokazalo je i istraživanje sa ekstraktom biljke *Aronia melanocarpa* kod ljudi sa dijagnozom metaboličkog sindroma. Rezultati tih istraživanja ukazuju na smanjenje koncentracije produkta lipidne peroksidacije pod utjecajem polifenola iz ekstrakta, nakon 8 tjedana tretmana (Broncel i sur., 2010).

Prema Balta i sur. (2020) Aktivnost SOD u tankom crijevu i jetri tretiranih miševa, statistički je značajno povećana u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ) nakon 3 tjedna tretmana, dok je u bubregu taj učinak postignut nakon 28 dana tretmana. Aktivnost katalaze povećala se samo u jetri. Aktivnost GSH nakon tretmana sa ECT u svim tkivima pokazala se višom nego u kontrolnoj skupini, nakon 4 tjedna ( $P < 0,05$ ), izuzev u jetri, nakon 3 tjedna. Jetra je organ sa najvećim utjecajem ECT u antioksidacijskoj obrani dok su bubrezi odgovorni za indukciju antioksidacijskih biljega. Dva su moguća objašnjenja za utjecaj ECT na antioksidacijske enzime kao i biljege oksidacijskog stresa. Prvo, da je snižena lipidna peroksidacija direktna posljedica sposobnosti polifenola kao hvatača slobodnih radikala, a drugo da antioksidacijski učinci mogu biti sinergistički učinci polifenola u produkciji antioksidacijskih enzima (CAT, GSH, SOD). Dakako moguće je i međudjelovanje oba mehanizma. Polifenoli potiču aktivaciju transkripcijskih faktora: Erk-Nrf2-HO1, GCLM i TrxR1 signalnog puta te poboljšavaju antioksidacijske enzime kao što su hem oksigenaza-1, faza II detoksikacije enzima te enzima uključenih u metabolizam GSH (Nardi i sur., 2016; Bao i sur., 2018; Dominko i Đikić, 2018; Dominko i sur., 2020). Ekspresija faze II detoksikacije i gena antioksidacijskih enzima kontrolirani su putem antioksidacijskog odgovora (ARE) koji sadržava gene koji su regulirani sa nuklearnim faktorom eritroid 2-povezani faktor (Nrf2). Nakon aktivacije Nrf-2 disocira iz Keap1 te se prenosi u jezgru kako bi aktivirao prijepis antioksidacijskih gena i gena faze II detoksifikacije kao što su (HO-1, NAD(P)H kinon oksidoreduktaza 1 (NQO1) i glutamat-cistein ligaza modifikator (GCLM). Reducirani GSH može također učinkovito eliminirati ROS.

Već je poznato da polifenoli pojačavaju endogenu antioksidacijsku obranu, eliminaciju ROS-a, redukciju oksidiranog glutationa, razinu reduciranog glutationa i koncentraciju antioksidacijskih enzima. Mnogim istraživanjima je utvrđen utjecaj biljnih ekstrakata na modulaciju ekspresije glutamat-cistein ligaze (GCL) koja se sastoji od katalitičke (GCLC) i modificirajuće (GCLM) podjedinice, što je ograničavajući faktor brzine enzima za sintezu GSH. Drugi mogući mehanizam utjecaja odnosi se na neutralizaciju ROS-a te inhibiciju aktivacije nuklearnih transkripcijskih čimbenika NB- $\kappa$  B signalnih puteva. U ovoj studiji aktivacija SOD, CAT i GSH u skupinama koje su tretirane sa ECT bila je specifična za tkiva. U svim organima povećan je SOD međutim za različito vrijeme eksperimenta. Takvo povećanje primijećeno je u bubregu za 28 dan, dok je u jetri to blago povećanje primijećeno već za 14-ti dan a statistički značajno povećanje za 21 i 28 dan. Aktivacija SOD, CAT i GSH u skupini koja je tretirana sa ECT bila je specifična u tkivima organa.

Prema Balta i sur. (2020) u jetri su akumulirani i detektirani ferulinska kiselina i kvercetin 3-O-rutinozid a u bubrezima kvercetin 3-O-rutinozid, ferulinska kiselina i 4-O-p-kumarokininska kiselina te se smatraju "odgovornima" za antioksidacijski učinak iz ekstrakta cvijeta trnine. *In vivo* istraživanja govore u prilog tome da su polifenoli apsorbirani u većoj količini nakon dugotrajnijeg unosa te mogu doprinijeti povećanju antioksidacijskog kapaciteta plazme (Teng i Chen 2019), što je potvrđeno studijom Balta i sur., (2020), kao i u ovom istraživanju i to već nakon 10 dana tretmana.

Yin i sur. (2018) ispitivali su hipoglikemijski utjecaj ekstrakta kore hrasta u dozi od 200 i 800 mg kg<sup>-1</sup> tijekom 15 dana u dijabetičnog štakora. Mjerene su razine MDA, GSH i SOD u tkivima slezene, jetre i bubrega. Primijećena je značajno povećanje GSH u dijabetične skupine, međutim samo u jetri i slezeni statistički značajno ( $P < 0,05$ ). Nakon tretmana sa ekstraktom u dijabetičnoj skupini došlo je do smanjenja aktivnosti GSH u odnosu na netretiranu dijabetičnu skupinu u svim tkivima organa, a najviše u tkivima srca i jetre. Kao mogući uzrok tome navodi se činjenica da je redukcija GSH u dijabetičnih štakora rezultat smanjene sinteze ili povećane degradacije GSH uzrokovano oksidacijskim stresom u stanju dijabetesa. Nakon tretmana sa ekstraktom, došlo je do smanjenja MDA u usporedbi sa netretiranom dijabetičnom skupinom, što se pripisuje flavonoidima iz ekstrakta: elaginska kiselina, kampferol te njihovi derivati. Koncentracija SOD u dijabetičnih štakora statistički je značajno snižena u svim tkivima organa, dok je nakon tretmana ekstraktom u dijabetičnoj skupini statistički značajno povećala aktivnost SOD u usporedbi sa dijabetičkim štakorom.



U tkivima srca, slezene i bubrega se dovelo na razine kako je u normalnog štakora, dok se u tkivima jetre pokazala veća aktivnost SOD nego u normalnog štakora što govori u prilog blagotvornom učinku ekstrakta kore hrasta na oporavak antioksidacijskih enzima u kroničnoj izloženosti organizma hiperglikemiji. Naši rezultati razlikuju se od ovih, tretman hiperglikemijskog miša sa ECT doprinijelo je smanjenju razine SOD u usporedbi sa hiperglikemijskim mišem, međutim, nije iskazao takav učinak da koncentracija SOD bude statistički značajno viša u usporedbi sa normoglikemijskim mišem (Slika 30-33).

### **5.3. UČINAK NA GLIKEMIJSKE PARAMETRE**

#### **5.3.1. Učinak polifenola iz ECT na koncentraciju glukoze u krvi (GUK)**

Ekstrakt cvijeta trnine (ECT) sadrži značajnu količinu ugljikohidrata (Slika 38). Udio monosaharida u ECT je 96% dok je disaharida samo 3,8%. Ovakav sastav ekstrakta cvijeta trnine ima utjecaj na povećanu razinu izmjerene glukoze u krvi u normoglikemijske skupine neposredno nakon tretmana sa ECT, nakon 24 sata, a u odnosu na kontrolu (Slika 39).

Mnogo je radova koji su se bavili sa utjecajem biljnih ekstrakata na razinu glukoze u krvi (Mnafgui i sur., 2016; Tourkey i sur., 2016; Ben Salem i sur., 2017). Tourkey i sur. (2016), pokazali su značajno veće razine glukoze u krvi u normoglikemijskog miša tretiranog sa vodenim ekstraktom *Moringa olifera*. Objašnjenje za taj kratkotrajni porast GUK kao i u našem istraživanju (Slike 39 i 41) mogao bi biti u ukupnom sadržaju šećera koji su vezani na ECT. Međutim Tourkey i sur., taj fenomen nisu razjasnili, već je samo primijećen. Objašnjenje također nije pronađeno u do sada objavljenoj literaturi.

Analiza šećera HPLC-om pokazala je da ECT sadrži visok udio jednostavnih šećera, monosaharida, oko 96% od ukupnih šećera što podupire teoriju o naglom ali kratkotrajnom porastu GUK nakon konzumacije ECT u normoglikemijskog skupini, no i dalje je taj porast za prvi i peti dan niži nego u skupini koja je imala izazvanu hiperglikemiju (Slike 39 i 41). Dakle izmjereni porast razine GUK nakon tretmana sa ECT u normoglikemijskoj skupini je 31% u odnosu na kontrolnu skupinu te je statistički značajan ( $P=0,0406$ ) međutim svakako nedovoljan da se manifestira kao hiperglikemija. Metabolički karakteristika je hrane i pića koje sadržavaju ugljikohidrate da nakon konzumacije izazovu učinak takozvane postprandijalne hiperglikemije. Glukoza koja se oslobodi se apsorbira crijevnim enterocitima kroz četkastu membranu, a onda iz enterocita kroz bazolateralnu membranu prolazi u krv pomoću specifičnih prijenosnika (Crozier i sur., 2009).

Na strani intestinalnog lumena nalazi se aktivni prijenosnik SGLT1. Kada je u tijeku prijenos glukoze u enterocite, vežu se 2 iona  $\text{Na}^+$  na SGLT1 a pri tome se mijenja konfiguracija prijenosnika što omogućuje prijenos glukoze. Natrij i glukoza ulaze u enterocite i tada slijedi transport glukoze iz enterocita u krv pomoću glukoznog prijenosnika 2 (GLUT2) (Hanhineva i sur., 2010). Brza apsorpcija glukoze aktivira mehanizme uspostavljanja homeostaze glukoze.

Dosadašnja istraživanja govore u smjeru da je SGLT1 povećan u životinja i ljudi u stanju hiperglikemije (Kim, 2012). Primijećeno je da osim mjerljivih šećera koji su detektirani u ekstraktu cvijeta trnine HPLC metodom (Slika 38), prisutni su i šećeri koji su u formi glikozida vezani na polifenole koji mogu imati utjecaj na porast glukoze u krvi. Eksperimentalno je dokazano da unatoč početnom djelovanju na povišenje GUK, dugoročno ECT ima učinak na brže i uspješnije uspostavljanje homeostaze i metabolizma glukoze, što je vidljivo iz AL+ECT skupine u usporedbi sa AL skupinom, sa smanjenjem GUK u tretiranoj skupini za 29% nakon 10 dana tretmana, što je statistički značajno ( $P=0,0014$ ) (Slika 43). Furman i sur. (2020) dali su pregled istraživanja na biljnim ekstraktima koji su pokazali sličan hipoglikemijski učinak u dijabetičnih glodavaca (*Pycnanthus angolensis* koja je bogata terpenoidima, *Phyllanthus sellowianus* bogata flavonoidima, *Gentiana olivieri* bogata flavonima i *Cinnamomum zeylanicum* bogata cinamaldehydom). Većina istraživanja koristi biljne ekstrakte koji pokazuju antihiperglikemijske učinke kroz različite mehanizme, što može uključivati snižavanje GUK, inhibiciju razgradnje složenih ugljikohidrata, inhibiciju glukoneogeneze u jetri, stimulaciju perifernog iskorištenja glukoze, modulaciju crijevne mikrobiote, antioksidacijski učinak i stimaciju glukagonu sličan peptid 1 (GLP-1) (Hanhineva i sur., 2010; Furman i sur., 2020; Governa i sur., 2018). Takvi učinci pripisuju se polifenolima prisutnima u biljakama. Poznato je i ranije spomenuto da je cvijet trnine bogat izvor flavonoida, derivata flavona: kampferola, kvercetina, i njihovih glikozida sa arabinozom, ramnozom, ksilozom (Veličković i sur., 2014). U ekstraktu cvijeta trnine detektirani su uglavnom polifenoli kampferol i kvercetin kao glikolizirani (Olszewska i sur., 2001).

U korištenom ECT je određeno 28 polifenolnih komponenti metodom UPLC-MS/MS (Elez Garofulić i sur., 2018). Dominantni su flavonol glikozidi a posebno kvercetin i kampferol u formi kaempferol ramnozil-heksozid, kvercetin-pentozil-heksozid, kaempferol-pentozil-heksozid, kaempferol-pentozid, kvercetin-ramnozil, kampferol ramnozil, kvercetin acetilheksozid, kampferol acetilheksozid. U prethodnim istraživanjima prisutnost glikozida iz ECT detektirana je UPLS-MS/MS metodom u plazmi miša (Đikić i sur., 2018) i organima jetri i bubregu miša (Balta i sur., 2020).

Osim dugoročnog učinka ECT na GUK vrlo je važan kratkotrajni učinak nakon konzumacije glukozne otopine, odnosno dinamika apsorpcije glukoze koja se mjeri OGTT testom, kako bi se pratila homeostazu glukoze, unos glukoze u periferna tkiva te apsorpciju glukoze tijekom 120 minuta. Dugoročno gledajući u regulaciji hiperglikemije, tretman hiperglikemijskog miša sa ECT smanjio je razine GUK na tašte kao i postprandijalnu GUK.

