

# Učinak flavonoida na frekvenciju mikronukleusa u krvi miševa s dijabetesom

---

**Goričanec, Antonia**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2009**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:201127>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-23**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**Sveučilište u Zagrebu**

**Prirodoslovno – matematički fakultet**

**Biološki odsjek**

**Antonia Goričanec**

**Učinak flavonoida na frekvenciju mikronukleusa u krvi miševa s  
dijabetesom**

**Diplomski rad**

**Zagreb, 2009.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Biološkom odsjeku, u Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Nade Oršolić, i predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja naziva diplomirani inženjer biologije, smjer molekularna biologija.

*Zahvaljujem se voditeljici prof. dr. sc. Nadi Oršoli na predloženoj temi, znanstvenoj i stručnoj pomoći, susretljivosti, mnogobrojnom savjetima, te iskrenoj predanosti, prema ovom radu i prema meni samoj, tijekom naše suradnje.*

*Zahvaljujem Damiru Sirovini na ljubaznosti, susretljivosti, prijateljskim savjetima i velikoj pomoći tijekom izrade ovog rada.*

*Hvala i svim djelatnicima Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na stručnoj i tehničkoj pomoći u izvođenju eksperimenata i izrade rada.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveu ilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matemati ki fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### **U INAK FLAVONOIDA NA FREKVENCIJU MIKRONUKLEUSA U KRVI MIŠEVA S DIJABETESOM**

**Antonia Gori anec**

Zavod za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno – matemati ki fakultet, Sveu ilište u Zagrebu

#### **SAŽETAK**

Mikronukleus testom istražili smo mogu i antidijabeti ki u inak pripravaka epigalokatehin galata (EGCG-a) i flavonoida propolisa (kvercetina, naringina, naringenina i krizina) u miševa s dijabetesom. Tip 1 dijabetesa induciran je u miševa injekcijom aloksana u dozi od 75 mg/kg *iv*. Drugog dana nakon injiciranja dolazi do zna ajnog pove anja razine glukoze u krvi, u odnosu na kontrolnu skupinu miševa neobra enih aloksanom. Dnevnom obradom miševa flavonoidima i EGCG-om u dozi od 50 mg/kg, tijekom 7 dana, zabilježeno je poboljšanje op eg stanja životinja s dijabetesom. Primjenom EGCG-a / flavonoida u slu ajevima ranog dijabetesa dolazi do znatno pove anog broja mikronuleusa u retikulocitima periferne krvi u odnosu na dijabeti ne životinje bez obrade. Obrada dijabeti nih životinja naringeninom ili kvercetinom u kasnom dijabetesu dovela je do smanjenja broja mikronukleusa u retikulocitima u odnosu na neobra ene životinje s dijabetesom; dok obrada s EGCG-om pokazuje neznatni porast broja mikronukleusa. Istraživanja doza-ovisnog u inka, kao i razine antioksidativnih enzima, pridonijeti e boljem poznavanju u inkovitosti flavonoida i EGCG-a u smanjivanju posljedica dijabetesa. Neki od rezultata pokazuju obe avaju i antidijabeti ki u inak flavonoida / EGCG-a.

(stranica: 40, slika: 12, literaturnih navoda: 77, jezik izvornika – hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici, Rooseveltov trg 6, Zagreb

Ključne riječi: dijabetes, oksidativni stres, antioksidansi, flavonoidi, mikronukleus test

Voditelj: Prof.dr.sc. Nada Oršoli

Ocjenitelji: Prof. dr. sc. Mirjana Kalafati

Doc. dr. sc. Mirta Tkalec

Rad prihva en: 09.09.2009.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

### **EFFECT OF FLAVONOIDS ON MICRONUCLEI FREQUENCY IN BLOOD OF DIABETIC MICE**

**Antonia Gori anec**

Department of Animal Fiziology, Faculty of Science, University of Zagreb

#### **ABSTRACT**

Using micronucleus test we investigated the possible antidiabetic effects of epigallocatechin gallate (EGCG) and flavonoids derived from propolis (quercetin, naringin, naringenin and chrysin) in diabetic mice. Type 1 diabetes was induced in mice by injection of alloxan in dose of 75 mg/kg *iv*. Two days after injection the level of blood glucose was representatly increased compared to healty mice group without alloxan treatment. With daily intake of EGCG and flavonoids in dose of 50 mg/kg during 7 days the general status of diabetic animals was improved. Treatment of mice with EGCG/flavonoids in cases of early diabetes increased the number of micronuclei in peripheral blood reticulocytes compared to diabetic animals without treatment. Number of micronuclei in mice treated with naringenin, quercetin in later diabetes was decreased in relation to nontreated diabetic animals, while treatment of mice with EGCG slightly increased the number of micronucleus. Research of dose-dependent effect, as well as antioxidative enzymes, are contributing better understanding of flavonoid and EGCG efficiency in reducing outcomes of diabetes. Some of the results show promising antidiabetic effect of flavonoids/EGCG.

(pages: 40, figures: 12, references: 77, original in Croatian)

Thesis deposited in: Central Biological Library, Roosevelt square 6, Zagreb

Keywords : diabetes, oxidative stress, antioxidants, flavonoids, micronucleus test

Supervisor: Nada Oršoli , PhD, Associate Professor

Reviewers: Mirjana kalafati , PhD, Professor

Mirta Tkalec, Assistant Professor

Thesis accepted: 09.09.2009.

# 1 UVOD

## 1.1 DIABETES MELLITUS – ŠEĆERNA BOLEST

Dijabetes, ili šećerna bolest, je metabolički poremećaj karakteriziran potpunim ili djelomičnim nedostatkom izlučivanja inzulina, koji je nužan za prijenos glukoze iz krvi u tkiva, uslijed čega se javljaju poremećaji u metabolizmu proteina, lipida i ugljikohidrata, te prvenstveno povećanje količine glukoze u krvi. Inzulin je prirodni hormon, izlučen iz  $\beta$ -stanica Langerhansovih otočica gušterače; javlja se kao odgovor na smanjenu razinu glukoze u krvi. Od pojave prvog terapijskog inzulina 1921. godine, dijabetes se smatrao izlječivim ali kroničnim stanjem, te su glavni rizik za zdravlje predstavljale dugoročne komplikacije koje ta bolest nosi (kardiovaskularne bolesti – dvostruki rizik, kronično zatajenje bubrega, oštećenja bubrega koja mogu dovesti do sljepoće, što je jedan od najznačajnijih uzroka sljepoće u odraslih ljudi; oštećenje živaca, impotencija, gangrene s rizikom amputacije nožnih prstiju, stopala, ili čak i noge). Reguliran je genetskim, endokrinim, metaboličkim, neurološkim, farmakološkim, okolišnim i prehranbenim čimbenicima (Oršolić i Bašić, 2008).

Šećerna bolest se utvrđuje mjerenjem razine glukoze u krvi natašte, u dva neovisna nalaza, čiji je pokazatelj vrijednost glukoze od  $7.0 \text{ mM L}^{-1}$  ili više.

### 1.1.1 TIPOVI DIJABETESA

#### 1.1.1.1 TIP 1 DIJABETESA

Tip 1 dijabetesa je ovisan o inzulinu (liječi se intravenoznim unosom inzulina u organizam). Tip 1 je karakteriziran ili vrlo niskom razinom inzulina, ili potpunim izostankom inzulina-producirajućih  $\beta$ -stanica Langerhansovih otočica gušterače. Čimbenici koji ga uzrokuju još su uvijek nedovoljno poznati; no pojedini virusi, autoimune bolesti i genetski

faktori mogu tome pridonijeti. Bolest se naj češće javlja u djece ili odraslih ispod 40 godina, iako se može javiti u bilo kojoj životnoj dobi.

Ustanovljeno je da je prevalencija dijabetesa tipa 1 bila za 40% veća 2010. godine nego 1997. godine, no još uvijek nije otkriven lijek koji bi spriječio ovaj tip bolesti.

#### **1.1.1.2 TIP 2 DIJABETESA**

Tip 2 dijabetes je dijabetes koji se u 90% slučajeva javlja kod odraslih (adultni dijabetes), no sve se češće javlja i kod oboljelih u mlađoj životnoj dobi. Neovisan je o inzulinu. Tip 2 nastaje tijekom kombinacije nedovoljnog izlučivanja inzulina i nezadovoljavajućeg odgovora na inzulin (esto nazvano i rezistencijom na inzulin). U ranim stadijima predominantni poremećaj je reducirana osjetljivost na inzulin, karakterizirana povišenjem razine inzulina u krvi.

Tip 2 je tip bolesti gdje organizam još uvijek proizvodi inzulin, no ili u nedovoljnim količinama, i/ili u tijelu rezistentnom na inzulin. Duže izlaganje  $\beta$ -stanica gušterače visokim razinama glukoze u krvi uzrokuje disfunkciju  $\beta$ -stanica, povezanu sa izlučivanjem inzulina i njegovom biosintezom. Rezistencija na inzulin povećava proizvodnju u jetri i smanjuje porast u adipoznim tkivima (Jung i sur., 2006).