Hiperglikemija u animalnim modelima izaziva se prisilno stvorenim toksičnim uvjetima pri čemu dolazi do uništenja  $\beta$ -stanica gušterače i posljedično do inzulinske deficijencije. Prirodno prisutni kvercetin i kampferol kao i drugi polifenoli, pokazali su da imaju protuupalno, antioksidacijsko, antihipertenzivno, antikancerogeno, antivirusno, neuroprotektivno, hepatoprotektivno i antihiperglikemijsko djelovanje (Ola i sur., 2016; Hoseini i sur., 2019; Komorowska i sur., 2020). Dosadašnja istraživanja na dijabetičnim glodavcima pokazale su da tretman kvercetinom i resveratrolom u sinergiji snižava glukozu u krvi značajnije nego li tretman pojedinačnom komponentom, samo kvercetinom ili samo resveratrolom. Obzirom na dokazanu prisutnost kvercetina i kampferola u ECT, njima najvećim dijelom i moguće njihovom sinergističkom djelovanju pripisujemo hipoglikemijske učinke dokazane ovim istraživanjem.

Varshney i sur. (2019) su pokazali u *in vivo* studiji da flavonoidi kvercetin, rutin, miricetin i kampferol aplicirani u dozi od 25 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase dan<sup>-1</sup> značajno povećavaju inzulinsku osjetljivost u dijabetičkog miša te snižavaju GUK na tašte. Pokazalo se da od navedenih polifenola kampferol iskazuje najveći učinak na uspostavu homeostaze glukoze (prikazano preko OGTT testa) te inzulinsku osjetljivost. U brojnim istraživanjima se pokazalo da antocijanini imaju sposobnost redukcije apsorpcije glukoze putem GLUT2 i putem SGLT1 kako sugeriraju istraživanja (Kamiloglu i sur., 2015; Castro-Acosta i sur., 2016; Moser i sur., 2016). Također istraživanja dokazuju da antocijanini iz ekstrakta zrna crne soje poboljšavaju glikemiju i inzulinsku osjetljivost u dijabetičnog miša a povezano sa proteinskom kinazom aktivirano sa AMP-om (AMPK) (Kurimoto i sur., 2013). Aktivacija AMPK u skeletnim mišićima i jetri praćena je sa regulacijom GLUT4 u skeletnim mišićima i regulacijom glukoneogeneze u jetri. Xing i sur. (2018) pokazali su da je povećana inzulinska osjetljivost kao i pojačana AMPK fosforilacija u bijelom adipoznom tkivu pretilih miševa nakon dodatka 5% praha maline tijekom 12 tjedana pokusa. Slično kako djeluju antocijanini, djeluju i flavan-3-oli antihiperglikemijski putem različitih mehanizama.

Dodatak ekstrakta kakaa u prehrani miša omogućila je premještanje GLUT4 te povećao aktivaciju AMPK u adipoznom tkivu te skeletnom mišićju, reducirao GUK te poboljšao toleranciju glukoze i deponiranje masti (Yamashita i sur., 2012).

Alkhalidy i sur. (2018) su utvrdili da je nakon 4 tjedna uzimanja kampferola došlo do redukcije GUK-a te se poboljšala inzulinska osjetljivost u C57BL/6 miša. Također je pokazano da kampferol smanjuje glukoneogenezu u jetri. Furman i sur. (2020) utvrdili su antihiperглиkemijski učinak kafeinske kiseline u dijabetičkog miša, dosegnut putem redukcije glukoze u krvi i povećanja inzulina u plazmi. Chukwuma i sur. (2019) su utvrdili *in vivo* istraživanjem da kombinirano djelovanje klorogenske i kafeinske kiseline poboljšava toleranciju glukoze kao i tretman sa biljnim ekstraktima koji u jednakim količinama sadržavaju obje fenolne kiseline, što ukazuje na njihovo sinergističko djelovanje. Zajedničko djelovanje polifenola koji se nalaze prirodno prisutni u ECT (Tablica 4) može biti pojačavati dobar učinak na glikemiju. Također, u ovom istraživanju značajan hipoglikemijski učinak primjećen je već nakon 10 dana tretmana, što je kraće u odnosu na gore navedena istraživanja.

Prema Azuma i sur. (2007) u eksperimentu sa dijabetičnim štakorima koji su bili tretirani prahom luka (6%) i ekstraktom kvercetin dihidrata 0,026% (0,026% aglikona kvercetina) vrijednosti glukoze u plazmi, postprandijalno u dijabetičnoj kontroli, statistički je značajno viša nego u kontroli ( $P < 0,05$ ), dok se kod dijabetične skupine tretirane prahom luka statistički značajno snizila glukoza u krvi ( $P < 0,005$ ), naspram dijabetične skupine hranjene ekstraktom kvercetina gdje je neznatno sniženje glukoze u krvi, nedovoljno da bude statistički značajno. Ispitao se i utjecaj unosa kvercetina na aktivnost GPx u tkivu jetre te je dokazano da se GPx u dijabetične skupine smanjuje u odnosu na kontrolnu, jednako nakon unosa praha luka kao i ekstrakta kvercetin aglikona. Autori su zaključili da kvercetin glikozidi kao i njihovi metaboliti iz praha luka imaju isti ili veći učinak kao i unos ekstrakta koji sadržava kvercetin aglikon u dijabetičnog miša.

Mnafgui i sur. (2016) pokazali su da je tretman sa 200 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase ekstrakta lista biljke *Z.album* kroz mjesec dana utjecao na snižene razine glukoze u krvi za 61% u ekstraktom tretiranog dijabetičnog štakora (aloksanski model) u odnosu na dijabetičnog koji nije tretiran ekstraktom. Antihiperглиkemijski učinak pripisuju najviše sinergističkom djelovanju monoterpenskih fenola (karvakolu i eugenolu) koji su identificirani kao dominantni u biljci.

Dong Kwon Yang i Hyung-Sub Kang (2018) istražili su da kombinirana primjena kvercetina i resveratrola u dijabetičnog štakora poboljšava aktivnost enzima uključenih u metabolizam glukoze i strukturu  $\beta$ -stanica gušterače te značajno snižava razine glukoze u krvi.

Tafaesse i sur. (2017) ispitali su učinak tretmana sa 70% etanolnim ekstraktom *A.remote*, te vodenim ekstraktom *A.remote* jednom dnevno, tijekom 14 dana, u dozama 200 i 500 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase u dijabetičnog miša, na razine glukoze u krvi te OGTT testa. Rezultati istraživanja su pokazali kako je i očekivano da su razine GUK u dijabetičkog miša statistički značajno više nego u kontrolnoj skupini, međutim tretman sa vodenim ekstraktom statistički je značajno snizio razine GUK u usporedbi sa netretiranom dijabetičnom skupinom ( $P < 0,005$ ), kao i sa etanolnim ekstraktom ( $P < 0,0001$ ). Također pokazana je statistički značajna razlika između vodenog ekstrakta ( $P < 0,005$ ) i 70% etanolnog ekstrakta u dozi 300 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase. Između ekstrakata za dozu od 500 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase nema statistički značajne razlike. Na kraju, pokazalo se da vodeni ekstrakt u dozi od 500 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase ima bolji učinak na pad GUK. Mehanizam djelovanja ekstrakta pripisuje se flavonoidima i taninima koji se ponašaju kao hvatači slobodnih radikala (Sharma i sur., 2008; Muhtadi i sur., 2015). Učinjen je i OGTT test nakon dvotjednog tretmana ekstraktom. U normoglikemijskog miša pik glukoze rastao je do 60 minuta nakon čega se vratio na normalne razine tijekom 120 minuta. U dijabetičnog skupini međutim nakon 60 minuta nastavlja rasti, što je i očekivano. U tretiranoj skupini, GUK doseže maksimalni pik u 60-oj minuti te statistički značajno pada nakon 120 minuta praćenja. Vodeni ekstrakt u dozi od 500 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase na normalne razine pokazuje najznačajniju redukciju GUK.

Mnogi radovi ispitali su utjecaj polifenolnih spojeva iz bobičastog voća na razine glukoze u krvi. Tako su Sun i sur. (2012) pokazali da se tretiranjem dijabetičnog miša sa ekstraktom kineske crvene borovnice (150  $\mu$ g cijanidin-3-glikozida po 10 g tjelesne mase, 2 puta dnevno) statistički značajno smanjuje koncentracija glukoze u krvi ( $P < 0,05$ ) te se povećava tolerancija glukoze u odnosu na dijabetičnog miša koji nije tretiran ekstraktom. Grace i sur. (2009) utvrdili su da tretman dijabetičnog miša C57BL/6 sa ekstraktom polifenola iz borovnice, bogatog antocijanidinima, statistički značajno ( $P < 0,05$ ) smanjuje razinu glukoze u krvi u odnosu na dijabetičnog miša koji nije tretiran ekstraktom.

Ranija istraživanja na biljkama pokazala su slične terapijske efekte na sniženje GUK i poboljšanje aktivnosti beta stanica te inhibiciju probavnih enzima uključenih u metabolizam ugljikohidrata.

Naše istraživanje sugerira da polifenoli koji su identificirani u ECT a potom i u tkivima bubrega i jetre eksperimentalnih životinja, doprinose smanjenju razine GUK na tašte i dugoročno, a vjerojatno putem moduliranja ekspresije GLUT-4, peroksisom proliferator aktivirani receptor gama (PPAR $\gamma$ ) i fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI-3K), a slično djelovanju antidijabetičih lijekova.

Konsumacija ECT je tijekom najmanje 5 do 10 dana poboljšala glikemijsku kontrolu, tako da je spustila razine glukoze u krvi u tretiranoj hiperglikemijskoj skupini. Istovremeno zaključeno je da akutna doza prvi dan nije dovoljna za redukciju hiperglikemije nego je potrebno izlaganje ekstraktu kroz duži period, barem 10 dana kao u ovom eksperimentu. Učinak se pripisuje uglavnom djelovanju polifenola iz ekstrakta.

Međutim taj učinak snižavanja GUK može biti postignut i zbog inhibicije  $\alpha$ -amilaze i time posljedično niže postprandijalne glukoze, što je posebno karakteristično za kvercetin i kampferol glikozide, o čemu će se govoriti u narednim poglavljima.

### 5.3.2. Učinak na inzulin u serumu

Polifenolni spojevi prema dosadašnjim istraživanjima imaju pozitivan utjecaj na lučenje glukoganu sličanog peptida (GLP1) putem stimuliranja crijevnih L-stanica te na inhibiciju dipeptidil peptidazu-4 (DPP4) na površini endotela. Inhibicija DPP4 povećava poluživot GLP1 te povećava inzulinsku osjetljivost putem stimulacije  $\beta$ -stanica gušterače (Domínguez Avila i sur., 2017).

Gonzalez-Abuin i sur. (2014) dokazali su da je tretiranje dijabetičkih štakora ekstraktom sjemenki grožđa u dozi od 1 g kg<sup>-1</sup> tjelesne mase izazvalo lučenje inzulina i GLP1 u hiperglikemijskoj skupini te inhibirao DPP4 aktivnost. Povećana inzulinska osjetljivost kao i niža glikemija u dijabetičnih štakora potvrđena je i izvođenjem OGTT testa. Navedena svojstva pripisuju se polifenolima iz ekstrakta: procijanidinima, katehinima, epikatehinima, galnoj kiselini.

Anhe i sur. (2015) tretirali su C57BL/6 miša sa ekstraktom brusnice u dozi 200 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase te je pokazano da tretman doprinosi poboljšanoj inzulinskoj osjetljivosti, što je potvrđeno OGTT testom i povećanjem lučenja inzulina u serumu nakon uzimanja glukoze otopine.

Al-Numair i sur. (2015) ispitivali su tijekom 45 dana eksperimenta utjecaj kampferola na glukozu i inzulin u plazmi kod dijabetičnih štakora. Pokazano je da su dijabetičnim štakorima razine glukoze u krvi znatno porasle 7., 15. i 45. dan tretmana u usporedbi sa normalnom skupinom, dok je inzulin 45-ti dan znatno smanjen u odnosu na normalnu skupinu. Doza od 100 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase kampferola pokazuje učinak sniženja glukoze i povišenja inzulina u odnosu na primijenjene doze od 50 i 200 g kg<sup>-1</sup> tjelesne mase kampferola.

Postoje dokazi da kvercetin aktivira inzulinski receptor tirozin kinazu. Fosforilacija specifičnih mjesta u podjedinici inzulinskog receptora (Tyr-1158, Tyr-1161, Tyr-1162) korelira sa aktivacijom tirozin kinaze i propagira biološke aktivnosti hormona (Gajera, 2018).

U našem istraživanju 24 sata nakon tretmana sa ECT došlo je do povećanog lučenja inzulina za 33% u odnosu na netretiranu hiperglikemijsku skupinu, dok je nakon 10 dnevnog tretmana to povećanje iznosilo 49% a također je i brže postignut učinak u odnosu na prethodna istraživanja.

Prema Ben Salem i sur. (2017) etanolni ekstrakt lista biljke *Cynara scolymus* ima dvojako antidijabetičko djelovanje: povećava perifernu osjetljivost na izlučeni inzulin i inhibira aktivnosti enzima  $\alpha$ -amilaze što utječe na smanjenu apsorpciju ugljikohidrata u tankom crijevu i posljedično ima hipoglikemijski učinak. Etanolni ekstrakt lista *Cynara scolymus* pokazao je pozitivno djelovanje na OGTT, odnosno u skupini dijabetičnih štakora koja je tretirana ekstraktom, povećana je osjetljivost na inzulin te pravovremeni odgovor na njegovo lučenje, a inhibirano je njegovo pojačano lučenje, što ukazuje na hipoglikemijski učinak *Cynara scolymus*. Ovakvo djelovanje pripisuje se cinarinu te klorogenskoj kiselini, a za koje sugeriraju da putem zaštitnih mehanizama mogu reducirati štetne efekte slobodnih radikala te povećati unos glukoze u periferna tkiva, reducirati crijevnu absorpciju glukoze putem inhibicije probavnih enzima te stimulirati  $\beta$ -stanice na izlučivanje enzima.

Dobiveni *in vivo* rezultati sugeriraju da polifenoli iz ECT imaju učinak na povećanje koncentracije inzulina u serumu u tretiranoj hiperglikemijskoj skupini, u odnosu na netretiranu, što je pokazano za 1. ( $P=0,0005$ ) i 10. ( $P=0,0183$ ) dan eksperimenta, a potvrđuje do sada dobivene rezultate ranije navedenih istraživanja. Takav učinak može bit povezana sa zaštitnim djelovanjem polifenola iz ECT, na  $\beta$ -stanice gušterače, redukcijom štetnih učinaka slobodnih radikala te poticanjem  $\beta$ -stanica na proizvodnju inzulina nakon što već nastupi hiperglikemija. Također, moguće je katehinima pripisati aktivnost aktivacije AMPK u skeletnim mišićima i jetri, a što predstavlja ključnu ulogu u zaštiti  $\beta$ -stanica od glukolipotoksičnosti.

Kvercetin se s druge strane, može smatrati zaštitnikom  $\beta$ -stanica od oksidacijskoga stresa, smanjujući lipidnu peroksidaciju.

### 5.3.3. Učinak na $\alpha$ -AMILAZU

Jedan od terapijskih ciljeva pri snižavanju postprandijalne hiperglikemije je prevenirati brzu apsorpciju ugljikohidrata nakon unosa hrane putem inhibicije enzima koji sudjeluju u razgradnji škroba u jednostavne šećere. Oligosaharidi se dalje razgrađuju enzimima u probavnom sustavu maltozu, zatim do glukoze te se apsorbiraju mukozom u tankom crijevu (Hogan i sur., 2010; Hamden i sur., 2011).  $\alpha$ -amilaza sudjeluje u prvom koraku razgradnje škroba hidrolizirajući  $\alpha$ -1,4-glikozidnu vezu. Inhibicija  $\alpha$ -amilaze se odvija tako što se blokira pristup aktivnom mjestu enzima te molekule ugljikohidrata ne mogu ući u aktivno mjesto.  $\alpha$ -amilaza tada ne može cijepati  $\alpha$ -1,4-glikozidnu vezu. Zato je u konačnosti potrebno dulje vrijeme da bi se metabolizirali ughljikohidrati, čime se usporava brzina apsorpcije glukoze te se na kraju smanjuje postprandijalna glukoza u krvi (Rasouli i sur., 2017).

Moguće objašnjenje vezanja polifenolnih spojeva na aktivna mjesta  $\alpha$ -amilaze Rasouli i sur. (2017) predložili su takozvanim molekularnim pristajanjem i virtualnim očitavanjem, koje može sa visokom točnošću predvidjeti konformaciju liganada koji se trebaju vezati na aktivna mjesta  $\alpha$ -amilaze. Istraživanjem zaključuju da su katehin, hesperitin, kampferol, silibnin i pelargonidin ligandi koji imaju afinitet za vezanje na aktivno mjesto  $\alpha$ -amilaze djeluju inhibicijski na nju. U radu se koristila kvantna kemijska analiza, virtualno vezanje klastera optimizirano molekularnom geometrijom i HOMO-LUMO energijama koristeći Becke triparametarsku teoriju funkcionalne hibridne gustoće.

Istraživanja su potvrdila da inhibitori  $\alpha$ -amilaze reduciraju postprandijalnu glukozu u krvi putem usporavanja oslobađanja D-glukoze iz oligosaharida ili disaharida koji se unesu putem kompleksnih prehrambenih ugljikohidrata. Ovakvo djelovanje inhibitora enzima istovremeno može biti uzrok nekih gastrointestinalnih smetnji kao što su abdominalna bol ili dijareja (Heo i sur., 2009; Hamden i sur., 2011).

Rezultati dobiveni *in vivo* u našem istraživanju sugeriraju da ECT ima statistički značajni inhibicijski učinak na aktivnost  $\alpha$ -amilaze u serumu i jetri u hiperglikemijske skupine koja je tretirana sa ECT u odnosu na hiperglikemijsku nakon 24 h ( $P < 0,0001$ ), 5 ( $P < 0,0001$ ) i 10 ( $P < 0,0001$ ) dana tretmana u serumu (Slike 51-58) te u jetri nakon 10 dana ( $P = 0,0004$ ).



Inhibicija aktivnosti  $\alpha$ -amilaze putem polifenola istražena je u mnogim radovima (Oboh i sur., 2016; Ben Salem i sur., 2017; Governa i sur., 2018; Chukwuma i sur., 2019). Brojna istraživanja sugeriraju da polifenoli prisutni u ECT reduciraju hiperglikemiju putem različitih mehanizama. Polifenoli dokazano mogu inhibirati  $\alpha$ -amilaznu i  $\alpha$ -glukozidaznu aktivnost, stimulirati lučenje inzulina iz  $\beta$ -stanica, regulirati otpuštanje glukoze iz jetre i potpomagati unošenje glukoze u tkiva (Hanhineva i sur., 2010).

Pijenje čaja (*Camellia sinensis* L.) i kave (*Coffea Arabica* L.) povezuje se sa nižim rizikom od hiperglikemije i poboljšanom tolerancijom glukoze, inzulinskom osjetljivošću te regulacijom metabolizma glukoze (Governa i sur., 2018). Ben Salem i sur. (2017) sugeriraju da alkoholni ekstrakt biljke *Cynara scolymus* statistički značajno ( $P < 0,001$ ) snižava  $\alpha$ -amilazu u serumu dijabetičkog štakora u odnosu na dijabetičkog koji nije tretiran ekstraktom, te reducira razinu glukoze u krvi za 42,84% i 37,91% u usporedbi sa dijabetičnim štakorima nakon 28 dnevnog tretmana.

Ovim istraživanjem potvrđeno je da se  $\alpha$ -amilaza reducira u tretiranoj hiperglikemijskoj skupini za 34% nakon 24h, 42% nakon 5 dana te 46% nakon 10 dana tretmana, u odnosu na netretiranu hiperglikemijsku skupinu. Stoga je nakon 10 dnevnog tretmana dokazan inhibirajući učinak na  $\alpha$ -amilazu koji se može pripisati polifenolima koji su površeni u ECT.

Prema Zheng i sur. (2020) utvrđeno je smanjenje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze u gušterači ferulinskom kiselinom (pri koncentracijama  $IC_{50}: 0,622 \text{ mg mL}^{-1}$ ) te pokazuje mješoviti mehanizam inhibicije.  $\alpha$  heliks i  $\beta$  ploča koje sadržava  $\alpha$ -amilaza mijenjaju se konformacijski nakon dodavanja ferulinske kiseline. Fluorescencijsko gašenje kao i molekularno pristajanje rezultiraju time da je ferulinska kiselina u međureakciji sa aminokiselinskim ostacima  $\alpha$ -amilaze ulazeći tako u aktivno mjesto što podupire tvrdnju da su uglavnom nekovalentne veze odgovorne za inhibiciju  $\alpha$ -amilaze.

Prema Su i sur. (2015) istražen je antidijabetički potencijal ekstrakta sjemenki božura. Rezultati su pokazali da ekstrakt sjemenki božura inhibira aktivnost  $\alpha$ -amilaze, međutim pojačava aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze. Pokazano je da ekstrakt ima utjecaj reduciranja razine glukoze u krvi u dijabetičnih miševa. Također primijećena su i značajna poboljšanja tolerancije glukoze, razina inzulina u serumu, smanjenje u HbA1C, ukupnom kolesterolu i trigliceridima u tretiranim skupinama u usporedbi sa skupinama koje nisu tretirane ekstraktom.

Našim istraživanjem potvrđeno je da ECT ima sličan antihiperглиkemijski učinak putem sniženja aktivnosti  $\alpha$ -amilaze mehanizmima kako je opisano u prijašnjim radovima te je taj učinak postignut 10 dnevnim tretmanom, što je ranije nego u prethodnim istraživanjima. Hiperглиkemijska skupina koja je tretirana sa ECT pokazala je statistički značajnu smanjenu aktivnost  $\alpha$ -amilaze u odnosu na hiperглиkemijsku skupinu za 1., 5. i 10. dan tretmana (Slike 12-18). Dobiveni *in vivo* rezultati sugeriraju da polifenoli iz ECT (Tablica 4) djeluju inhibicijski na  $\alpha$ -amilazu smanjujući joj koncentraciju u serumu i jetri, a posljedično smanjujući i GUK u krvi vremenskim odlaganjem razgradnje ugljikohidrata (Slike 51, 53 i 55).

Naši rezultati ukazuju na pozitivan učinak polifenola iz ECT i to ponajprije onih u formi glikozida na inhibiciju aktivnosti  $\alpha$ -amilaze, a uglavnom bi se to moglo pripisati kvercetin glikozidima osobito rutinu i katehinu. Osim toga, ECT bi mogla imati dobar potencijal korištenja budući da snažno utječe na inhibiciju  $\alpha$ -amilaze a pri tome nema nuspojave kao što to imaju neki antidijabetički lijekovi.

#### **5.3.4. Učinak na oralni glukozni tolerans test (OGTT)**

OGTT je oralni test opterećenja glukozom kojim se utvrđuje kakva je dinamika apsorpcije glukoze u organizmu. Indikator je za procjenu učinka polifenola iz ECT na glikemiju.

Rezultati OGTT testa prema Chen i sur. (2018) pokazali su da je glukoza u krvi u svim ispitivanim skupinama dosegla pik u prvih 30 minuta, a da se potom u kontrolnoj skupini vratila skoro na početnu vrijednost. Usporedivši vrijednosti sa dijabetičnom skupinom, skupine koje su primale ekstrakt iz zrna crne soje, imale su statistički značajno smanjenje glukoze u krvi ( $P < 0,01$ ), što ukazuje na to da ekstrakt iz zrna crne soje može imati potiskujući učinak na krivulju skoka glukoze. Područje ispod krivulje (AUC) ukazuje da je poboljšana tolerancija glukoze u skupini tretiranoj sa ekstraktom zrna crne soje te da je statistički značajno niže područje ispod krivulje nego li u dijabetičke skupine ( $P < 0,05$ ). Rezultati pokazuju da ekstrakt zrna crne soje može djelovati kao potencijalni antidijabetik. Inzulin u serumu za dijabetičku skupinu bio je mnogo veći u usporedbi sa kontrolom ( $P < 0,01$ ). Ekstrakt iz zrna crne soje pokazao je da značajno suprimira razine inzulina, i to kod niže doze od 100 mg kg<sup>-1</sup> za 41,57%, kod srednje od 200 mg kg<sup>-1</sup> za 47,89% te za visoke doze od 400 mg kg<sup>-1</sup> za 47,89% .

U ovom istraživanju potvrđeno je da su niže AUC u tretirane hiperglikemijske skupine u odnosu na netretiranu i to dokazuje poboljšanu toleranciju prema glukozi nakon tretmana sa ECT. Osim toga, u tretiranoj hiperglikemijskoj skupini pokazano je da najveći pik porasta glukoze u krvi doseže nakon 30 minuta, a slično kao i normoglikemijska skupina što znači da tretirana skupina ima tendenciju normalnog metaboliziranja glukoze i to već nakon akutnog unosa ECT kao i subkroničnog (10 dana).

Prema Zhang i sur. (2016) glukoza u krvi mjerena je na tašte za dijabetičku skupinu i dijabetičnu skupinu koja je dobivala ekstrakt *Morella rubra* te nema statistički značajne razlike. Koncentracija glukoze na tašte u kontrolnoj grupi rasla je tijekom eksperimenta, dosegnuvši maksimum pred kraj ( $25,41 \pm 1,90 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Tretman ekstraktom borovnice nakon 2 tjedna dovelo je do smanjenja glukoze na tašte, odnosno, u toj skupini primijećeno je 50% smanjenje glukoze u krvi ( $P < 0,001$ ). Proveden je OGTT test. Tretman ekstraktom *Morella rubra* povećao je toleranciju na glukozu u dijabetičnog miša, reducirala se razina glukoze u krvi na  $18,31 \pm 2,01 \text{ mmol L}^{-1}$  nakon jednog sata te 2 sata nakon unosa glukoze na  $14,01 \pm 1,44 \text{ mmol L}^{-1}$ . Hipoglikemijski učinak je pokazan kao statistički značajniji za skupinu koja je primala ekstrakt, u 90-oj i 120-oj minuti OGTT testa ( $P < 0,05$ ) što ukazuje na značajnu regulacijsku aktivnost na toleranciju glukoze u dijabetičnog miša.

Monavar Feshani i sur. (2011) istraživali su utjecaj ekstrakta kavkaske borovnice na glikemijske parametre u dijabetičnog miša. Proveli su OGTT test, a očekivano vrijednosti postprandijalne glukoze u krvi porasle su za sve skupine. Kod dijabetičnog miša tretiranog sa ekstraktom kavkaske borovnice, primijećen je statistički značajno manji skok postprandijalne glukoze u usporedbi sa skupinom dijabetične kontrole koja nije tretirana ekstraktom ( $P < 0,00001$ ).