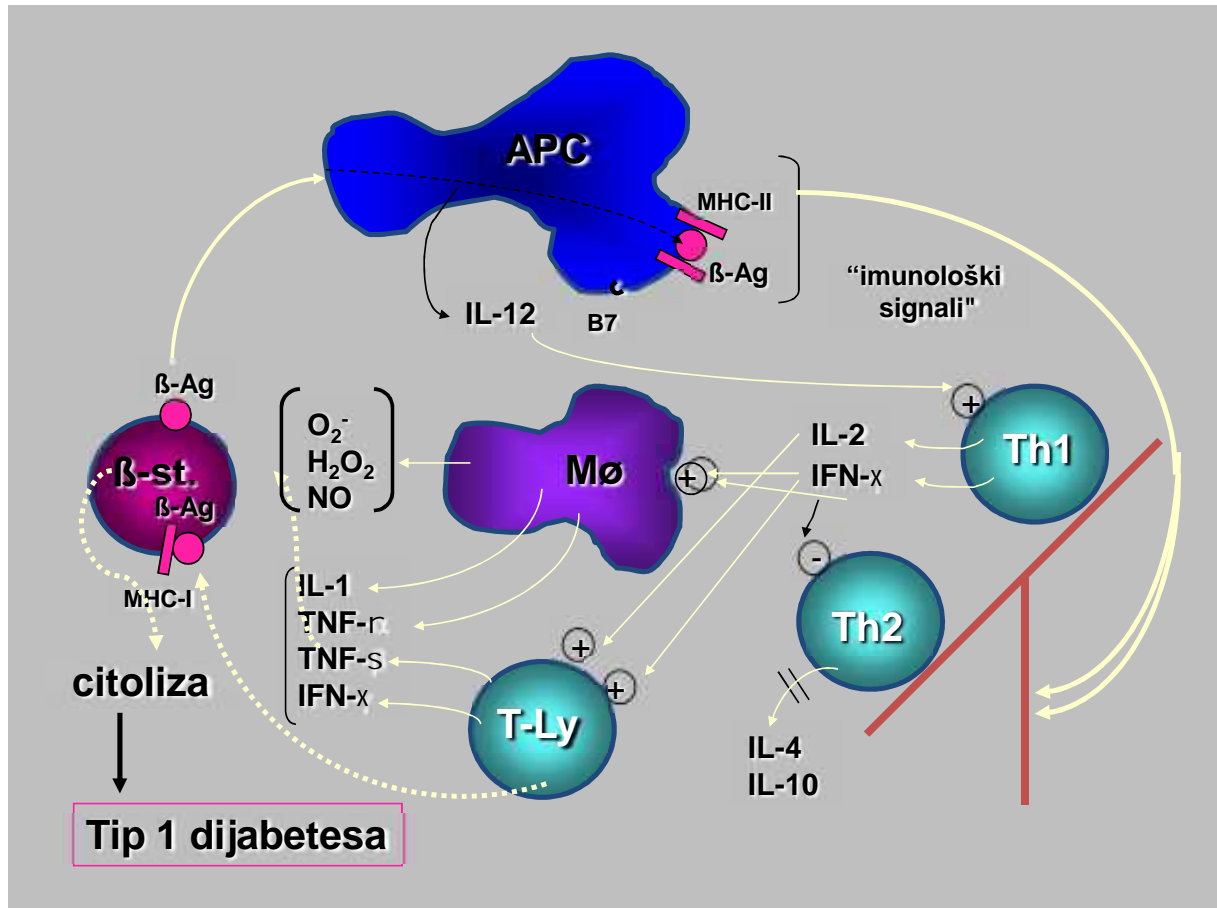
#### **1.1.1.3 GESTACIJSKI DIJABETES**

Gestacijski dijabetes je dijabetes koji se javlja tijekom trudnoće. Može biti privremen (hormoni koji se luče u trudnoći povećavaju otpornost prema inzulinu). Iako privremen, može oštetiti zdravlje fetusa ili majke. Zahvaća oko 2-5% trudnica, i kod većine nestaje nakon poroda; no kod više od polovice kod kojih se javio gestacijski dijabetes (oko 4%), kasnije se razvije dijabetes tipa 2 (Oršolić i Bašić, 2008).



## 1.2 OKSIDATIVNI STRES

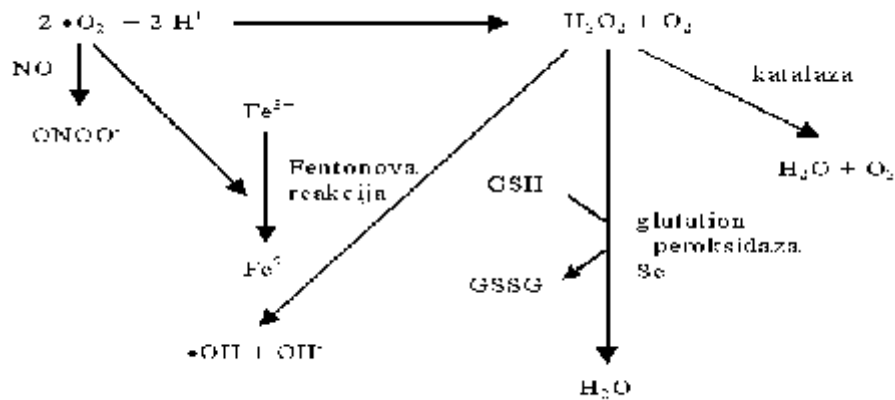
U razvoju dijabetesa važnu ulogu ima oksidativni stres (Slika 1).



Slika 1. Zna enje oksidativnog stresa u patogenezi dijabetesa

Pod pojmom oksidativni stres podrazumijeva se stanje u kojem su oksido-redukcijski procesi u stanicama pomaknuti prema oksidaciji, zbog ega prekomjerno stvaranje slobodnih kisikovih radikala i reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) nadilazi mogu nost njihovog uklanjanja. Pri tome dolazi do gubitka ravnoteže stvaranja slobodnih radikala i mogu nosti neke stanice da ih razgradi, a rezultat su promjene vezane za ošte enje stanica. Ovu promjenu mogu uzrokovati razli iti procesi koji poti u stvaranje reaktivnih kisikovih i dušikovih

spojeva (RNS) (Slika 2). Oksidativni stres može nastati na razini stanica, tkiva ili čak organizma.



Slika 2. Nastanak slobodnih radikala i njihova neutralizacija tijekom ishemijsko/reperfuzijske ozljede

Na razini stanice štetno djelovanje slobodnih radikala nastaje njihovim ulaskom u oksidacijske ili redukcijske reakcije sa staničnim makromolekulama. Pod štetnim djelovanjem reaktivnih kisikovih spojeva najčešće se misli na oštećenja DNA koja mogu uzrokovati promjenu (mutaciju) ili smrt stanice (Žarković i sur., 2001).

Oksidativni stres je postao jedan od važnih subjekata u proučavanju dijabetesa. Povećanje slobodnih kisikovih radikala u dijabetesu može biti uzrok povećanja razine glukoze u krvi (Oršolić i Bašić, 2008).

### 1.2.1 ANTIOKSIDANSI

Kako bi se zaštitile od štetnog djelovanja reaktivnih kisikovih spojeva, stanice stvaraju antioksidanse koji uklanjaju i/ili obnavljaju oksidirane molekule. Postoje enzimski i neenzimski antioksidansi. U neenzimske antioksidanse ubrajaju se flavonoidi. Tijekom života stanice u inkovitost ekspresije gena uklju enih u stvaranje antioksidansa se može smanjiti ili u potpunosti nestati, a procesi stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva u slu aju oslabljenih mogu nosti njihove detoksifikacije mogu dovesti do ireverzibilnih ošte enja makromolekula.

Antioksidans je tvar koja prisutna u niskoj koncentraciji, u odnosu na tvar koja se oksidira, zna ajno odga a ili sprje ava oksidaciju te tvari. Posljednjih godina se izdvaja sve više skupina spojeva s antioksidativnim u inkom, od kojih su jedni od najspominjanijih fenoli (flavonoidi) (Žarkovi i sur., 2001).

### 1.3 FLAVONOIDI

Flavonoidi ine preko 45% mase propolisa. To je skupina biljnih pigmenata, topljivih u vodi, koji daju boju mnogim biljkama. Otkrio ih je ma arski biokemi ar, nobelovac Albert Szent-Gyorgi tridesetih godina prošlog stolje a, i dao im ime „vitamin P“. Utvrdio je da su zaslužni za bolju apsorpciju vitamina C i štite ga od oksidacije, ime poja avaju njegovo djelovanje. Do danas je otkriveno više od 8000 flavonoida (Cotelle, 2001).

Flavonoidi su u inkoviti antioksidansi. Proizvodi su biljnog metabolizma, vrlo su izdašni u hrani. Mogu zaštititi od mnogih kroni nih bolesti. Djeluju na na in da inhibiraju vezanje slobodnog radikala na DNA (Oršoli i Baši , 2008).

Širok spektar različitih bioloških aktivnosti, uključujući i antibakterijske, protuupalne i antikancerogene u inke posredovane različitim mehanizmima, povezani su s flavonoidnim komponentama.

Iskoristivost, apsorpcija i metabolizam flavonoida u organizmu ovise o njihovoj bioraspoloživosti – otpuštanje u probavnom sustavu, otpornost na crijevnu floru, apsorpcija u tankom crijevu, metaboliziranje u probavi i dr. Flavonoide nalazimo u urinu i plazmi, dok se u koštanoj moždini nalaze u tragovima, nakon uzimanja hrane bogate flavonoidima (Aherne i O'Brien, 2002; Yamashita i sur., 2002; Manach i sur., 2004; Walle, 2004).

Apsorpcija polifenola ovisi o njihovoj strukturi (stupanj glikozilacije, veličina molekula i stupanj konjugiranosti s drugim polifenolima). Od flavonoida posebice glikozidi i slobodni aglikoni podliježu razgradnji mikroorganizmima u probavnom sustavu, a za njihovu reapsorpciju je potrebna hidroliza šećernih skupina. Većina polifenola se metabolizira u jetri, neki u stjenici tankog crijeva i bubrezima (Ji, 1999; Aherne i O'Brien, 20002; Yamashita i sur., 2002; Manach i sur., 2004).

Na početku, slobodni radikali napadaju staničnu membranu i membranu jezgre, zatim napadaju DNA molekule, zajedno s proteinima i lipidima. Slobodni radikali imaju važnu ulogu u procesu kancerogeneze, miokardijalne ishemije, razvoju sklerotičnih plakova u arterijama, određenim neurološkim bolestima, procesu starenja i ostalim degenerativnim stanjima. Stupanj antioksidativnih svojstava flavonoida temeljen je na strukturi dane molekule, te pokazuje pozitivnu korelaciju sa stupnjem hidroksilacije. Flavonidi imaju sposobnost neutraliziranja visoko reaktivnih hidroksi radikala; oni zadržavaju svoje antioksidativne osobine nakon formiranja kompleksa s metalnim ionima (Erdos i Szabo).