Prema Demir i sur. (2016) proveden je eksperiment na dijabetičnim štakorima tretiranim sa vodenim ekstraktom ploda *Myrtus Communis* L. Razine glukoze u krvi mjerene su u kontrolnoj skupini, dijabetičkoj i dijabetičkoj skupini tretiranoj sa ekstraktom. Razine GUK očekivano su statistički značajno više u dijabetičnih štakora ( $P < 0,001$ ). Razine glukoze statistički značajno su niže za sve dijabetične skupine koje su dobivale vodeni ekstrakt u dozama 250, 500 i 1000 mg kg<sup>-1</sup> za  $P < 0,05$ ,  $P < 0,05$  i  $P < 0,001$ . Doza od 1000 mg kg<sup>-1</sup> pokazala se najuspješnijom u usporedbi sa ostalim primijenjenim dozama u sniženju razine GUK.

Prema Kim (2012) utvrđeno je da tretman dijabetičkog miša ekstraktom biljke *Ecklonia cava* dovodi do niže razine glukoze u krvi na tašte, međutim kod normoglikemijskog miša nakon tretmana nije utvrđena nikakva statistički značajna promjena u razini GUK. Uzevši u obzir OGTT utvrđeno je da je sveukupno poboljšana tolerancija glukoze u hiperglikemijskog miša tretiranog sa ekstraktom.

Rezultati provedenog OGTT-a na temelju ranijih istraživanja sugeriraju da ekstrakt cvijeta trnine reducira aktivnost SGLT 1 (Duroc i sur., 2007).

U našem istraživanju utvrđeno je da tretman hiperglikemijskog miša sa ECT poboljšava homeostazu glukoze i pokazuje smanjenje GUK u usporedbi sa hiperglikemijskom skupinom. Kretanje GUK tijekom 120 min pokazuje da je skupina ECT brže postigla homeostazu glukoze tijekom 10 dnevnog tretmana (Slike 67 i 68).

Tang i sur. (2018) istražili su na modelu dijabetičkog štakora utjecaj polifenola iz ekstrakta cvijeta biljke *Punica granatum* L. na inzulinsku osjetljivost OGTT testom, prikazano modelom farmakokinetičkih krivulja i njihove površine (AUC). Dijabetički štakori tretirani sa ekstraktom (50 i 100 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase) pokazali su statistički značajno smanjenje površine ispod krivulje (AUC) u usporedbi sa dijabetičkim štakorima koji nisu tretirani ekstraktom ( $P < 0,01$ ). Rezultati pokazuju da tretman ekstraktom poboljšava toleranciju glukoze sa boljim učinkom kod niže doze što se slaže i sa ovim istraživanjem gdje je korišten ekstrakt cvijeta trnine u dozi od 25 mg kg<sup>-1</sup> te je u toj koncentraciji potvrdio i dobivene rezultate prema Tang i sur. (2018).

Nguyen i sur. (2020) ispitali su potencijalni antidijabetički učinak ekstrakta biljke *Adenosma braceosum* na razinu GUK te na OGTT u dijabetičnog miša tijekom 21 dana tretmana. Rezultati istraživanja pokazali su da se hipoglikemijski učinak ekstrakta iskazuje između 7 i 21 dana tretmana. Skupine dijabetičnih miševa koje su primale etanolni i vodeni ekstrakt biljke imale su statistički značajno pad GUK ( $P < 0,01$ ) u odnosu na dijabetičnu skupinu koja nije tretirana ekstraktom. Maksimalan učinak postignut je nakon 21 dana tretmana. OGTT test koji je napravljen 7, 14 i 21 dan eksperimenta pokazao je da je učinak doze od 50 mg kg<sup>-1</sup> tjelesne mase etanolnog i vodenog ekstrakta statistički značajan kao i učinak lijeka glibenclamida u dozi od 10 mg kg<sup>-1</sup> i to u 21 danu eksperimenta u odnosu na krivulju dijabetične skupine ( $P < 0,05$ ).

Temeljem dosadašnjih istraživanja, naši rezultati ukazuju kako flavonoidi iz ekstrakta cvijeta trnine (ECT) a osobito kvercetin glikozidi, mogu poticati lučenje inzulina iz  $\beta$ -stanica gušterače te poboljšati regeneraciju tih stanica u hiperglikemijskog miša, pripisuju im se antioksidacijska i hipoglikemijska svojstva (izokutelarein-8-O- $\beta$ -D-glukopiranozid) te brže postizanje homeostaze glukoze.

Znanstveni doprinos ovog doktorskog rada se očituje u ispitivanju pozitivnog učinka ekstrakta cvijeta *Prunus Spinosa* L. na oksidacijski stres i hiperglikemiju u C57BL/6 miša, a kao jedinstvenog ekstrakta koji do sada nije ispitan u svrhu djelovanja na isto. Znanstveni doprinos se očituje i u razumijevanju metaboličkih procesa uključenih u biodostupnost polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine što je ključno za određivanje njihovih potencijalnih bioaktivnih učinaka *in vivo* kao i sveukupnog značaja u suportivnoj terapiji kod oboljelih od hiperglikemije.

## 6. ZAKLJUČCI

Polifenoli detektirani u ekstraktu cvijeta trnine (ECT) kao i njihovi metaboliti u hiperglikemijskoj skupini koja je tretirana ekstraktom, u odnosu na netretiranu hiperglikemijsku skupinu smanjuju oksidacijski stres tako što pojačavaju aktivnost antioksidativnih enzima, te smanjuju biljege oksidacijskog stresa:

1. Statistički značajno snižavaju razinu MDA u tkivima jetre ( $P=0,006$ ) i bubrega ( $P=0,0342$ ), 10.dan tretmana.
2. Statistički značajno snižavaju razinu AOPP u tkivima jetre ( $P=0,026$ ) i bubrega ( $P=0,04055$ ).
3. Povećavaju aktivnost GSH ali ne značajno u tkivima jetre i bubrega 10. dan tretmana
4. Statistički značajno povećavaju aktivnost SOD u tkivima jetre ( $P<0,001$ ) i bubrega ( $P=0,0060$ ), 10.dan tretmana.
5. Statistički značajno povećavaju aktivnost CAT u tkivima jetre ( $P=0,039$ ), no ne statistički značajno u tkivima bubrega, 10.dan tretmana.
6. Polifenoli detektirani u ekstraktu cvijeta trnine kao i njihovi metaboliti u hiperglikemijskoj skupini koja je tretirana ekstraktom, u odnosu na hiperglikemijsku skupinu izazvanu aloksanom potiču brže upostavljanje homeostaze glukoze i bolju glikemijsku kontrolu što je potvrđeno OGTT testom za 1., 5. i 10. dan tretmana.
7. Polifenoli detektirani u ekstraktu cvijeta trnine kao i njihovi metaboliti u hiperglikemijskoj skupini koja je tretirana ekstraktom, u odnosu na hiperglikemijsku skupinu izazvanu aloksanom potiču smanjenje aktivnosti  $\alpha$ -amilaze u tkivima jetre i u serumu odnosno imaju inhibitorni učinak na  $\alpha$ -amilaznu aktivnost.
8. Polifenoli detektirani u ekstraktu cvijeta trnine kao i njihovi metaboliti u hiperglikemijskoj skupini koja je tretirana ekstraktom, u odnosu na hiperglikemijsku skupinu izazvanu aloksanom potiču povećanje inzulinske aktivnosti u serumu.
9. Polifenoli detektirani u ekstraktu cvijeta trnine kao i njihovi metaboliti u hiperglikemijskoj skupini koja je tretirana ekstraktom, u odnosu na hiperglikemijsku skupinu izazvanu aloksanom potiču dugotrajnim tretmanom sniženje glukoze u krvi na tašte, unatoč kratkotrajnom povećanju GUK prilikom subkroničnog unosa, a zbog prisutnosti vezanih šećera uz polifenole.

## 7. LITERATURA

- Abbas, M., Saeed, F., Anjum, F. M., Afzaal, M., Tufail, T., Bashir, M.S., Ishtiaq, A., Hussain, S., Suleria, H.A.R. (2017) Natural polyphenols: and overview. *Int. J. Food Prop.* **20(8)**, 1689-1699.
- Abcam 2020, Amylase assay kit (colorimetric) Available at: <https://www.abcam.com/amylase-assay-kit-colorimetric-ab102523.html>
- Abolfathi, A., Mohajeri, D., Rezaie, A., Nazeri, M. (2012) Protective effects of green tea extract against hepatic tissue injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* <https://doi.org/10.1155/2012/740671>.
- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* **105**,121–126.
- Alissa, E.M., Ferns, G.A. (2012) Functional foods and nutraceuticals in the primary prevention of cardiovascular diseases. *J. Nutr. Metab.* <https://doi.org/10.1155/2012/569486>
- Alkhalidy, H., Moore, W., Wang, Y., Luo, J., McMillan, R.P., Wang, Y., Zhen, W., Kequa, Z., Liu, D. (2018) The flavonoid kaempferol ameliorates streptozotocin-induced diabetes by suppressing hepatic glucose production. *Molecules* **23(9)**, 2338.
- Al-Numair, K.S., Chandamohan, G., Veeramani, C., Alsaif, M.A. (2015) Amaliorative effect of kaempferol, a flavonoid, on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Redox report.* **20(5)**, 198-209.
- Anhe, F.F., Roy, D., Pilon, G., Dundonne, S., Matamoros, S., Varin, T.V., Garofalo, C., Moine, W., Desjardins, Y., Levy, E., Marette, A.A. (2015) A polyphenol rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermasia spp.population in the gut micorbiota of mice. *Gut* **64(6)**, 872-883.
- Apostolidis, E., Lee, C.M. (2010) In vitro potential of Ascophyllum nodosum phenolic antioxidant-mediated alpha-glucosidase and alpha-amylase. *J. Food Sci.* **75**, 97-102.
- Areas, E.H., Trinidad, T.P. (2017) Fate of polyphenols in pili (*Canarium ovarum* Engl.) pomace after *in vitro* simulated digestion. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.* **7(1)**, 53-58.
- Arts, I.C., Hollman, P.C. (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J. Clin. Nutr.* **81**, 317–325.
- Avila-Roman, J., Soliz-Rueda, J.R., Bravo, F.I., Aragones, G., Suarez, M., Arola-Arnal, A., Mulero, M., Salvado, M-J., Arola, L., Torres-FUentes, C., Mugureza, B. (2021) Phenolic compounds and biological rhythm: Who takes the lead? *Trends Food Sci. Technol.* **113**, 77-85.

- Ayala, A., Munoz, M.F., Argulles, S. (2014) Lipid peroxidation: Production, metabolism and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-noneal. *Oxid. Med. Cell Longev.* <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Azuma, K., Minami, Y., Ippoushi, K., Terao, J. (2007) Lowering effects of onion intake on oxidative stress biomarkers in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Clin. Biochem. Nutr.* **40**, 131-140.
- Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Azizi, F. (2013) Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *J. Diabetes Metab. Disord.* **12**, 1-9.
- Balta, V., Đikić, D., Crnić, I., Odeh, D., Oršolić, N., Kmetić, I., Murati, T., Dragović Uzelac, V., Landeka Jurčević, I. (2020) The effects of four-week intake of blackthorn flower extract on mice tissue antioxidant status and phenolic content. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **70**, 361-375.
- Bansal, A.K., Bilaspuri, G.S. (2011) Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions (review article). *Vet. Med. Int.* <https://doi.org/doi:10.4061/2011/686137>
- Bao, Y., Qu, Y., Li, J., Ren, X., Maffucci, K.G., Li, R., Wang, Z. (2018) In vitro and in vivo antioxidant activities on the flowers and leaves from *Paeonia rockii* and identification on their antioxidant constituents by UHPLC-ESI-MS/MS via pre-column DPPH reaction. *Molecules* **23**(2), 392.
- Barros, L., Carvalho, A.M., Sa Morais, J., Ferreira, J. (2001) Strawberry-tree blackthorn and rose fruits: detailed characterization in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chem.* **120**(1), 247-254.
- Béduneau, A., Tempesta, C., Fimbel, S., Pellequer, Y., Jannin, V., Demarne, F., Lamprecht, A. (2014) A tunable Caco-2/HT29-TX co-culture model mimicking variable permeabilities of the human intestine obtained by an original seeding procedure. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **87**, 290-298.
- Ben Salem, M., Ben A.K., Dhouibi, R., Ksouda, K., Charfi, S., Yaich, M., Hammami, S., Sahnoun, Z., Mounir Zegehal, K., Jamoussi, K., Affes, H. (2017) Protective effects of *Cynara scolymus* leaves extract on metabolic disorders and oxidative stress in alloxan-diabetic rats. *BMC Complement Alternative Med.* **17**, 328.
- Blumenthal M, Busse WR (1998) The Complete German Commission E monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines. Austin, TX: The American Botanical Council.
- Bogdanov, S., Baumann, S.E. (1988) Bestimmung von Honigzucker mit HPLC. *Mitt Geb. Lebensm. Hyg.* **79**, 198-206.
- Bohn, T. (2014) Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutr. Res.* **72**, 429-452.



- Bohn, T., McDougall, G.J., Alegria, A., Alminger, M., Arrigoni, E., Aura, A.-M., Brito, C., Cilla, A., N El, S., Karakaxa, S., Mrtine-cuesta, M.C., Santos, C.N. (2015) Mind the gap-deficits in our knowledge of aspects impacting the bioavailability of phytochemicals and their metabolites-a position paper focusing on carotenoids and polyphenols. *Mol. Nutr. Food Res.* **59(7)**, 1307-1323.
- 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.
- Broncel, M., Kozirog, M., Duchnowicz, P., Koter-Michalak, M., Sikora, J., Chojnowska-Jezireska, J. (2010) *Aronia melanocarpa* extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome. *Med. Sci. Monit.* **16(1)**, 28-34.
- Bukan, N., Sancak, B., Yavuz, O., Koca, C., Tutken, F., Ozcelikay, A.T., Altan N (2003) Lipid peroxidation and scavenging enzyme levels in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian J. Biochem. Biophys.* **40(6)**, 447-450.
- Bunaciu, A.A., Danet, A.F., Fleschin, S., Aboul-Enein, H.Y. (2015) Recent Applications for In Vitro Antioxidant Activity Assay. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **46**, 389-399.
- Burton-Freeman, B.M., Sandhu, A.K., Edirisinghe, I. (2016) Red raspberries and their bioactive polyphenols: cardiometabolic and neuronal health links. *Adv. Nutr.* **7(1)**, 44-65.
- Cabisco E, Piulats E, Echave P, Herrero E, Ros J. (2000) Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**, 27393-27408.
- Calvo, M.I., Cavero, R.Y. (2014) Medicinal plants used for cardiovascular diseases in Navarra and their validation from Official sources. *J. Ethnopharmacol.* **157**, 268-273.
- Carbonell-Capella, J.M., Buniowska, M., Barba, F.J., Esteve, M.J., Frigola, A. (2014) Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: a review. *Compr. Rev. Food Saf.* **13(2)**, 155-171.
- Cardona, F., Andres-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F.J., Quijpo-Ortuno, M.I. (2013) Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J. Nutr. Biochem.* **24**, 1415-1422.
- Castro-Acosta, M., Hall, W., Corpe, C. (2016) Polyphenol rich blackcurrant and apple extract inhibit glucose uptake in vitro models of intestinal sugar transport, but individual anthocyanins have no effect. *Proc. Nutr. Soc.* **75**, <https://doi.org/10.1017/S0029665116000902>

- Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Kauselmann, G., Kern, H., Zevnik, B., Garrel, C., Saez, F., Cadet, R., Henry-Berger, J., Schoor, M., Gottwald, U., Habenicht, U., Drevet, J.R., Vernet, P. (2009) Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 2074-2085.
- Charlton, A.J., Baxter, N.J., Khan, M.L., Moir, A.J., Haslam, E., Davies, A.P., Williamson, M.P. (2002) Polyphenol/peptide binding and precipitation. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1593–1601.
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C. (2004) Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 192-208.
- 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.
- Chen, R.Y. (2013) Brain Bioavailability of Polyphenols: Implications for Delivery of Brain. Health Benefits. Open Access. Purdue University e-pubs. Dissertations. pp194.
- Chen, T., Kritchevsky, J., Hargett, K., Feller, K., Klobusnik, R., Song, B.J., Janle, E.M. (2015) Plasma bioavailability and regional brain distribution of polyphenols from apple/grape seed and bilberry extracts in a young swine model. *Mol. Nutr. Food Res.* **59(12)**, 2432-2447.
- Chen, Z., Wang, C., Pan, Y., Gao, X., Chen, H. (2018) Hypoglycemic and hypolipidemic effects of anthocyanins extract from black soybean seed coat in high fat diet and streptozotocin-induced diabetic mice. *Food Funct.* **9**, 426-439.
- Cheng, I.F., Breen, K. (2000) On the ability of four flavonoids, baicalin, luteolin, naringenin and quercetin, to suppress the fenton reaction of the iron-ATP complex. *Bio Metals.* **13**, 77-83.
- Chenxiao, L., Feng, X., Li, Q., Wang, Y., Li, Q., Hua, M. (2016) Adiponectin, TNF- $\alpha$  and inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine* **86**, 100-109.
- Chow, H.H., Hakim, I.A., Vining, D.R., Crowell, J.A., Ranger-Moore, J., Chew, W.M., Celaya, C.A., Rodney, S.R., Hara, Y., Alberts, D.S. (2005) Effects of dosing condition on the oral bioavailability of green tea catechins after single-dose administration of Polyphenon E in healthy individuals. *Clin. Cancer Res.* **11(12)**, 4627-4633.
- Chukwuma, C.I., Matasabis, M.G., Ibrahim, M.A., Erukainre, O.L., Chabalala, M.G., Islam M.S. (2019) Medicinal plants with concomitant anti-diabetic and anti-hypertensive effects as potential sources of dual acting therapies against diabetes and hypertension: a review. *J. Ethnopharmacol.* **235**, 329-60.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. (2009) Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* **26**, 965-1096.

- Dao, T.M., Waget, A., Klopp, P., Serino, M., Vachoux, C., Pechere, L., Drucker, D.J., Champion, S., Barthelemy, S., Barra, Y., Burcelin, R., Seree, E. (2011) Resveratrol increases glucose induced GLP-1 secretion in mice: a mechanism which contributes to the glycemic control. *Plos. one* **6**, 1-9.
- D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Sczzochio, B., Masella, R. (2010) Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 1321-1342.
- D'Archivio, M., Santangelo, C., Sczzocchio, B., Vari, R., Filesi, C., Masella, R., Giovannini, C. (2008) Modulatory effects of polyphenols on apoptosis induction: Relevance for cancer prevention. *Int. J. Mol. Sci.* **9**, 213-228.
- Day, A.J., Gee, J.M., Du Pont, M.S., Johnson, I.T., Williamson, G. (2003) Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactae phlorizin hydrolase and the sodium-depedent glucose transporter. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 1199–11206.
- Del Rio, D., Rodrigues-Mateos, A., Spencer P.E., Jeremy, Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A. (2013) Dietary (poly)phenols in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 1818-1892.
- Demir, G.M., Gulaboglu, M., Aggul, A.G., Baygulap, N.K., Canayakin, D., Halici, Z., Suleyman, H. (2016) Antioxidant and antidiabetic activity of aqueous extract of *Myrtus communis* L.berries on streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Pharm. Biol. Sci.* **11(5)**, 11-16.
- Danielsen, E.T., Danielsen, E.M. (2017) Glycol chitosan: A stabilizer of lipid rafts in the intestinal brush border. *Biochem. Biophys. Acta Biomemb.* **1859(3)**, 360-367.
- Dominguez-Avila, J.A., Wall-Medrano, A., Veldrrain-Raodriguez, G., Chen, C.-Y., Salazar-Lopez, N.J., Robles-Sanchez, M., Gonzalez-Aguilar, G.A. (2017) Gastrointestinal interactions, absorption, splanchnic metabolism and pharmacokinetics of orally ingested phenolic compounds. *Food Funct.* **8(1)**, 15-38.
- Dominko, K., Đikić, D. (2018) Glutathionylation: a regulatory role of glutathione in physiological processes. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **69(1)**, 1-24.
- Dominko, K., Đikić, D., Hecimovic, S. (2020) Enhanced activity of superoxide dismutase is a common response to dietary and genetically induced increased cholesterol levels. *Nutr. Neurosci.* **23(5)**, 398-410.
- Draper, H.H., Csallany, A.S., Hadley, M. (2000) Urinary aldehydes as indicators of lipid peroxidation in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 1071-1077.

- Duroc, R., Voisin, T., El Firar, A., Labuthe, M. (2007) Orexins control intestinal glucose transport by distinct neuronal endocrine, and direct epithelial pathways. *Diabetes* **56**, 2494-2500.
- Đelmiš, J. Dijabetes i trudnoća. U. Kuvačić, I., Kurjak, A., Đelmiš, J. i sur., ur. Porodništvo. Zagreb: Medicinska naklada, 2009, 367-373.
- Đikić, D., Balta, V., Kmetić, I., Murati, T., Oršolić, N., Dragović-Uzelac, V., Landeka, I. (2018) UPLC/MS analysis of plasma bioavailability of 32 polyphenols in C57BL/6 mice treated with single acute dose (24h) of flower extract of the blackthorn *Prunus Spinosa* L. *MEBM*. **2**, 23-31.
- Edirisinghe, I., Burton-Freeman, B. (2016) Anti-diabetic actions of Berry polyphenols- Review on proposed mechanisms of action. *J. Berry Res.* **6**, 237-250.
- Edwards, C., Havlik, J., Cong, W., Mullen, W., Preston, T., Morrison, D.J., Combet, E. (2017) Polyphenols and health: interactions between fibre, plant polyphenols and the gut microbiota. *Nutr Bull.* **42(6)**, 356-360.
- Elabscience 2020, Mouse INS (Insulin) ELISA Kit Available at: [https://www.elabscience.com/p-mouse\\_ins\\_insulin\\_elisa\\_kit-205783.html](https://www.elabscience.com/p-mouse_ins_insulin_elisa_kit-205783.html)
- Elder C. (2004) Ayurveda for diabetes mellitus: a review of the biomedical literature. *Altern. Ther. Health Med.* **10**, 44-50.
- Elez Garofulić, I., Zorić, Z., Pedisić, S., Brnčić, M., Dragović-Uzelac, V. (2018) UPLC/MS<sup>2</sup> Profiling of Blackthorn Flower Polyphenols Isolated by Ultrasound-Assisted Extraction. *J. Food Sci.* **83(11)**, 2782-2789.
- Eran Nagar, E., Okun, Z., Shpigelman, A. (2020) Digestive fate of polyphenols: updated view of the influence of chemical structure and the presence of cell wall material. *Curr. Opin. Food Sci.* **31**, 38-46.
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., Grodsky, G.M. (2002) Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rec.* **23**, 599-622.
- Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A., Simeon-Rudolf, V., Reiner, E. (2003) Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Anal. Biochem.* **312**, 224-227.
- Fang, J. (2014) Bioavailability of anthocyanins. *Drug Metab. Rev.* **46(4)**, 508-520.
- Fehrestani Sani, M., Monasser Kouhsari, S., Moradabadi, L. (2011) Effects of three medicinal plants extracts in experimental diabetes: antioxidant enzymes activities and plasma lipids profile in comparison with metformin. *Iran J Pharm Res.* **11(3)**, 897-903.
- Fernandes, I., Faria, A., de Freitas, V., Calhau, C., Mateus, N. (2015) Multiple-approach studies to assess anthocyanin bioavailability. *Phytochem. Rev.* **14**, 899-919.

- Flohé, L., Ötting, F. (1984) Superoxide dismutase assays. *Meth. Enzymol.* **105**, 93-104.
- Fowler, M.J. (2008) Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clin. Diabetes.* **26**, 77–82.
- Franz, C., Chizzola, R., Novak, J., Sponza, S. (2011) Botanical species being used for manufacturing plant food supplements (PFS) and related products in the EU member states and selected third countries. *Food Funct.* **2**, 720-730.
- Furman, B.L., Candasamy, M., Bhattamisra, S.K., Veettil, S.K. (2020) Redution of blood glucose by plant extracts and their use in the treatment of diabetes mellitus: disrepancies in effetiveness between animal and human studies. *J. Ethnopharmacol.* **30**, 247.
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., Shimomura, I. (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* **114**, 1752–1760.
- Gajera, H.P., Hirpara, D.G. (2018) Anti-hyperglycemic effect and regulation of carbohydrate metabolism by phenolic antioxidants of medicinal plants against diabetes. *Curr. Res. Diabetes Obes. J.* **5(4)**, 1-3.
- Galli, F. (2007) Protein damage and inflammation in uraemia and dialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **22(5)**, 20–36.
- Ganguly S., G, T.K., Mantha, S., Panda, K. (2016) Simultaneous determination of black tea-derived catechins and theaflavins in tissue of tea consuming animals using ultra-performance liquid -chromatrography tandem mass spectrometry. *PLoS One.* **11(10)**, 1-18.
- Gessner DK, Ringseis R, Eder K (2017) Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **101(4)**, 605–628.
- Gonzalez-Abuin, N., Martinez-Micaelo, N., Margalef, M., Blay, M., Arola-Arnal, A., Muguerza, B., Ardevol, 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.
- Governa, P., Bains, G., Borgonetti, V., Cettolin, G., Giachetti, D., Magnano, A.R., Miraldi, E., Biagi, M. (2018) Phytotherapy in the managment of diabetes: a review. *Molecules* **23(1)**, 105.
- Grace, M.H., Ribnicky, D.M., Kuhn, P., Poulev, A., Logedra, S., Yousef, G.C. (2009) Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formilation from lowbush blueberry. *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine* **16(5)**, 406-415.