Flavonoidi imaju različite strukture. Osnovni kostur sadrži 15 C-atoma raspoređenih u dva aromatska prstena međusobno povezana mostom od tri C-atoma. Klasificiraju se na:

antocijane, flavone, flavonole i izoflavone. Neke od njih, ije djelovanje smo prou avali, nalazimo u propolisu: kvercetin, naringin, naringenin, krizin.

### 1.3.1 KVERCETIN

Kvercetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) (Slika 3) jedan je od naj eš e korištenih prirodnih flavonoida, javljaju i se u glikoziliraju em obliku kao rutin (5,7,3',4'-OH,3-rutinoza). Kvercetin i rutin su flavonoidi naj eš e korišteni u hrani.

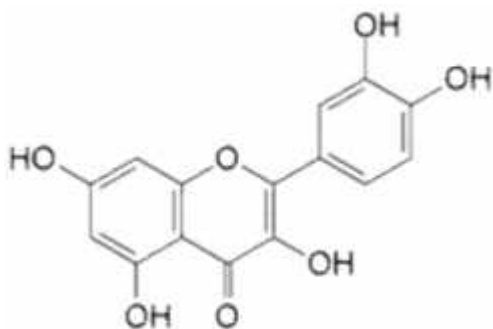
Kvercetin je vrlo jaka antioksidativna tvar; njegovo djelovanje pokazuje izuzetno pozitivan u inak na ljudski organizam. Pripada skupini bioflavonoida, bogato je zastupljen u mnogim biljnim vrstama (luk, kupusnja e, jabuke, bobi asto vo e, razne sjemenke, crni aj, crno vino, propolis p ela). Smatra se prete om svih bioflavonoida. Osobito je zastupljen u svježem crvenom luku (300 mg kg<sup>-1</sup>). Istraživanja pokazuju njegovo protuupalno, antialergijsko, antivirusno i zna ajno antikancerogeno djelovanje. Djelotvoran je kod raznih oboljenja – leukemija, karcinom dojke, jajnika, želuca, jetre; a pozitivan utjecaj kvercetina ostvaruje se blokiranjem rasta malignih stanica i sinteze DNA.

Kvercetin sakuplja slobodne radikale kisika (Saija i sur., 1995; Miller, 1996), inhibira ksantin oksidaze (Chang i sur., 1993) i inhibira lipidnu peroksidaciju *in vitro* (Chen i sur., 1990). U zaštiti ljudskih lipoproteina niske gusto e (LDL) od oksidacije pokazuje snažniji antioksidativni u inak od vitamina E (Frankel, 1993). Antioksdativni u inak kvercetina se poja ava u prisutnosti askorbata (vitamin C). Djelovanje kvercetina je dokazano na mnogim enzimatskim sustavima sisavaca: inhibicija protein kinaze C (Graziani i sur., 1982); inhibicija fosfolipaze A<sub>2</sub> (Lee i sur., 1982); reverzne transkriptaze (Nakane i Ono, 1990); HIV-1 proteinaze (Brinkowort i sur., 1992); topoizomeraza (Yamashita i sur., 1990); glutation S-transferaze (Zhang i Das, 1994); ksantin oksidaze (Chang i sur., 1993); amilaza (Lee i sur., 1982) i dr. Velik broj istraživanja usmjeren je prema genotoksi nom u inku kvercetina.

Mehanizmi geneti kog ošte enja kvercetinom nisu još u potpunosti poznati. Smatra se da bi apoptoze i mutacije pobu ene kvercetinom, a posredovane  $H_2O_2$ , mogle biti povezane s kancerogenim u inkom kvercetina (Yamashita i sur., 2000). Istraženo je i djelovanje kvercetina na ošte enja DNA putem slobodnih radikala (Gaspar i sur., 1994). Kvercetin može stvarati  $OH\cdot$ , koji nemaju genotoksi ni u inak sve dok je pH medija ispod 8,0.

Jedan od najvažnijih mehanizama genotoksi nosti u stanicama sisavaca je stvaranje ROS-a. Dokazana je zaštitna uloga kvercetina (u fiziološkim uvjetima pH) protiv oksidativnih ošte enja izazvanih ROS-om (Rueff i sur., 1992). Brojna istraživanja potvr uju zaštitne u inke flavonoida na stani nu vijabilnost, aktivnost endogenih stani nih enzima i cjelovitost DNA na stani nim linijama ljudskih limfocita nakon ošte enja DNA prouzro enih s  $H_2O_2$  (Aherne, 1999; Duthie i sur., 1997a). Kvercetin u niskim koncentracijama (10  $\mu M$ ) sakuplja slobodne radikale i zna ajno inhibira oksidativna ošte enja DNA, dok u visokim koncentracijama (100  $\mu M$ ) pobu uje ošte enja (Duthie i sur., 1997b; Johnson i Loo, 2000). Dakle, kvercetin može biti i antioksidans i prooksidans, ovisno o koncentraciji i izvoru slobodnih radikala u stanici (Lee i sur., 2003).

Pozitivno djelovanje kvercetina kod ljudi oboljelih od dijabetesa, o ituje se u smanjenju dijabeti kih komplikacija kao što su katarakta, retinopatija i neuropatija. Njegov utjecaj na regulirano izlu ivanje inzulina štiti -stanice guštera e od ošte enja. Terapija kvercetinom smanjuje razinu glukoze, kolesterola i triglicerida u krvi štakora s dijabetesom, dok u zdravih životinja uzrokuje malo pove anje razine triglicerida i kolesterola (Vessal i sur. 2003). Primijenjen preventivno, i tijekom razvoja dijabetesa izazvanog streptozotocinom (STZ), kvercetin poboljšava antioksidativni status i smanjuje posljedice oksidativnog stresa u štakora s dijabetesom (Coskun i sur., 2004).

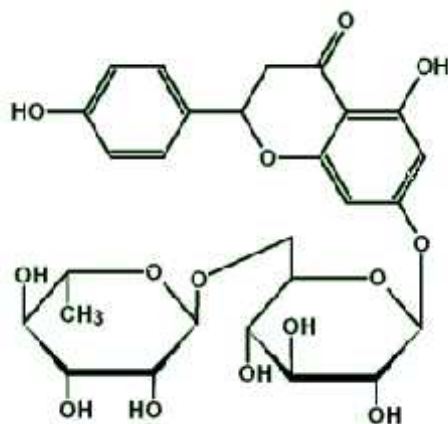


Slika 3. Strukturna formula kvercetina ( $C_{15}H_{10}O_7$ )

Kada se primjenjuje oralno apsorbira se u probavni sustav uvijek u siromašnim količinama, te tako nema veliki učinak na ciljani organ. Glavni je flavonoid u dijetama; dnevni unos kvercetina putem hrane se procjenjuje na 50 – 500 mg. Primjenjen peritonealno u samo jednoj dozi od  $15 \text{ mg kg}^{-1}$  po štakoru, ekvivalentan je oko 1000 mg po osobi od 70 kg (Coskun i sur., 2004).

### 1.3.2 NARINGIN

Glavni flavonoidni glikozid (Slika 4), odnosno konjugat naringenina s molekulom šećera ramnoglukozida, u grejpu (odgovoran za gorak okus soka grejpa) (Oršolić i Josipović, 2008). U ljudskom organizmu metabolizira se u flavon naringenin. Naringin pokazuje različito farmakološko djelovanje (antioksidativno, protuonkogeno, smanjuje količinu kolesterola u krvi). Smanjuje oksidaciju lošeg kolesterola LDL-a i pomaže u prevenciji hiperkolesterolemije (Safari i Sheikh, 2003). Istraživanja su pokazala promjene u antioksidativnoj aktivnosti štakora, kao rezultat izloženosti organizma naringinu i crvenom grejpu. Naringin je inhibitor aldoza reduktaze, može pomoći u borbi protiv bolesti vezanih uz dijabetes. Pojava u inak kafeina, te može pojačati njegovo djelovanje pri sagorijevanju masti – sredstva za mršavljenje.



Slika 4. Strukturna formula naringina ( $C_{27}H_{32}O_{14}$ )

### 1.3.3 NARINGENIN

Flavon koji na ljudski organizam djeluje kao antioksidans, imunomodulator, a ima i protuupalno djelovanje (Slika 5). Potvrđeno je njegovo neuroprotektivno djelovanje smanjivanjem oksidativnog stresa izazvanog A $\beta$ -induciranih reaktivnih kisikovih spojeva, te potencijal za prevenciju razvoja Alzheimerove bolesti (Heo i sur., 2004).

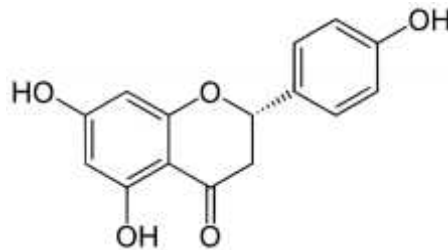
Pozitivno djeluje na smanjenje oštećenja DNA nastalih oksidacijskim procesima u *in vitro* uvjetima (Yeh i sur., 2006). Naringenin smanjuje količinu slobodnih radikala, kao što su reaktivni kisikovi spojevi (ROS), te tako pomaže u sprječavanju razvoja mnogih kroničnih bolesti, kao što su bolesti krvožilnog sustava i srca, i dijabetes. Stanice izložene naringenu (koncentracije  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) tijekom 24 sata reduciraju oštećenje DNA za čak 24%.