- Grant, R.W., Kirkman, M.S. (2015) Trends in the Evidence Level for the American Diabetes Association's "Standards of Medical Care in Diabetes" From 2005 to 2014. *Diabetes Care* **38(1)**, 6-8.
- Gryszczynska, B., Formanowicz, D., Budzyn, M., Wanic-Kossowska, M., Pawliczak, E., Formanowicz, P., Majewski, W., Strzyewski, K.W., Kasprzak, M.P., Iskra, M. (2017) Advanced oxidation protein products and carbonylated proteins as biomarkers of oxidative stress in selected atherosclerosis-mediated diseases. *Biomed. Research International*. **2017**, 1-9.
- Guariguata, L., Whiting., D.R., Hambleton, I., Beagley, J., Linnenkamp, U., Shaw, J.E. (2014) Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **103**, 137-149.
- 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 Chem.* **141 (4)**, 3721–3730.
- Guo, Y., Bruno, R.S. (2015) Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability. *J. Nutr. Biochem.* **26**, 201–210.
- Gushchin, P.V., Tyan, M.R., Bokach, N.A., Revenco, M.D., Haukka, M., Wang, M.J.(2008) Novel tailoring reaction for two adjacent coordinated nitriles giving platinum 1,3,5- triazapentadiene complexes. *Inorg. Chem.* **47**,11487-11500.
- Halliwell, B., Chirico, S. (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**,715–724.
- Hamden, K., Keskes, H., Belhaj, S., Mnafigui, K., Feki, A., Allouche, N. (2011) Inhibitory potential of omega-3 fatty and fenugreek essential oil on key enzymes of carbohydrate-digestion and hypertension in diabetes rats. *Lipid Health Dis.* **10**, 1-10.
- Hanhineva, K., Torronen, 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(4)**,1365–1402.
- Harada, M., Kan, Y., Naoki, H., Fukui, Y., Kageyama, N., Nakai, M., Miki, W., Kiso, Y. (1999) Identification of the major antioxidative metabolite in biological fluids of the rat with ingested (+)-catechin and (-)epicatechin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 973-977.
- Heaney, R.P. (2001) Factors influencing the measurement of bioavailability, taking calcium as a model. *J. Nutr.* **131**, 1344-1348.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure activity relationships. *J. Nutr. Biochem.***13**, 572–84.
- Heo, S., Hwang, J., Choi, J., Han, J., Kim, H., Jeon, Y. (2009) Diphenylmethoxyphenol isolated from *Ishie okamurae*, a brown algae, a potent  $\alpha$ -

amilase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* **615**, 252-256.

- Hernandez-Awuino, E., Muriel, P. (2018) Beneficial effects of naringenin in liver diseases: molecular mechanisms. *World J. Gastroenterol.* **24**, 1679-1707.
- Hogan, S., Zgang, L., Li, J., Sun, S., Canning, C., Zhou, K. (2010) Antioxidant rich grape pomace extract suppresses postprandial hyperglycemia in diabetic mice by specifically inhibiting alpha-glucosidase. *Nutr. Metab.* **7**, 1-9.
- Hollman, P.C.H. (2004) Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Pharm. Biol.* **42**, 74-83.
- Hollman, P.C.H., Arts, I.C.W. (2000) Flavonols, flavones and flavanols-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1081-1093.
- Horri, A., Emi, M., Tomita, N., Nishide, T., Ogawa, M., Mori, T., Matsubara, K. (1987) Primary structure of human pancreatic alpha-amylase gene: its comparison with human salivary alpha-amylase gene. *Gene* **60(1)**, 57-64.
- Hoseini, A., Namazi, G., Farrokhan, Reiner, Ž., Aghdavod, E., Bahmani, F., Asemi, Z. (2019) The effects of resveratrol on metabolic status in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease. *Food Funct.* **10**, 6042-6051.
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Zhang, Y. (2010) Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutr. Cancer.* **62**, 1-20.
- Ighordo, O.M., Akinloye, O.A. (2017) First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathion peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med.* **4**, 287-293.
- Jakobek, L. (2015) Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chem.* **175**, 556-567.
- Jakobek, L., Matić, P. (2018) Non-covalent dietary fiber-polyphenol interactions and their influence on polyphenol bioaccessibility. *Trends Food Sci. Technol.* **83**, 235-247.
- Jarić, S., Mačukanović-Jocić, M., Djurdjević, L., Mitrović, M., Kostić, O., Karadžić, B., Pavlović, P. (2015) An ethnobotanical survey of traditionally used plants on Suva planina mountain (south-eastern Serbia). *J. Ethnopharmacol.* **175**, 93-108.
- Jayakumar, T., Sakthivel, M., Thomas, P.A., Geraldine, P. (2008) Pleurotus ostreatus, an oyster mushroom, decrease the oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rat kidneys, heart and brain. *Chem-Biol. Interc.* **176**, 108-120.
- Jukić, S., Dražančić, A. Posteljica. U: Dražančić, A. i sur., ur. Porodništvo. 2. izdanje. Zagreb: Školska knjiga, 1999, 77-81.

- Kaczmarczyk-Sedlak, I., Folwarczna, J., Sedlak, K., Zych, M., Wojnar, W., Szuminska, I., Wyględowska-Promienska, D., Mrukwa-Kominek, E. (2019) *Arc. Med. Sci.* **15(4)**, 1073-1080.
- Kamiloglu, S., Cpanoglu, E., Grootaert, C., Van Camp, J., Battino, M. (2015) Anthocyanin absorption and metabolism by human intestinal Caco-2 cells-a review. *Int J. Mol. Sci.* **16**, 21555-21574.
- Kangralkar, V.A., Patil, S.D., Bandivadekar, R.M. (2010) Oxidative stress and diabetes: a review. *Int. J. Pharm. Appl.* **1(1)**, 38-45.
- Karas, M., Jakubczyk, A., Szymanowska, U., Zlotek, U., Zielinska, E. (2017) Digestion and bioavailability of bioactive phytochemicals. *Food Sci. Technol.* **52(2)**, 291-305.
- Kaushik, P., Singh, G., Khokra, S.L., Kushik, D. (2015) Bioassay guided fractionation and  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of flavanoid isolated from *Pinus roxburghii* Sarg. *Nat. Prod. Chem. Res.* **3(4)**, 1-3.
- Kavaz Yuksel, A. (2015) The effects of blackthorn (*Prunus Spinosa* L.) addition on certain quality characteristics of ice cream. *J. Food Qual.* **38**, 413-421.
- Kay, C.D., Pereira-Caro, G., Ludwig, I.A., Clifford, M.N., Crozier, A. (2017) Anthocyanins and flavanones are more bioavailable than previously perceived: a review of recent evidence. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **8**, 155-180.
- Kazazić, S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **55**, 279–290.
- Keppler, K., Humpf, H.U. (2005) Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 5195-5205.
- Kim, D.H., Jung, E.A., Sohng, I.S., Han, J.A., Kim, T.H., Han, M.J. (2008) Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch-Pharm. Res.* **21**, 17–23.
- Kim, H.K. (2012) *Ecklonia cava* inhibits glucose absorption and stimulates insulin secretion in streptozotocin induced diabetes mice. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* <https://doi.org/10.1155/2012/439294>
- Kim, M.J., Chung, J.Y., Kim, J.H., Kwak, H.K. (2013) Effects of cranberry powder on biomarkers of oxidative stress and glucose control in db/db mice. *Nutr. Res. Pract.* **7(6)**, 430-438.
- Kimura, T., Nakagawa, K., Kubota, H., Kojima, Y., Goto, Y., Yamagishi, K., Oita, S., Oikawa, S., Miyazawa, T. (2007) Food-grade mulberry powder enriched with 1-deoxynojirimycin suppresses the elevation of postprandial blood glucose in human. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 5869-5874.



- Komorowska, J., Watroba, M., Szukeiwicz, D. (2020) Review of beneficial effects of resveratrol in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. *Adv. Med. Sci.* **65**, 415-423.
- Kongpichitchoke, T., Hsu, J.L., Huang, T.C. (2015) Number of hydroxyl groups on the B-ring of flavonoids affects their antioxidant activity and interaction with phorbol ester binding site of PKC $\delta$ C1B domain: in vitro and in silico studies. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 4580-4586.
- Krishnamurthy, P., Wadhvani, A. (2012) Antioxidative enzymes: Antioxidative enzymes and human health. <https://www.intechopen.com/books/antioxidant-enzyme/antioxidant-enzymes-and-human-health>
- Kumar Tiwari, B., Pandey, K.B, Abidi, A.B., Rizvi, S.I. (2013) Markers of oxidative stress during diabetes mellitus. *J. Biomark.* <https://doi.org/10.1155/2013/378790>
- Kurimoto, Y., Sgubayama, Y., Inoue, S., Soga, M., Takikawa, M., Ito, C., Nanba, F., Yoshida, T., Yamashita, Y., Ashida, H. (2013) Black soybean seed coat extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via the activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 5558-5564.
- Laville, M., Nazare, J.A. (2009) Diabetes, insulin resistance and sugars. *Obes. Rev.* **10(1)**, 24-33.
- Lebeau, J., Furman, C., Bernier, J., Duriez, P., Teissier, E., Cotelle, N. (2000) Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 900-912.
- Lee, Y.S., Woo, J.B., Ryu, S.I., Moon, S.K., Han, N.S., Lee, S.B. (2017) Glucosylation of flavonol and flavanones by Bacillus cyclodextrin glucosyltransferase to enhance their solubility and stability. *Food Chem.* **229**, 75–83.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* **4**, 118–126.
- Lovrić, V., Putnik, P, Kovačević, D.B., 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.
- Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Lubos, E., Loscalzo, J., Handy, D.E. (2011) Glutathione peroxidase-1- in health and disease; from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 1957-1997.

- Ludwig, I.A., Mena, P., Calani, L., Borges, G., Pereira-Caro, G., Bresciani, L., Crozier, A. (2015) New insights into the bioavailability of red raspberry anthocyanins and ellagitannins. *Free Radic. Biol. Med.* **89**, 758-769.
- 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.
- Maity, S., Mallik, S., Gupta, S. (2015) Optimization of Solid State Fermentation Conditions and Characterization of Thermostable Alpha Amylase from *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). *J. Bioprocess Biotech.* **5**, 218
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2004) Polyphenols: food source and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 727-747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* **81**, 230-242.
- Manukumar, H.M., Kumar, J.S., Chandrasekhar, B., Raghava, S., Umesha, S. (2017) Evidences for diabetes and insulin mimetic activity of medicinal plants: Present status and future prospects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **57(12)**, 2712-2729.
- Marchelak, A., Owczarek, A., Matzka, M., Pawalak, A., Kolodziejczyk-Czepa, J., Nowak, P., Olszewska, A.M. (2017) Bioactivity potential of *Prunus spinosa* L. flower extracts: phytochemical profiling, cellular safety, pro-inflammatory enzymes inhibition and protective effects against oxidative stress in vitro. *Front. Pharmacol.* <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00680>
- Margalef, M., Pons, Z., Iglesias-Carres, L., Bravo, F.I., Muguera, B., Arola-Arnal, A. (2017) Flavonol plasma bioavailability is affected by metabolic syndrome in rats. *Food Chem.* **231**, 287-294.
- Marin, L., Miguélez, E.M., Villar, C.J., Lombo, F. (2015) Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Biomed. Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2015/905215>
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. (2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.* **16**, 577-586.
- Massot-Caldera, M., Abril-Gil, M., Torres, S., Franch, A., Castell, M., Perez-Cano, F. (2014) Impact of cocoa polyphenols extracts on the immune system and microbiota in two strains of young rats. *Br. J. Nutr.* **12**, 1944-1954.
- Mayer, J.P., Zhang, F., Di Marchi, R.D. (2007) Insulin structure and function. *Biopolymers.* **88(5)**, 687-713.

- Mazandarani, M., Ghafourian, M. (2017) Influence of extraction methods on total phenolic, flavonoids and antioxidant activity of *Tymus kotchyanus* L. extract in Seman Province, Iran. *Trends Phytochem. Res.* **1**, 33-38.
- Mehta, A., Satyanarayana, T. (2016) Bacterial and archaeal  $\alpha$ -amylases: diversity and amelioration of the desirable characteristics for industrial applications. *Front. Microbiol.* **7**.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implication for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* **52**, 673-751.
- Mikulić-Petkovšek, M., Stampar, F., Veberic, R., Sircelj, H. (2016) Wild prunus fruit species as a rich source of bioactive compounds. *J. Food Sci.* **81(8)**, 1928-1937.
- 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.
- Mnafigui, K., Kchaou, M, Ben Salah, H., Hajji, R., Khabbabi, G., Elfeki, A., Allouche, N, Gharsallah, N. (2016) Essential oil of *Zygophyllum album* inhibits key-digestive enzymes related to diabetes and hypertension and attenuates symptoms of diarrhea in alloxan-induced diabetic rats. *Pharm. Biol.* **54(8)**, 1326-1233.
- Monavar Feshani, A., Monatasser Kouhsari, S., Mohammadi, S. (2011) *Vaccinium arctostaphylos*, a common herbal medicine in Iran: Molecular and biochemical study of its antidiabetic effects on alloxan-diabetic Wistar rats. *J. Ethnopharmacol.* **133(1)**, 67-74.
- Monnier, V.M., Nemet, I., Sell, D.R., Weiss, M.F. (2010) Transition metals and other forms of oxidative protein damage in renal disease. *Studies on Renal Disorders*. Part of the *Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice*. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-60761-857-7\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-60761-857-7_2)
- Morand, C., Manach, C., Crespy, V., Remesy, C. (2000) Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. *Free Radic. Res.* **33**, 667-676.
- Moser, S., Lim, J., Chegeni, M., Wightman, J.D., Hamaker, B.R., Ferruzzi, M.G. (2016) Concord and niagara grape juice and their phenolics modify intestinal glucose transport in a coupled in vitro digestion/Caco-2 human intestinal model. *Nutrients* **8**, 414.
- Muhtadi, Primianti, A.U., Sujono, T.A. (2015) Antidiabetic activity of Durian (*Durio zibethinus* Murr.) and Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) fruit peels in alloxan diabetic rats. *Procedia Food Sci.* **3**, 255-261.

- Murati, T., Miletić, M., Kolarić, J., Lovrić, V., Bursać Kovačević, D., Putnik, P. (2019) Toxic activity of *Prunus spinosa* L. flower extract in hepatocarcinoma cells. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **70(4)**, 303-309.
- Mursu, J., Virtanen, J.K., Tuomainen, T.P., Nurmi, T., Voutilainen, S. (2014) Intake of fruit, berries, and vegetables and risk of type 2 diabetes in Finnish men: The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **99(2)**, 328-33.
- Mybiosource 2020, Advanced oxidation protein products (AOPP) ELISA Kit Available at: <https://www.mybiosource.com/mouse-elisa-kits/advanced-oxidation-protein-products-aopp/263319>
- Nardi, G.M., Farias Januario, A.G., Freire, C.G., Megiolaro, F., Schneider, K., Perazzoli, M.R., Do Naschimeto, S.R., Gon, A.C., Mariano, L.N., Wagner, G., Niero, R., Locatelli, C. (2016) Anti-inflammatory activity of berry fruits in mice model of inflammation is based on oxidative stress modulation. *Pharmacogn. Res.* **8(1)**, 42-29.
- Nerup, J., Platz, P., Andersen, O.O., Christy, M., Lyngsoe, J., Poulsen, J.E., Ryder, L.P., Nielsen, L.S., Thomsen, M., Svejgaard, A. (1974) HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet* **12(2)**, 864-866.
- Nguyen, N.H., Pham, Q.T., Loung, T.N.H., Le, H.K., Vo, V.G. (2020) Potential antidiabetic activity of extracts and isolated compound from *Adenosma bracteosum* (Bonati). *Biomolecules* **10**, 201.
- Noratto, G., Chew, B.P., Atienza, L.M. (2017) Red raspberry (*Rubus idaeus* L.) intake decreases oxidative stress in obese diabetes (db/db) mice. *Food Chem.* **227**, 305-314.
- Norberto, S., Silva, S., Mireles, M., Faria, A., Pintado, M., Calhau, C. (2013) Blueberry anthocyanins in health promotion: A metabolic overview. *J. Funct. Foods.* **5(4)**, 1518-1528.
- Oboh, G., Ogunsuyi, O.B., Ogunbadejo, M.D., Adefegha, S.A. (2016) Influence of gallic acid on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory properties of acarbose. *J. Food Drug Anal.* **24**, 627-634.
- Ola, M., Ahmed, M.M., Shams, S., Al-Rejaie, S.S. (2016) Neuroprotective effects of quercetin in diabetic rat retina. *Saudi J. Biol. Sci.* **24**, 1186-1194.
- Olszewska, M., Wolbis, M. (2001) Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta Pol. Pharm.* **58 (5)**, 367-372.
- Olthof, M.R., Hollman, P.C., Buijsman, M.N.C.P., van Amelsvoort, J.M.M., Katan, M.B (2003) Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols and extensively metabolizes in humans. *J. Nutr.* **133(6)**, 1806-1814.

- Oršolić, N. Gajski, G., Garaj-Vrhovac, V., Đikić, D., Špacir Prskalo, Z., Sirovina, D. (2011) DNA-protective effects of quercetin or naringenin in alloxan-induced diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* **656(1-3)**, 110-118.
- Owczarek, A., Magiera, A., Matczak, M., Piotrowska, D.G., Olszewska, M.A., Marchelak, A. (2017) Optimisation of preparative HPLC separation of four isomeric kaempferol diglycosides from *Prunus spinos* L. by application of the response surface methodology. *Phytochem Lett.* **20**, 415-424.
- Ozdal, T., Sela, D.A., Xiao, J., Boyacioglu, D., Chen, F., Capanoglu, E. (2016) The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients* **8(2)**, 78.
- Ozougwu, J.C., Obimba, K.C., Belonwu, C.D., Unakalamba, C.B. (2013) The pathogenesis and pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J. Physiol. Pathophysiol.* **4(4)**, 46-57.
- Panche, A.N., Diwan, A.D., Chandra, S.R. (2016) Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* **5**, 5-15.
- Pandey, K.B., Ibrahim Rizvi, S. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell Longev.* **5**, 270-278.
- Papandreou, M.A., Tsachaki, M., Efthimiopoulos, S., Cordopatis, P., Lamari, F.N., Margarity, M. (2011) Memory enhancing effects of saffron in aged mice are correlated with antioxidant protection. *Behav. Brain Res.* **219(2)**, 197-204.
- Patel, H, Chen, J., Das, K.C., Kavdia, M. (2013) Hyperglycemia induces differential change in oxidative stress at gene expression and functional levels in HUVEC and HMVEC. *Cardiovasc. diabetol.* **12**, 142-146.
- Petersen, B., Egert, S., Bosy-Westphal, A., Muller, M.J., Wolfram, S., Hubbermann, E.M., Schwarz, K. (2016) Bioavailability of quercetin in humans and the influence of food matrix comparing quercetin capsules and different apple sources. *Food Res. Int.* **88**, 159–165.
- Piwkowska, A., Rogacka, D., Audzeyenka, I., Jankowski, M. and Angielski, S. (2011) High glucose concentration affects the oxidant/antioxidant balance in cultured mouse podocytes. *J. Cell Biochem.* **112**, 1661-1672.
- Poonam, V., Raunak Kumar, G., Reddy, L.C.S., Jain, R., Sharma, S.K., Parmar, V.S. (2011) Chemical constituents of the genus *Prunus* and their medicinal properties. *Curr. Med. Chem.* **18**, 3758-3824.
- Popescu, I., Caudullo, G. (2016) *Prunus spinosa* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. U: European Atlas of Forest Tree Species, (San-Miguel-Ayaz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. ured.), Luxembourg, str.145.

- Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u pokusima ili druge znanstvene svrhe (2011) Narodne novine 47, Zagreb.
- Qin, W., Ren, B., Wang, S., Liang, B., He, X., Shi, L., Wang, J., Liang, Wu, F. (2016) Apigenin and naringenin ameliorate PKC $\beta$ II-associated endothelial dysfunction via regulating ROS/caspase-3 and NO pathway in endothelial cells exposed to high glucose. *Vasc. Pharmacol.* **85**, 39-49.
- Radovanović, B.C., Milenović Anđelković, A.S., Radovanović, A.B., Anđelković, M.Z. (2013) Antioxidant and antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits grown in southeast Serbia. *Trop. J. Pharm. Res.* **12 (5)**, 813-819.
- Rahigude, A. Bhutada, P., Kaulaskar, S. Aswar, M., Otari, K. (2012) Participation of antioxidant and cholinergic system in protective effect of naringenin against type-2 diabetes-induced memory dysfunction in rats. *Neuroscience* **226**, 62–72.
- Rasouli, H., Hosseini-Ghazvini, S.M.-B., Adibi, H., Khodarahmi, R. (2017) Differential  $\alpha$ -amylase/ $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes. *Food Funct.* **8**, 1942-1954.
- Rein, M.J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S.K., Da Silva Pinto, M. (2013) Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **75(3)**, 588-602.
- Romier, B., Schneider, Y.J., Lrondelle, X., During, A. (2009) Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. *Nutr. Rev.* **67**, 363-378.
- Roy, M., Sen, S., Chakraborti, A.S. (2008) Action of pelargonidin on hyperglycemia and oxidative damage in diabetic rats: Implication for glycation-induced hemoglobin modification. *Life Sci.* **82**, 1102–1110.
- Ruiz-Rodriguez, B.M., de Ancos, B., Sanchez-Moreno, C., Fernandez-Ruiz, V., de Cortes Sanchez-Mata, M., Camara, M., Tardio, J. (2014) Wild blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and hawthorn (*Crataegis monogyna* Jacq.) fruits as valuable sources of antioxidants. *Fruits* **69**, 61-73.
- Salaritabar, A., Darvishi, B., Hadjiakhoondi, F., Manayi, A., Suerda, A., Fazel Nabavi, S., Fitzpatrick, L.R., Nabavi, S.M., Bishayee, A. (2017) Therapeutic potential of flavonoids in inflammatory bowel disease: A comprehensive review. *World J. Gastroenterol.* **23**, 5097-5114.
- Santhakumar, A.B., Battino, M., Alvarez-Suarez, J.M. (2018) Dietary polyphenols: structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. *Food Chem. Toxicol.* **113**, 49-65.
- Sanz-Bauenhombre, M., Vallianueva, S., Moro, C., Tomas-Cobos, L., Guadarrama, A. (2016) Bioavailability and the mechanisms of action of a grape extract rich in polyphenols in cholesterol homeostasis. *J. Funct. Foods.* **21**, 178-185.

- Scalzo, J., Politi, A., Pellegrini, N., Mezzetti, B., Battino, M. (2005) Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition* **21(2)**, 207-13.
- Sedlak, L., Wojnar, W., Zych, M., Wygledowska-Promeinska, D., Mrukwa-Kominek, E., Kaczmarczyk-Sedlak, I. (2018). Effect of resveratrol, a dietary-derived polyphenol, on the oxidative stress and polyol pathway in the lens of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Nutrients* **10**, 1-15.
- Serra, A., Macia, A., Romero, M.P., Vallis, J., Blade, C., Arola, L., Motivla, M.J. (2011) Rapid methods to determine procyanidins, anthocyanins, theobromine and caffeine in rat tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* **879(19)**, 1519-1528.
- Seymour, E.M., Tanone, I.I., Urcuyo-Llanes, D.E., Lewis, S.K., Kirakosyan, A., Kondoleon, M.G., Kaufman, P.B., Bolling, S.F. (2011) Blueberry intake alters skeletal muscle and adipose tissue peroxisome proliferator-activated receptor activity and reduces insulin resistance in obese rats. *J. Med. Food.* **14**, 1511–1518.
- Shahidi, F., Peng, H. (2018) Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds. *J. Food Bioact.* **4**, 11-68.
- Sharma, A., Shahzad, B., Rechman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., Zheng, B. (2019) Response of phenylpropanoid pathway in the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules* **24(13)**, 2452.
- Sharma, B., Balomajumder, C., Roy, P. (2008) Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from *Eugenia jambolana* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 2376-2383.
- Sheweita, S.A., Mashaly, S., Newairy, A.A., Abdou, H.M., Eweda, S.M. (2016) Changes in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats: role of alhagi maurorum extracts. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016** <https://doi.org/10.1155/2016/5264064>
- Sima, I.A., Sârbu, C. (2016) Evaluation of polyphenolic fingerprints and antioxidant profiles of wild fruits. *Food Sci. Techn.* **51(6)**, 1433-1440.
- Spencer, J.P. (2003) Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J. Nutr.* **133**, 3255–3261.
- Spencer, J.P.E., Manal, M., El Mohsen, M.M. Abd, Minihane, A.M., Mathers, J.C. (2007) Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *Br. J. Nutr.* **99**, 12-22.
- SPSS version 17.0 (SPSS Inc. Chicago. IL). Available at: <https://www.hks.harvard.edu/.../A SPSS Manuals/SPSS%2>

- Stalmach, A., Troufflard, S., Serafini, M., Crozier, A. (2009) Absorption, metabolism and excretion of Choleadi green tea flavan-3-ols by humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **53**, 44-53.
- Striegel, L., Kang, B., Pilkenton, S.J., Rychlik, M., Apostolidis, E. (2015) Effect of black tea and black tea pomace polyphenols on  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amilase inhibition, relevant to type 2 diabetes prevention. *Front. Nutr.* <https://doi.org/10.3389/fnut.2015.00003>
- Su, J., Wang, H., Ma, C., Lou, Z., Chengxiang, L., Rahman M.T., Gao, C., Nie, R. (2015) Anti-diabetic activity of peony seed oil, a new resource food in STZ-induced diabetic mice. *Food Funct.* **6(9)**, 2930-2938.
- Sun, C.D., Zhang, B., Zhang, J.K., Xu, C.J., Wu, Y.L., Li, X. (2012) Cyanidin-3-glucoside-rich extract from Chinese bayberry fruit protects pancreatic  $\beta$  cells and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *J. Med. Food.* **15(3)**, 288-298.
- Štefan, L., Tepšić, T., Zavidčić, T., Urukalo, D., Tota, R., Domitrović, R. (2007) Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina* **43**, 84–93.
- Tafaesse, T.B., Hymete, A., Mekonnen, Y., Tadesse, Y. (2017) Antidiabetic activity and phytochemical screening of the leaves of *Ajuga remota* Benth on alloxan-induced diabetic mice. *BMC Complement. Altern. Med.* **17(1)**, 243.
- Takemoto, K., Tanaka, M., Iwata, H. (2009) Low catalase activity in blood is associated with the diabetes caused by alloxan. *Clin. Chim. Acta.* **407**, 43-46.
- Takikawa, M., Inoue, S., Horio, F., Tsuda, T. (2010) Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J. Nutr.* **140(3)**, 527-533.
- Tang, D., Liu, L., Ajiakber, D., Ye, J., Xin, X., Akber Aisa, H. (2018) Anti-diabetic Effect of Punica granatum Flower Polyphenols Extract in Type 2 Diabetic Rats: Activation of Akt/GSK-3 $\beta$  and Inhibition of IRE1 $\alpha$ -XBP1 Pathways. *Front. Endocrinol.* **9**, 586.
- Teng, H., Chen, L. (2019) Polyphenols and bioavailability: an update. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **59(13)**, 2040-2051.
- Teng, H., Fang, T., Lin, Q., Song, H., Liu, B., Chen, L. (2017) Red raspberry and its anthocyanins: Bioactivity beyond antioxidant capacity. *Trends Foods Sci. Tech.* **66**, 153-165.
- Terao, J. (2017) Factors modulating bioavailability of quercetin-related flavonoids and the consequences of their vascular function. *Biochem. Pharmacol.* **139**, 15-23.