Naringenin pospješuje razinu antioksidansa kao što su superoksid dismutaza (SOD) i katalaza (CAT), te smanjuje razinu proizvoda lipidne peroksidacije u štakora koji su prehranom unosili visoke doze kolesterola (Mi-Kyung, 2002). Može regulirati razinu glukoze, kolesterola i triglicerida u krvi smanjivanjem apsorpcije ugljikohidrata (Ortiz-Andrade, 2008). Iako veća istraživanja potvrđuju njegovo antioksidativno djelovanje, postoji manji broj radova koji takav učinak negiraju (Andrade i Burgess, 2007). Antioksidativni učinak



naringenina, kao i ve ine flavonoida, ovisi o koncentraciji i o putu unosa u organizam. Ovaj je flavonoid vrlo teško uzimati hranom (u najboljem slu aju samo 15% naringenina uzetog oralno apsorbira se u gastrointestinalnom sustavu ovjeka).

Baš kao i naringin, naringenin je tako er prisutan u grejpu, i ciljano blokira stvaranje masnih naslaga, te ubrzava razgradnju nakupljene masno e.



Slika 5. Strukturna formula naringenina (C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>)

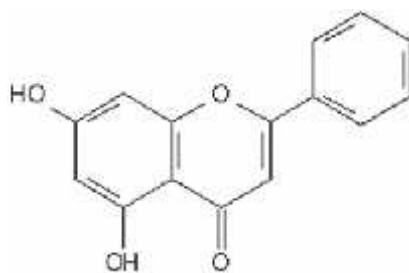
#### 1.3.4 KRIZIN

Krizin ili 5,7-dihidroksiflavon je flavonoid-aglikon (Slika 6) iz skupine izoflavona, i široko je rasprostranjen u biljnim vrstama (iako se naj eš e komercijalno dobiva iz biljke *Passiflora caerulea* L.). Aktivira enzim uridin difosfatglukuronosiltransferazu (UGT1A1) i tako pomaže izlu ivanje bilirubina i biliverdina nakupljenih u epidermi kože ispod o iju (briše podo njake).

Upotrebljava se i kao dodatno sredstvo u stvaranju miši ne mase kod sportaša.

U komercijalne svrhe rabi se kao inhibitor aromatizacije androsterona i testosterona u estrogen ili dihidrosteron (DHT) koji izazivaju sporedne u inke kao što su elavost ili pove anje prostate. Iako njegovo djelovanje utje e na aktivnost aromataze, enzima za ravnotežu spolnih hormona, uzimanje uobi ajenih doza hranom tokom tri tjedna ne dovodi do promjena u ravnoteži spolnih hormona u muškaraca (Gambelunghe i sur., 2003). Krizin opušta krvne žile (Villar i sur., 2004), a u dozama ve im od 25 mg kg<sup>-1</sup> ima umiruju i u inak,

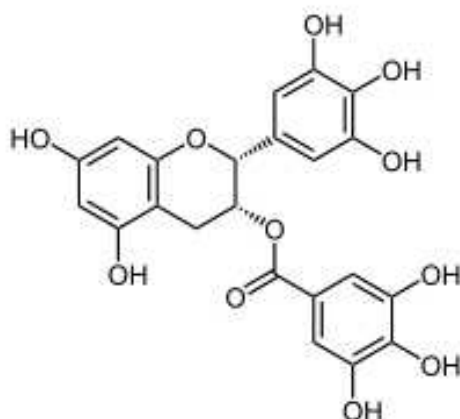
najvjerojatnije aktivacijom GABA receptora (Zanoli i sur., 2000). Krizin je jedan od imbenika koji utječe na metabolizam lijekova (Galijatovi i sur., 2000). Prilikom apsorpcije u probavnom sustavu krizin podliježe metaboličkoj transformaciji, u organizmu je dostupan u malim količinama (Walle i sur., 2001). U među je prisutan u količini od oko  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  (Pulcini i sur., 2006). Potvrđeno je i protutumorski učinak krizina (Oršoli i Josipovi, 2008).



Slika 6. Strukturna formula krizina ( $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$ )

### 1.3.5 EPIGALOKATEHIN GALAT (EGCG),

Epigalokatehin galat (EGCG), također poznat i pod nazivom epigalokatehin 3-galat je ester epigalokatehina i galne kiseline (Slika 7). Pripada skupini katehina kojima ime dolazi od kateha, soka dobivenog iz biljke *Mimosa catechu*.



Slika 7. Strukturna formula EGCG-a

EGCG je najzastupljeniji katehin u zelenom čaju. Ima antioksidativna svojstva i štiti od oštećenja potaknutih UV zračenjem, a može imati i kemoterapeutska svojstva za mnoge nepravilnosti, uključujući i rak, pretilost, dijabetes i bolesti srca i krvožilnog sustava (Way i sur., 2009; Pyrko, 2007; Aktas i sur., 2007). Ima snažno antikancerogeno, antioksidativno i protuupalno djelovanje (Oršolić i Bašić, 2007).

EGCG smanjuje pojavnost raka, kolagenom uzrokovan artritis, oksidativnim stresom prouzročene neurodegenerativne bolesti, te citokinima prouzročenu upalu *in vivo*. Uporaba EGCG-a u prehrani miša smanjuje razinu triglicerida u plazmi, i jetrenih lipida (Choo, 2003). Nadalje, EGCG smanjuje razinu testosterona i 17- $\beta$ -estradiola. Ovisno o dozi EGCG djeluje i na razinu serumskog leptina, inhibiciju rasta sličnog inzulinu (engl. Insulin-like growth factor; IGF-I), inzulina, hormona rasta i luteinizirajućeg hormona.

Rezultati istraživanja ukazuju da svakodnevni unos zelenog čaja može smanjiti posljedice dijabetesa u štakora (Kao i sur., 2006). Mogućnost EGCG-a da smanji razinu glukoze u krvi štakora može ovisiti o promjenama apetita. EGCG smanjuje apsorpciju ugljikohidrata inhibicijom probavnih enzima  $\alpha$ -amilaze ili  $\alpha$ -glukozidaze. EGCG se pokazao učinkovitim u streptozotocinom prouzročenom dijabetesu; smanjuje oštećenje  $\beta$ -stanica i jetre reducira i oksidativni stres. Zaštitni učinak na jetru potvrđuje snižena razina jetrenih enzima, primjerice alkalne fosfataze (ALP), glutamin piruvatske transaminaze (engl. glutamic pyruvic transaminase, GPT) i lizofosfatske kiseline (engl. lysophosphatidic acid, LPA). EGCG povećava osjetljivost na inzulin u normalno hranjenih i fruktozom hranjenih štakora, a rezultat je povećani unos glukoze u mišije stanice i vezanje glukoze za adipocite, kao i ekspresija glukoznog prijenosnika 4 (GLUT4) u mišijim stanicama. EGCG smanjuje ekspresiju enzima glukoneogeneze kao što su fosfoenolpiruvat karboksikinaza i glukoza-6 fosfataza u jetri miša.

Zbog antioksidativnog učinka EGCG je u mogućnosti zaštititi normalne stanice od oksidativnog stresa, oštećenja prouzročeni visokom razinom citokina i dijabetesa. *In vitro* EGCG štiti stanice gušterače od citotoksičnog djelovanja IFN- $\gamma$  i IL-1, smanjuje razinu dušikovog oksida, te posljedično oštećenja stanica gušterače. EGCG blokira prijenos NF- $\kappa$ B iz citosola u jezgru stanica gušterače sprječavajući i aktivaciju gena za sintezu dušikovog oksida (Kao i sur., 2006).

U živanim stanicama EGCG ima zaštitni učinak; regulacijom aktivnosti protein kinaze C potiče preživljenje stanica i kontrolu staničnog ciklusa. EGCG smanjuje oksidativni stres prouzročeni dijabetesom, te sprječava hepatotoksičnost masnih stanica jetre. S obzirom na način obrade miševa, EGCG ne djeluje na organizam jednako. Bolji učinak postignut je davanjem EGCG-a intraperitonealno od *per os* zbog slabe apsorpcije EGCG-a u probavnom sustavu (Crespy i Williamson, 2004).

#### **1.4 MIKRONUKLEUS TEST**

Mikronukleus je biomarker za kromosomska oštećenja, genetsku nestabilnost i rizik od karcinoma. Upotrebom biomarkera koji su u odnosu sa ovim događajima mogu se prilično rano otkriti promjene vezane uz određenu bolest. Marker kromosomskih oštećenja, kao što je frekvencija kromosomskih aberacija i mikronukleusa, jedni su od najčešće korištenih biomarkera u ove svrhe (Iarmarcovari i sur., 2008).

Visoka vjerodostojnost i relativno niska cijena mikronukleus testa pridonijela je uporabi ovih biomarkera za *in vitro* i *in vivo* studije oštećenja genoma, diljem svijeta.

To je jednostavan, brz i relativno jeftin način ispitivanja DNA oštećenja, i može biti izveden u samo jednoj kapi krvi. Mikronukleusi su ulomci cijelih kromosoma koji su zaostali u citoplazmi tokom mitoze (Batista-González i sur., 2006). Mogu nastajati ili kromosomskim

lomovima, ili nedostatkom kromosoma (aneuploidijom). To su male kromatinske strukture koje svojim oblikom nalikuju jezgri, ali su samostalno smještene unutar interfazne citoplazme (Bomabail i sur., 2002; Fenech i sur., 2003; Baatout i Derradji, 2004).

Određena patološka stanja koja su povezana s proizvodnjom slobodnih radikala mogu povećati frekvenciju eritrocitnih mikronukleusa.

I kod mladih i starijih ljudi, osnovna frekvencija mikronukleusa u perifernoj krvi približna je nuli (Batista-González i sur., 2006).

Mikronukleus je pokazatelj postojanja aberacija u prethodnoj diobi stanice (Channarayappa i sur., 1990). Mjerenje frekvencije mikronukleusa može se koristiti kao kvantitativna mjera strukturnih i numeričkih aberacija kromosoma, izazvanih u stanicama *in vitro* i *in vivo*, pod utjecajem različitih genotoksičnih agenasa (Fenech i sur., 2003; Baatout i Derradji, 2004; Fenech, 1993a; Fenech, 1993b; Nüsse i sur., 1996). Genotoksične tvari mogu potaknuti nastanak mikronukleusa u stanicama izloženog organizma na dva načina: direktno i indirektno.

#### Direktno

Klastogeni način: mikronukleus nastaje od acentričnih ulomaka kromosoma (ulomci kromatida i kromosoma) nastalih uslijed loma kromosoma.

#### Indirektno

Aneugeni način: nakon što stanica uđe u diobu, uslijed oštećenja i nefunkcionalnosti mikrotubula diobenog vretena, onemogućeno je putovanje jednog ili više kromosoma prema polu stanice. Nakon citokineze, zaostali kromosomi u citoplazmi stanice koji tvore mikronukleuse.

Osim genotoksi nih agensa, mikronukleus može nastati spontano, a tome pridonose:

1. Mutacije kinetohornih proteina, centromera i diobenog vretena koje mogu izazvati nejednaku raspodjelu kromosoma, ili gubitak itavih kromosoma tijekom anafaze.
2. Npopravljeni kromosomski lomovi koji dovode do stvaranja acentri nih ulomaka, a nastaju djelovanjem endogenih imbenika, ili pod vanjskim utjecajem (Natarajan, 2002).

Broj mikronukleusa koji se spontano pojavljuju u limfocitima periferne krvi, pod utjecajem razli itih imbenika, može se promijeniti. Pove ani broj mikronukleusa može biti i jedan od pokazatelja op enite geneti ke nestabilnosti. Stanice s nestabilnim kariotipom imaju sklonost uklanjanja kromosoma; navedeni se doga aj barem djelomi no odvija putem stvaranja mikronukleusa (Stopper i Müller, 1997). Istraživanja pokazuju da oko 50% spontano nastalih mikronukleusa sadrži itave kromosome, dok ostali nastaju od acentri nih ulomaka (Fenech i Morley, 1989).

Mikronukleusi koji sadrže itave kromosome se eš e nalaze u starijih nego u mla ih ispitanika, što se podudara s rezultatima ranijih istraživanja koja su pokazala da se starenjem pove ava frekvencija aneuploidnih stanica (raste broj pogrešaka prilikom replikacije genetskog materijala) (Fenech i sur., 2002; Norppa i sur., 1993; Fenech i Morley, 1989).

Mikronukleus test je jednostavniji i brži od analize strukturnih aberacija kromosoma, a podjednako osjetljiv u otkrivanju ošte enja diobenog vretena i aberacija kromosoma (Baatout i Derradji, 2004; Hayashi i sur., 2000; Krishna i Hayashi, 2000).

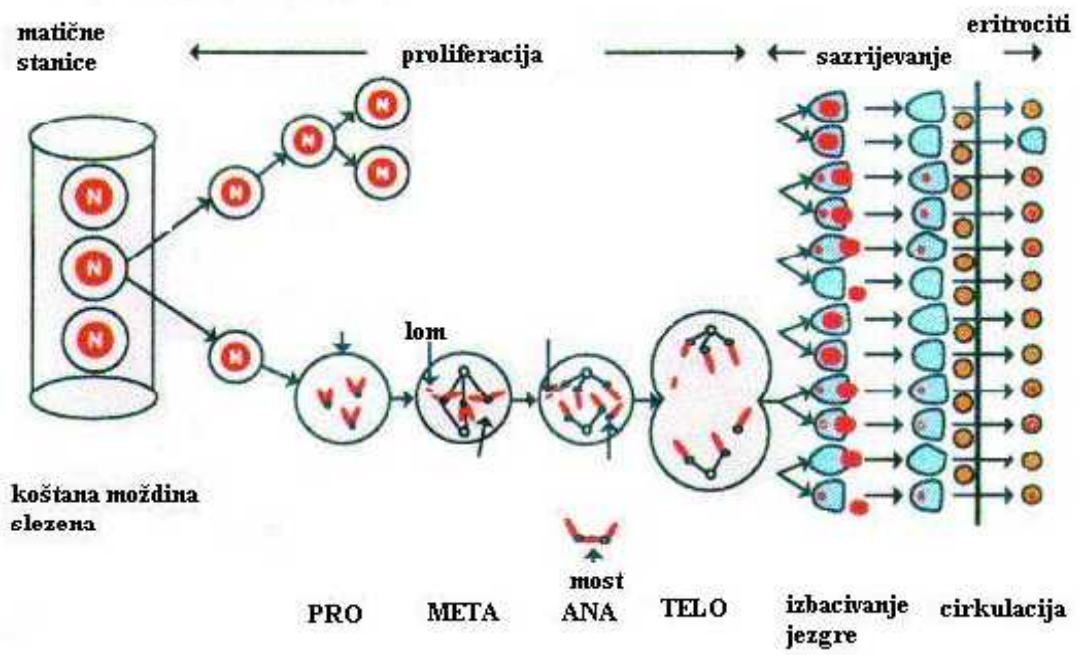
Standardni mikronukleus test nam ne omogu ava razlikovanje mikronukleusa koji potje u od acentri nih ulomaka od onih koji potje u od itavih kromosoma. Kako bi se to omogu ilo, mnogi istraživa i kombiniraju standardni mikronuklues test s raznim citološkim tehnikama, primjerice fluorescencijske *in situ* hibridizacije sa sondama koje specifi no otkrivaju

centromerna ili telomerna područja kromosoma (Jagetia i Reddy, 2002; Surrallés i sur., 1998). Obzirom da prisutnost ili odsutnost centromernih, telomernih ili nekih drugih dijelova kromosoma (koji su specifično obilježeni) omogućuje utvrđivanje porijekla mikronukleusa, navedene tehnike su vrlo korisne u istraživanjima klastogenih ili aneugenh mehanizama djelovanja različitih kemijskih ili fizikalnih agenasa u uvjetima *in vitro* i *in vivo*.

#### **1.4.1 MIKRONUKLEUS U UVIJETIMA IN VIVO**

Mikronukleus test je prvobitno razvijen kao test na stanicama koštane srži i eritrocitima sisavaca. Njegova je primjena kasnije proširena na različite vrste stanica (Fenech i Morley, 1989; Heddle i sur., 1991). Najčešće i mikronukleus test *in vivo* korišten u istraživanju na laboratorijskim životinjama izvođen je na stanicama koštane moždine, i na nezrelim eritrocitima periferne krvi (polikromatski i normokromatski eritrociti) (Baatout i Derradji, 2004; Hayashi i sur., 2000; Jagetia i Reddy, 2002; Bhilwade i sur., 2004).

Koštana moždina i slezena u odraslih miševa su organi u kojima matične stanice proliferiraju i sazrijevaju u procesu hematopoeze. Matične stanice se tijekom proliferacije dijele, te su jako osjetljive na oksidativni stres, što može uzrokovati oštećenja kromosoma i nastanak mikronukleusa. Tijekom diobe stanica, nastali mikronukleusi se ne ugrađuju u jezgre stanica koje ostaju u citoplazmi. U procesu sazrijevanja eritrocita, eritroblasti se razvijaju u polikromatske eritrocite (mladi eritrociti koji još sadrže RNA, a jezgra im je izbačena iz stanice) u kojima se mogu prepoznati mikronukleusi (Slika 8). Veliki broj polikromatskih eritrocita u miševa ulazi u cirkulaciju, te se njihova prisutnost može utvrditi primjenom različitih boja, koje se specifično vežu na DNA. Broj mikronukleusa utvrđuje se mikroskopskom analizom ili prototim citometrom; no u novije vrijeme primjenjuje se i računalni sustav za analizu slike (Nüsse i sur., 1996; Surrallés i sur., 1998; Heddle i sur., 1991).



Slika 8. Proces eritropoeze; mehanizam nastanka mikronukleusa u polikromatskim eritrocitima.



## 2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Dijabetes je bolest s visokom stopom porasta. To je heterogeni autoimunološki metabolički i hormonalni poremećaj koji pogađa oko 5% ljudske populacije širom svijeta. Oko 143 milijuna ljudi diljem svijeta boluje od dijabetesa, skoro 5 puta više nego što ih je bilo zabilježeno prije 10 godina; broj će se vjerojatno udvostručiti do 2030. godine. Podaci iz Svjetske Zdravstvene Organizacije (WHO) pokazuju da je šećerna bolest glavni ubojica našeg vremena.

Visoka cijena liječenja, pojavnost neželjenih posljedica liječenja dijabetesa uobičajenim sredstvima, prvenstveno inzulinom, ukazuju na potrebu za pronalaskom prirodnih pripravaka koji bi mogli ublažiti posljedice dijabetesa ili spriječiti njegovu pojavnost.

Primjena flavonoida, antioksidativnih sastavnica biljaka i biljnih prerađevina, kao što je propolis, važan je čimbenik u sprječavanju posljedica dijabetesa. Dosadašnje spoznaje o djelovanju propolisa i njegovih sastavnica na dijabetes temelje se na regulaciji hiperglikemije.

Dijabetes je metabolička bolest koja zahtjeva medicinsku dijagnozu, obradu i promjene u načinu života.

Cilj je istražiti učinkovitost kvercetina, naringina, naringenina, krizina i EGCG-a, snažnih antioksidansa, u sprječavanju posljedica prouzročenih oksidativnim stresom u dijabetesu, na molekularnoj i staničnoj razini.

### 3 MATERIJALI I METODE

#### 3.1 POKUSNE ŽIVOTINJE

U našim istraživanjima koristili smo miševе soja Swiss albino, ženskog spola, mase 25-27 g, iz uzgoja Zavoda za animalnu fiziologiju PMF-a.

Životinje su bile životne dobi  $60 \pm 10$  dana, živjele su u uvjetima kontrolirane temperature od  $24 \pm 1$  °C, s ciklusom dana i noć i od 12 sati svjetla i 12 sati tame. Životinje su imale stalan pristup hrani i vodi.

Istraživanje se provodilo prema eti kim principima, važe im u Hrvatskoj (Zakon o zaštiti laboratorijskih životinja, NN 19, 1999.), i prema vodi u za držanje i korištenje laboratorijskih životinja (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHHS (NIH) Publ # 86-23 ).