- 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.
- Tourkey, M.J. Effects of moringa oleifera aqueous leaf extract in alloxan induced diabetic mice. *Inverv. Med. Appl. Sci.* **8(3)**,109-17.
- Tsao, R. (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2**, 1231-1246.
- Ullah, A., Khan, A., Khan, I. (2016) Diabetes mellitus and oxidative stress –a concise review. *Saudi. Pharm. J.* **5**, 547-553.
- Umeno, A., Horie, M., Murotomi, K., Nakajima, Y., Yoshida, Y. (2016) Antioxidative and antidibaetic effects of natural polyphenols and isoflavones. *Molecules* **21**, 1-15.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-Biol. Interact.* **160(1)**, 1-40.
- Vander Mijinsburgge, K., Turcsan, A., Depypere, L., Steenackers, M. (2016) Variance, genetic control, and spatial phenotypic plasticity of morphological and phenological traits in *Prunus spinosa* and its large fruited forms (*P. X fruticans*). *Front. Plant Sci.* **7**, 1-13.
- Varshney, R., Mishra, R., Das, N., Sircar, D., Roy, P. (2019) A comparative analysis of variuos flavonoid sin the regulation of obesity and diabetes: an in vitro and vivo study. *J. Funct. Foods* **59**, 194-205.
- Velderrain-Rodriguez, G.R., Palafox-Carlos, H., Wall-Medrano, A., Ayala-Zavala, J.F., Chen, C-Y., O., Robles-Sanchez, M., Astiazaran-Garcia, H., Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G.A. (2014) *Food Funct.* **5(2)**, 189-197.
- Veličković, J.M., Kostić, D.A., Stojanović, G.S., Mitić, S.S., Mitiž, M.N., Randelović, S.S., Đorđević, A.S. (2014) Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. *Hem. Ind.* **68**, 297-303.
- Vogt, T. (2010) Phenylpropanoid Biosynthesis. *Mol. Plant.* **3**, 2-20.
- Walle, T., Browning, A.M., Steed, L.L., Reed, S.G., Walle, U.K. (2003) Flavonoid glucosides are hydrolysed and thus activatd in the oral cavity in humans. *J. Nutr.* **135**, 48–52.
- Wang, J., Xu, J., Gong, Y., Yang, M., Zhang, X., Li, M. (2019) Biosynthesis, chemistry and pharmacology of polyphenols from Chinese *Salvia* species: A review. *Molecules* **24**, 155.

- Wedick, N.M., Pan, A., Cassidy, A., Rimm, E.B., Sampson, L., Rosner, B.(2012) Dietary flavonoid intakes and risk of type 2 diabetes in US men and women. *Am J Clin Nutr.* **95(4)**, 925-33.
- West, I. C. (2000) Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet. Med.* **17**, 171-180.
- Wiese, S., Esrabeyiglu, T., Winterhalter, P., Kruse, H.P., Winkler, S., Bub, A., Kulling, S.E. (2015) Comparative biokinetics and metabolism of pure monomeric, dimeric, and polymeric flavan-3-ols: a randomized cross-over study in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **59(4)**, 610-621.
- Williams, R.J., Spencer, J.P., Rice-Evans, C. (2004) Flavonoids: Antioxidants or signaling molecules? *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 838-849.
- Williamson, G., Clifford, M.N (2017) Role of the small intestine, colon and microbiota in determining the metabolic fate of polyphenols. *Biochem. Pharmacol.* **139**, 24-39.
- Wojnar, W., Zych, M., Kaczmarczyk-Sedlak (2018) Antioxidative effect of flavonoid naringenin in the lenses of type 1 diabetic rats. *Biomed. Pharmacother.* **108**, 947-984.
- Wright Jr., E., Scsim-Bacon, J.L., Glass, L.C (2006) Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *Int. J. Clin. Pract.* **60**, 308-314.
- Wu, H.-Y., Yang, K.M., Chiang, P.Y.(2018) Roselle antoxyanins: antioxidant properties and stability to heat and pH. *Molecules* **23(6)**, 1357.
- Xie, L., Lee, S.G., Vance, T. Wang, Y., Kim, B., Lee, J-Y, Chun, O.K., Bolling, B.W. (2016) Bioavailability of anthocyanins and colonic polyphenol metabolites following consumption of aronia berry extract. *Food Chem.* **211**, 860-868.
- Xing, T., Kang, Y., Xu, X., Wang, B., Du, M., Zhu, M.J. (2018) Raspberry supplementation improves insulin signaling and promotes brown like adipocyte development in white adipose tissue of obese mice. *Mol Nutr Res.* **62(5)** <https://doi.org/10.1002/mnfr.201701035>
- Yamashita, Y., Okabe, M., Natsume, M., Ashida, H. (2012) Prevention mechanisms of glucose intolerance and obesity by cacao liquor procyanidin extract in high-fat diet-fed C57BL/6 mice. *Arch. Biochem. Biophys.* **527**, 95-104.
- Yang, D.K., Kang, H-S. (2018) Anti-Diabetic Effect of Cotreatment with Quercetin and Resveratrol in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Biomol Ther.* **26(2)**, 130-138.
- Yin, P., Wang, Y., Yang, L., Sui, J., Liu, Y. (2018) Hypoglycemic effects in alloxan-induced diabetic rats of the phenolic extract enriching ellagic acid, kaempferol and their derivatives from Mongolian oak cups. *Molecules* **23**, 1-14.
- Yoo, K.S., Lee, E.J., Patil, B.S. (2010) Quantification of quercetin glycosides in 6 onion cultivars and comparisons of hydrolysis-HPLC and spectrophotometric methods in measuring total quercetin concentrations. *J. Food Sci.* **75**, 160–165.

- Yousuf, B., Gul, K., Wani, A.A., Singh, P. (2016) Health benefits of anthocyanins and their encapsulation for potential use in food systems: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56(13)**, 2223-2230.
- Zakon o dobrobiti životinja (2017) Narodne novine 102, Zagreb.
- Zamocky, M., Koller, F. (1999) Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Prog. Biophys. Biol.* **72**, 19-66.
- Zhang, X., Lv, Q., Jia, S., Chen, Y., Sun, C., Li, X., Chen, K. (2016) Effects of flavonoid-rich Chinese bayberry (*Morella rubra* Sieb. et Zucc.) fruits extract on regulation glucose and lipids metabolism in diabetic KK-A<sup>y</sup> mice. *Food Funct.* **7(7)**, 3130-3140.
- Zhao, L., Chen, C., Qui, Y., Zhou, J., Jiang, L., Guan, Y.H. (2015) Recovery of beta-amylase by hybrid UF membranes from the soy whey wastewater. *J. Bioprocess Biotech.* **5**, 1-7.
- Zheng, Y., Tian, J., Yang, W., Chen, S., Liu, S., Liu, D., Fang, H., Zhang, H., Ye, X. (2020) Inhibition mechanism of ferulic acid against  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosase. *Food Chem.* **317**.

## 8. ŽIVOTOPIS

Irena Crnić rođena je 23.08.1990. u Zagrebu, Hrvatska. Diplomirala 2015.godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na smjeru Prehrambeno inženjerstvo. 2017. godine upisuje Poslijediplomski sveučilišni doktorski studij Biotehnologija i bioproceno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam, studijski smjer Nutricionizam. Tijekom godina rada svladala je mnoge molekularne i imunološke metode poput imunoenzimskih ELISA testova, kromatografskih metoda, metoda procjene antioksidacijskog statusa. Tijekom doktorskog studija također je savladala povezanost nutritivnog statusa sa metaboličkim procesima, te kako predvidjeti i analizirati posljedice poremećaja u pojedinim metaboličkim putevima. Od 2015. bila je zaposlena u Zvijezdi d.d. gdje je sudjelovala na brojnim edukacijama i seminarima u području prehrambene tehnologije i inženjerstva čime je doprinijela unaprjeđenju sustava kvalitete kao i razvoju novih proizvoda. Od 2019. do danas zaposlena je u Imunološkom Zavodu kao stručni specijalist u Odjelu za osiguranje kvalitete gdje sudjeluje u uvođenju principa dobre proizvođačke prakse kroz educiranje radnika, kreiranje i kontrolu dokumentacije te provođenje internih nadzora, kao i nadzora nad prikupljanjem plazme u okviru Nacionalnog plana opskrbe Republike Hrvatske lijekovima proizvedenim iz ljudske plazme 2019. – 2022. Volonterski je radila na Nastavnom Zavodu za javno zdravstvo Dr. Andrija Štampar u Centru za preventivnu medicinu gdje je sudjelovala u izradi prehrambenih smjernica za unaprjeđenje zdravlja te smanjenja rizika od kroničnih nezaraznih bolesti, primjenjujući tako znanja stečena tijekom doktorskog studija. Objavila je više znanstvenih radova i sudjeluje sa radovima na brojnim međunarodnim znanstvenim i stručnim skupovima.

### POPIS OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

#### Znanstveni radovi iz skupine a1

- Crnić, I., Frančić, T., Dragičević, P., Balta, V., Dragović Uzelac, V., Đikić, D., Landeka Jurčević, I. (2021) Blackthorn Flower Extract Modulate Glycemic Homeostasis in Normoglycemic and Alloxan Induced Hyperglycemic C57BL/6 Mice. *Food Technol. Biotechnol.* **59(3)**, 349-359.

## Quartile - Q2

- Balta, V., Đikić, D., Crnić, I., Odeh, D., Oršoli, N., Kmetić, I., Murati, T., Dragović Uzelac, V., Landeka Jurčević, I. (2020) The effects of four-week intake of blackthorn flower extract on mice tissue antioxidant status and phenolic content. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **70**, 361-375.

## Znanstveni radovi iz skupine a3

- Landeka Jurčević, I., Đikić, D., Zorić, Z., Balta, V., Fabijančić, I., Dragović-Uzelac, V., Padovan, J. (2019) Preferences of different polyphenol groups of *Prunus Spinosa* L. flower extract toward organ bioaccumulation in *in vivo* model of absorption in C57BL/6 mice. Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology HDBMB-2019 – CROSSROADS IN LIFE SCIENCES, September 25-28, 2019., Lovran, Croatia. Book of Abstracts, pp. 122.
- Landeka Jurčević, I., Frančić T., Fabijančić I., Dragović-Uzelac V., Đikić, D. (2018) Utjecaj polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine na dijabetes tipa 2 u C57BL/6 miša. International Conference 17<sup>th</sup> Ružička days Today Science – Tomorrow Industry, PROCEEDINGS, September, 19-21, 2018, Vukovar, Hrvatska. pp. 97-111. ISSN: 2459-9387

## Kongresna priopćenja

1. Fabijančić, I., Đikić, D., Landeka Jurčević, I. (2018) Protective effects of polyphenols in the prevention of metabolic syndrome. 7<sup>th</sup> Croatian Congress of obesity
2. Fabijančić, I., Landeka Jurčević, I., Đikić, D., Frančić, T. (2018) Antioxidative effects of resveratrol on Alzheimer disease. 2<sup>nd</sup> Congress of Croatian Society of Nutritionists and Dietitians.
3. Landeka Jurčević, I., Frančić, T., Fabijančić, I., Dragović Uzelac, V., Đikić, D. (2018) Utjecaj polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine na dijabetes tipa 2 u C57BL/6 miša. 17<sup>th</sup> Ružička days Today science-tomorrow industry.
4. Landeka Jurčević, I., Fabijančić, I., Frančić, T., Dragović Uzelac, V., Balta, V., Đikić, D. (2018) Dietary polyphenols (extract flower *Prunus spinosa* L.) and type-2 diabetes mellitus. 9<sup>th</sup> International Congress of Food Technologist Biotechnologist and Nutritionist.
5. Fabijančić, I., Đikić, D., Landeka Jurčević, I. (2018) Modulation of the gut microbiota by the wine polyphenols. 6<sup>th</sup> International Congress of Nutritionists.

6. Fabijančić, I., Đikić, D., Landeka Jurčević, I. (2018) Effects of anthocyanins on type 2 diabetes glycemic control. 6<sup>th</sup> International Congress of Nutritionists.
7. Fabijančić, I., Đikić, D., Landeka Jurčević, I. (2018) Bioavailability of polyphenolic compounds of *Prunus spinosa* L. flower extract in the organs of C57BL/6 mouse. 6<sup>th</sup> International Congress of Nutritionists.
8. Molnar, D., Fabijančić, I. (2018) Effects of tart cherry products on exercise performance and recovery after exercise. 6<sup>th</sup> International Congress of Nutritionists.
9. Landeka Jurčević, I., Đikić, D., Zorić, Z., Balta, V., Fabijančić, I., Dragović Uzelac, V., Padovan, J. (2019) Preferences of different polyphenol groups of *Prunus spinosa* L. flower extract toward organ bioaccumulation in a *n vivo* model of absorption in C57BL/6 mice. Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology HDMBM-2019 -CROSSROADS IN LIFE SCIENCES.
10. Landeka Jurčević, I., Crnić, I., Frančić, T., Dragičević, P., Đikić, D. (2020) Advanced oxidation protein products levels as a marker of oxidative stress in mice with hyperglycemia. 18<sup>th</sup> Ružička Days "Today Science-Tomorrow Industry".
11. Crnić, I., Dragičević, P., Landeka Jurčević, I., Đikić, D. (2021) Polyphenols from *Prunus spinosa* L. flower extract impact on  $\alpha$ -amylase activity in alloxan induced hyperglycemic C57BL/6 mice. 13<sup>th</sup> international scientific and professional conference- "With food to health".