#### 3.2 POKUSNE SKUPINE

Sve životinje su slu ajnim odabirom raspore ene u 14 skupina. Svaka skupina je sadržavala po 12 miševa. Skupina I je bila zdrava kontrolna skupina u kojoj smo u peritonealnu šupljinu uštrcavali fiziološku otopinu tijekom 7 dana, da bi proživjela isti stres kao i obra ena skupina. Skupina II je bila kontrolna skupina miševa s dijabetesom. Nakon obrade aloksanom, životinjama smo tijekom 7 dana intraperitonealno (*ip*) uštrcavali fiziološku otopinu. Skupina III je nakon injiciranja aloksana dalje injicirana *ip* s 0,5% -tnim etanolom tijekom 7 dana, kako bi služila kao kontrolna skupina s dijabetesom obra enih flavonoidima otopljenim u alkoholu. Ostale skupine (IV – XIV) su obra ene pripravcima EGCG-a, kvercetina, krizina, naringina ili naringenina u koncentraciji od 50 mg kg<sup>-1</sup> tijekom 7 dana s

po etkom obrade 2 dana nakon davanja aloksana (rani oblik dijabetesa), ili 7 dana nakon injiciranja aloksana (kasni oblik dijabetesa).

### 3.3 IZAZIVANJE DIJABETESA

Dijabetes smo izazvali intravenskim (*iv*) injiciranjem  $75 \text{ mg kg}^{-1}$  aloksana otopljenog u fiziološkoj otopini.

Aloksan je reaktivna molekula, nestabilna u vodi; u organizmu osloba a velike koli ine oksidansa, što uzrokuje pojavu oksidacijskog stresa. Aloksan je odgovoran za ošte enja DNA, hiperpolarizaciju stani ne membrane i ostala ošte enja prouzro ena promjenama razine antioksidativnog statusa organizma, što vodi do poreme aja metaboli ke aktivnosti stanica, te apoptoze ili nekroze. Stanice guštera e su, u odnosu na ostale stanice u organizmu, više osjetljive na oksidativni stres uzrokovan aloksanom.

Aloksan je klasi an dijabetogen koji specifi no ošte uje -stanice guštera e. Uništava funkciju -stanica inhibiraju i enzim glukozinazu kroz oksidaciju dvije tiolske skupine na glukoza-vezuju oj strani enzima. Dodatno, dokazano je da reaktivni kisikovi spojevi sudjeluju u ovom razaraju em procesu. Istaživanja pokazuju da su aloksan, i njegovi derivati, potencijalni proizvo a i superoksidnih aniona i hidrogen peroksida. Tako redoks procesi, u prisutnosti kataliziranja metalnih iona u tragovima, nastavljaju proizvoditi hidroksilne radikale hidroksidnog peroksida. Uloga reaktivnih kisikovih spojeva u aloksan-induciranoj razgradnji -stanica guštera e potvr ena je u istraživanjima na transgeni nim miševima s prekomjernom ekspresijom antioksidansa koji mogu zaštititi stanice guštera e od aloksan-induciranog dijabetesa (El-Alfy i sur., 2005).

Dijabetes smo dokazali mjerenjem razine glukoze u krvi, 48 sati nakon davanja/injiciranja aloksana. Miševe koji su 48 sati nakon obrade aloksanom imali razinu glukoze u krvi iznad  $11 \text{ mmol L}^{-1}$  izdvojili smo za sljedeći korak istraživanja.

### 3.4 FLAVONOIDI

Kvercetin (Quercetin dihydrate 98%, Aldrich Ch. Co. Inc. Milwaukee WI, USA) je otopljen u 0,5% -tnom etanolu u koncentraciji od  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Naringenin (Sigma, Germany) je otopljen u 0,5%-tnom etanolu u koncentraciji od  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Krizin (5,7-dihydroxyflavon, Aldrich Ch. Co. Inc. Milwaukee WI, USA) je otopljen u 0,5%-tnom etanolu u koncentraciji od  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Naringin (Sigma, Germany) je otopljen u destiliranoj vodi.

EGCG (Epigallocatehin-3-galat, Aldrich Ch. Co. Inc. Milwaukee WI, USA) je otopljen u destiliranoj vodi u koncentraciji od  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ .

### 3.5 OBRADA ŽIVOTINJA

Kvercetin, naringin, naringenin, krizin ili EGCG smo injicirali miševima u dozi od  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  *ip*. Obradu životinja flavonoidima tijekom 7 dana započeli smo 2 dana nakon davanja aloksana (rani oblik dijabetesa), ili 7 dana nakon injiciranja aloksana (kasni oblik dijabetesa). Kontrolne životinje smo obradili s 0,5% -tnom otopinom etanola ili fiziološkom otopinom u istom vremenskom periodu.

### **3.6 MIKRONUKLEUS TEST**

Mikronukleus test na razmazima periferne krvi miševa utvrdili smo prema modificiranom protokolu koji su predložili Krishna i Hayashi (2000). Uzorke krvi uzimali smo dan nakon završetka obrade. Na osušenim razmazima periferne krvi miša, obojanim akridin oranžom, odredili smo ukupni broj mikronukleusa na 2000 retikulocita, koriste i fluorescencijski mikroskop sa ekscitacijskim filterom 502 – 525 nm.

### **3.7 STATISTIČKE METODE**

Statističku značajnost rezultata dobivenih ovim istraživanjem ispitali smo računarnim programom STATISTICA 7.0 (StatSoft, Tulsa, SAD), primjenom Studentovog *t*-testa.

## 4 REZULTATI

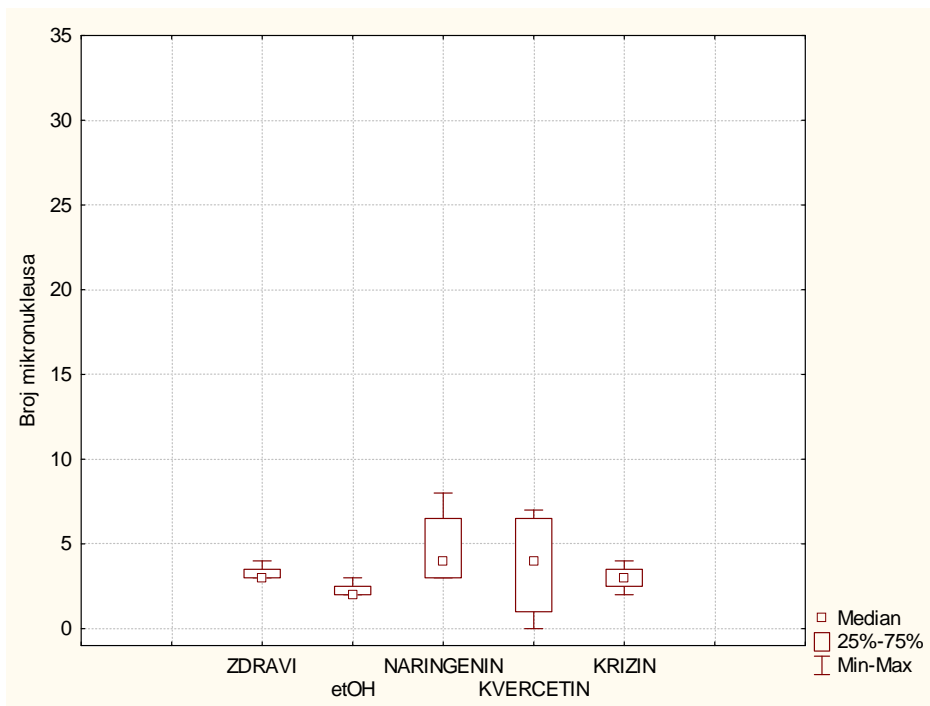
Mikroskopskom analizom prisutnosti mikronukleusa u retikulocitima periferne krvi usporedili smo zdrave miševe, miševe s ranim dijabetesom bez obrade i obrade flavonoidima ili EGCG-om te miševe s kasnim dijabetesom bez obrade i obrade flavonoidima ili EGCG-om.

Rezultati dobiveni obradom miševa s ranim dijabetesom većinom flavonoida i EGCG-om nisu pokazali statistički značajne razlike broja mikronukleusa u odnosu na broj mikronukleusa u retikulocitima kontrolnih miševa s dijabetesom bez obrade flavonoidima. Statistički je značajan ( $p < 0,01$ , Slika 11) porast broja mikronukleusa u retikulocitima periferne krvi u miševa s dijabetesom obradenih naringinom u odnosu na miševe s dijabetesom bez obrade. Usporedbom miševa s ranim dijabetesom, neobrađenih i obradenih flavonoidima i EGCG-om, sa zdravim miševima nije zabilježena statistički značajna promjena broja mikronukleusa u retikulocitima periferne krvi (Slike 9 i 11).

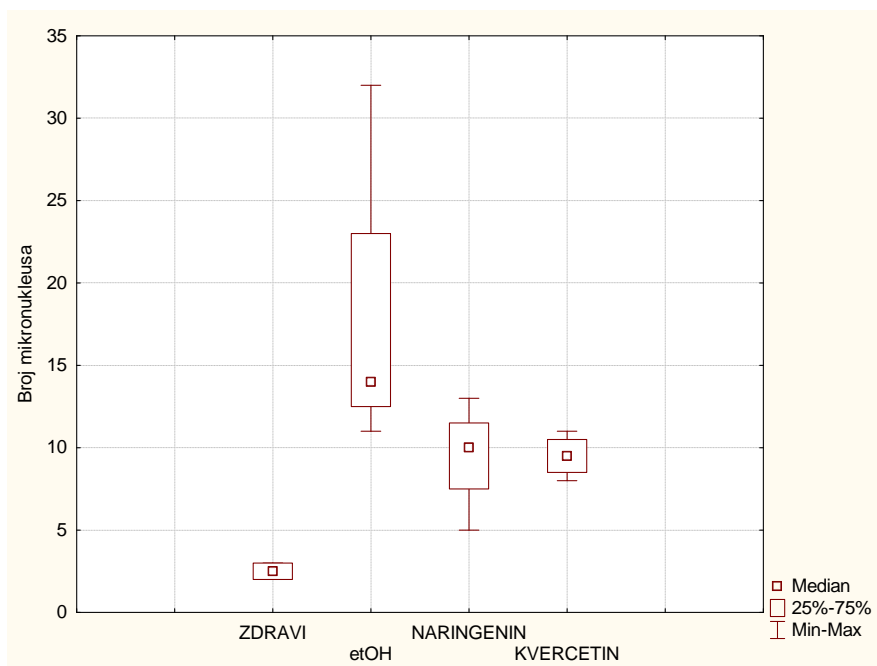
Rezultati dobiveni obradom miševa s kasnim dijabetesom flavonoidima ili EGCG-om u usporedbi s kontrolnom skupinom miševa s dijabetesom bez obrade, tj. obradenih fiziološkom otopinom ili 0,5%-tnim etanolom, ne pokazuju statistički značajne promjene broja mikronukleusa u retikulocitima periferne krvi (Slika 10). Obrada miševa s dijabetesom EGCG-om dovela je do statistički značajnog povećanja broja mikronukleusa u retikulocitima periferne krvi u usporedbi sa zdravim miševima (Slika 12).

U miševa s kasnim dijabetesom razlike između obradenih i neobrađenih životinja veće su nego u miševa s ranim dijabetesom, ali je veća i razlika u broju mikronukleusa u životinja unutar iste skupine.

U miševa s ranim dijabetesom obradenih flavonoidima ustanovljen je povećan broj mikronukleusa u odnosu na kontrolnu skupinu životinja s dijabetesom bez obrade primjenom svih istraživanih tvari, dok je u miševa s kasnim dijabetesom broj mikronukleusa u životinja obradenih naringeninom i kvercetinom smanjen u odnosu na kontrolnu skupinu miševa s dijabetesom bez obrade. Miševi s dijabetesom obradeni EGCG-om pokazuju povećani broj mikronukleusa u odnosu na miševe s dijabetesom bez obrade.

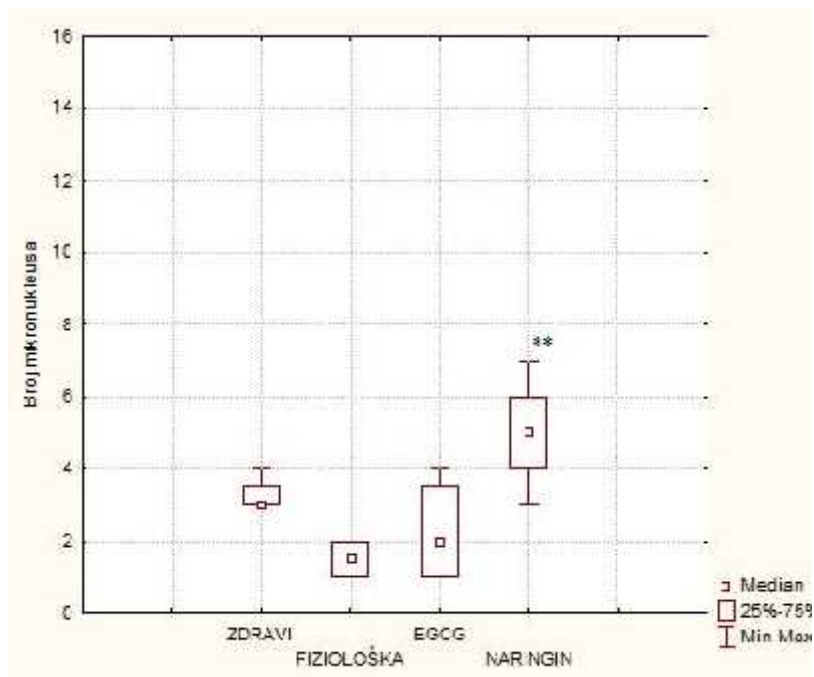


Slika 9. Broj mikronukleusa u retikulocitima periferne krvi zdravih miševa, miševa s ranim dijabetesom neobra enih i obra enih naringeninom, kvercetinom te krizinom



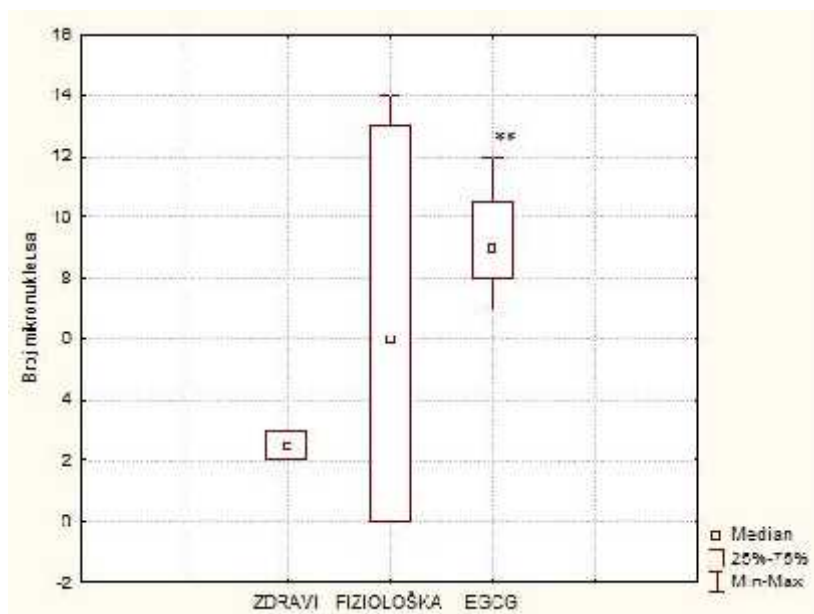
Slika 10. Broj mikronukleusa u retikulocitima periferne krvi zdravih miševa, miševa s kasnim dijabetesom neobra enih i obra enih naringeninom te kvercetinom.





Slika 11. Broj mikronukleusa u retikulocitima periferne krvi zdravih miševa, miševa s ranim dijabetesom neobrađenih i obrađenih EGCG-om i naringinom

\* Statistički značajna razlika između životinja s dijabetesom bez obrade i životinja s dijabetesom obrađenih naringinom (\*\* $p < 0,01$ ; Student  $t$ -test).



Slika 12. Broj mikronukleusa u retikulocitima periferne krvi zdravih miševa, miševa s kasnim dijabetesom neobrađenih i obrađenih EGCG-om.

\* Statistički značajna razlika između zdravih životinja i životinja s dijabetesom obrađenih vodenom otopinom EGCG-a (\*\* $p < 0,01$ ; Student  $t$ -test).

## 5 RASPRAVA

Oksidativni stres igra važnu ulogu u etiologiji dijabetesa. Karakterizira ga stanje u kojem su oksido-redukcijski procesi u stanicama pomaknuti prema oksidaciji, ime prekomjerno stvaranje slobodnih kisikovih radikala i reaktivnih kisikovih spojeva nadilazi mogućnost njihova uklanjanja. Bitan pokazatelj oksidativnog stresa je povećana lipidna peroksidacija koja može biti posljedica povećane količine slobodnih radikala u stanicama i/ili smanjene količine antioksidansa u organizmu. Tkiva oštećena dijabetesom pokazuju smanjenu količinu antioksidansa, pogotovo glutationa (GSH) i SOD koji su bitni inhibitori lipidne peroksidacije posredovane slobodnim radikalima (Feillet-Coudray i sur., 1999; Meister and Anderson, 1987; Anuradha and Selvam, 1993).

Prehrana je važan imbenik u sprječavanju nastanka bolesti oksidativnog stresa, jer mnoge namirnice sadrže antioksidanse u većoj ili manjoj količini. Empirijskim metodama stoljeća ima su izdvajane namirnice biljnog porijekla koje učinkovito sprječavaju ili ublažavaju posljedice takvih bolesti. Mnoge tradicionalne biljke upotrebljavane su za terapiju dijabetesom širom svijeta. Dokazani su antihiperlipidemijski učinci tih biljaka, temeljeni na njihovoj sposobnosti da obnovuju funkciju tkiva gušterače, inhibiraju crijevnu apsorpciju glukoze ili olakšavaju metabolite u inzulin-ovisnim procesima (Kao i sur., 2006). Razvojem znanstvenih metoda ustanovljeno je da su te namirnice izuzetno bogate flavonoidima. Antioksidativna sposobnost flavonoida pomaže i u održavanju cjelokupne sposobnosti organizma, a pripisuje se : 1.) njihovoj sposobnosti sakupljanja reaktivnih radikala kisika; 2.) sposobnosti sakupljanja reaktivnih radikala dušika; 3.) inhibiciji oksidativnih enzima; 4.) keliranju iona prijelaznih kovina ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ ); 5.) aktiviranju i zaštiti unutarstaničnih antioksidativnih enzima. Navedeni učinci dobro je vidljivi u sprječavanju oštećenja DNA u limfocitima periferne krvi.

Flavonoidi su fenolne sastavnice, glavni su im izvor, od prehrambenih tvari, voće i povrće, med i propolis, za koji je pronađeno više od 8000 flavonoida. Mnoga istraživanja pokazuju da je ova primjena voća i povrća povezana sa smanjenjem dijabetesa. Također, flavonoidi mogu modulirati aktivnost velikog broja enzima u sisavaca. Imaju jaku antioksidativnu moć, *in vivo* i *in vitro*. Flavonoidi štite β-stanice gušterače, inhibiraju lipidnu peroksidaciju i prooksidativne procese, inhibiraju diferencijaciju adipocita, povećavaju količinu inzulina-osjetljivih nosača, reguliraju aktivnost enzima jetre u procesu glikolize i glukoneogeneze, inhibiraju ugradnju glukoze u crijevima i reapsorpciju u stanicama bubrega, povećavaju prokrvljenost i elastičnost krvnih žila, te djeluju na cijeli niz enzima probavnog sustava (vidi pregledni rad Oršolić i Bašić, 2008). Prolinjski proizvodi, biljke i njihovi flavonoidi, mogu se koristiti kao preventivni ili terapijski protokoli u dijabetesu.

Učinak flavonoida na sprječavanje posljedica dijabetesa na molekularnoj i staničnoj razini metabolički aktivnih organa, kao i rezultati obrade tradicionalnim biljnim pripravcima i pripravcima meda i propolisa s visokom koncentracijom polifenola, kroz duži vremenski period, danas su predmet brojnih istraživanja. Novi podaci koji će pomoći pojašnjenju uloge flavonoida i EGCG-a u različitim zbivanjima tijekom razvoja dijabetesa bili su cilj ovog istraživanja.

Rezultati našeg rada ukazuju da su miševi s dijabetesom obrađeni flavonoidima, za razliku od miševa s dijabetesom bez obrade, preživjeli period od 45 dana, i da se nakon kritičnog perioda od 3. do 7. dana izgledom i ponašanjem nisu razlikovali od zdravih miševa, što pokazuje zaštitni učinak flavonoida na razini cijelog organizma.

Rezultati mikronukleus testa u miševa s ranim dijabetesom pokazali su povećani broj mikronukleusa u retikulocitima miševa obrađenih flavonoidima ili EGCG-om, i manji broj retikulocita s mikronukleusom u životinja s dijabetesom bez obrade, u odnosu na zdrave

životinje. Iako je uo ena velika razlika u broju mikronukleusa, rezultati ne pokazuju statističku značajnost, osim u slučaju obrade miševa naringinom, gdje je došlo do statistički značajnog povećanja broja retikulocita s mikronukleusom; vjerojatno zbog prilične heterogenosti u rezultatima unutar iste skupine. Osnova ovakvih rezultata mogla bi biti u brzom propadanju jako oštećenih eritrocita i retikulocita koje ubrzano proždiru makrofagi jetre i slezene, što je podržano i povećanim udjelom mononukleara u odnosu na polimorfonukleare (2:1) u miševa s dijabetesom bez obrade obzirom na zdrave miševе, kao i one obrađene flavonoidima. U miševa s dijabetesom obrađenih flavonoidima omjer mononukleara i polimorfonukleara je približno jednak (promjene su prisutne u svim skupinama, ali u odnosu na kontrolu nisu statistički značajne) što potvrđuje antioksidativni učinak flavonoida. Moguće je da je broj stanica s mikronukleusom povećan jer su flavonoidi smanjili lipidnu peroksidaciju stanica i smanjili količinu oštećenja DNA u ranim razvojnim stadijima eritrocita, te tako usporili propadanje eritrocita. Takvom tumačenju pridonosi povećani broj retikulocita u odnosu na eritrocite svih skupina miševa obrađenih flavonoidima. Na žalost, te razlike nisu statistički obrađene jer su uočene tijekom obrade materijala. Drugo objašnjenje ovakvih rezultata je moguće i prooksidativni učinak flavonoida potvrđen mnogim istraživanjima (Oršolić i sur., 2008; Bankova 2005a; Yen i sur., 2003). Učinak flavonoida na oksidativni status ne ovisi samo o dozi nego i o oksido-redukcijskom statusu organizma, općem stanju organizma, tipu molekula s kojima reagiraju, načinu primjene flavonoida i mnogim drugim čimbenicima. Osim toga, način davanja flavonoida utječe i vrsta i soj miša kao pokusnog modela na kojem se istražuje, a naši rezultati pokazuju da se i unutar iste linije mogu pojaviti prilične razlike u stanju organizma jedinki s dijabetesom obrađenih flavonoidima i EGCG-om. Zbog svega navedenog teško je predvidjeti kakav učinak flavonoidi imaju *in vivo*.

Rezultati obrade miševa s kasnim dijabetesom flavonoidima ili EGCG-om pokazuju povećanje broja mikronukleusa u retikulocitima periferne krvi u odnosu na zdrave miševe, od kojih je povećanje broja mikronukleusa u miševa s dijabetesom obradenih EGCG-om statistički značajno (Slika 12). U slučaju obrade miševa s kasnim dijabetesom naringeninom ili kvercetinom prisutno je smanjenje broja mikronukleusa u odnosu na životinje s dijabetesom bez obrade, dok je u miševa obradenih EGCG-om taj broj malo povišen, ali uz mnogo veću heterogenost podataka unutar skupine (Slike 10 i 12). Tijekom mikroskopiranja nisu uočene značajne razlike u odnosu retikulocita i eritrocita kao što je uočeno tijekom obrade uzoraka miševa s ranim dijabetesom. Razlike nisu statistički značajne što je vjerojatno posljedica velikih razlika u broju mikronukleusa u životinja iste skupine, što je u kasnom dijabetesu izraženo više nego u ranom obliku. Ovi rezultati ukazuju na zaštitni učinak kvercetina i naringenina. Budući da flavonoidi osim uloge hvatanja slobodnih radikala (Okada i sur, 2001) imaju i mogućnost poboljšanja antioksidativnog statusa organizma regulacijom količine antioksidativnih enzima u organizmu, koja je značajno snižena uslijed razvoja dijabetesa (Murugan i Pari, 2007), možemo pretpostaviti da je pozitivan učinak navedenih flavonoida jače izražen u kasnijim stadijima dijabetesa, nakon iscrpljivanja zaliha antioksidansa i oštećenja mehanizama njihovog nastanka. Zbog toga je potrebno nastaviti istraživanja u istovjetnim uvjetima, na istom modelu, i potvrditi ove pretpostavke podacima o antioksidativnom statusu istraživanih miševa, te istražiti doza-ovisni učinak pojedinih flavonoida i EGCG-a; s obzirom da i niske doze pokazuju bolju učinkovitost u odnosu na visoke doze koje mogu međjelovati sa staničnim procesima i imati prooksidativni učinak.

## 6 ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata zaključujemo:

1. Injiciranje aloksana intravenski u dozi od  $75 \text{ mg kg}^{-1}$  prouzrokuje dijabetes u Swiss albino miševa već nakon 48 sati.
2. Oksidativni stres i razvoj dijabetesa u miševa injiciranih sa aloksanom prouzrokuje znatna oštećenja kromosoma i povećan broj mikronukleusa u retikulocitima u odnosu na zdrave životinje.
3. Obrada životinja flavonoidima u ranom dijabetesu usporava brzo propadanje oštećenih eritrocita na što ukazuje i povećani broj eritrocita u odnosu na broj eritrocita životinja s dijabetesom bez obrade.
4. Smanjeni broj mikronukleusa u retikulocitima životinja s kasnim dijabetesom ukazuje na antioksidativni učinak flavonoida i EGCG-a.
5. Najbolji rezultat polu ili su kvercetin i naringenin u kasnom dijabetesu.
6. Rezultati ukazuju da flavonoidi i EGCG mogu biti učinkoviti u sprečavanju posljedica dijabetesa; antioksidativne značajke su temelj njihove učinkovitosti.
7. Doza-ovisni antioksidativni učinak flavonoida i EGCG-a u miševa s dijabetesom bit će cilj daljnjih istraživanja, da bi potvrdili njihovu učinkovitost u ranom i kasnom dijabetesu, te izbjegli mogući prooksidativni učinak visokih doza flavonoida.

## 7 LITERATURA

- Aherne SA, O'Brien NM , Ruch E (1982) Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content and Metabolism. *Nutr* 18:75-82
- Ahmed RA, Seth V, Baurejee BD (2000) Influence of Dietary Ginger (*Zingiber officinalis*) on Antioxidant Defense System in Rat: Comparison with Asorbic Acid. *Indian J Experim Biol* 38:604-606
- Aktas O, Waiczies S, Zipp F (2007) Neurodegeneration in Autoimmune Demyelination: recent mechanistic insights reveal novel therapeutic targets. *J Neuroimm*, 184:17-26
- Andrade JE, Burgess JR (2007) Effects of the Citrus Flavanone Naringenin on Oxidative Stress in Rats. *J Agricult Food Chem* 55: 2124-2128
- Anuradha CV, Selvam R (1993) Effect of Oral Methionine on Tissue Lipid Peroxidation and Antioxidants in Alloxan Induced Diabetic Rats. *J Nutr Biochem* 4:212-217
- Anusuya S, Menon VP (2003) Protection of Pancreatic  $\beta$ -cell by the Potential Bis-*o*-hydroxycinnamoyl Methane, Analogue of Natural Curcuminoid in Experimental Diabetes. *J Pharm Pharmacy Sc* 6:327-333
- Baatout S, Derradji H (2004) Cytometric Methods to Analyze Radiation Effects. *J Biol Regul Homeos Ag* 18:101-105
- Bankova V (2005a) Recent Trends and Important Developments in Propolis Research. *Evidence-based Complement Alternat Med* 2: 29-32
- Batista-González CM, Corona-Rivera JR, Gómez-Meda BC, Zamora-Pérez AL, Ramos-Ibarra ML, Zúñiga-González GM (2006) Micronucleated Erythrocytes in Preterm Newborns in Relation to Maternal Pathology. *Rev Biomed* 17:11-16

- Bhilwade HN, Chauhan PS (2004) Gamma Ray Induced Bone Marrow Micronucleated Erythrocytes in Seven Strains of Mouse. *Mutat Res* 560:19-26
- Brinkworth RI, Stoemer MJ, Fairlie DP (1992) Flavones are Inhibitors of HIV-1 Proteinase. *Biochem Biophys Res Com* 188:631-637
- Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC (1993) Inhibitory Effects of Flavonoids on Xanthine Oxidase. *Anticancer Res* 13:2165-2170
- Channarayappa, Nath J, Ong T (1990) Micronucleus Assay in Cytokinesis-blocked Cinucleated and Conventional Mononucleated Methods in Human Peripheral Lymphocytes. *Teratogenesis Carcinog Mutagen* 10:273-279
- Chen YT, Zheng RL, Jia ZJ, Ju Y (1990) Flavonoids as Superoxide Scavengers and Antioxidants. *Free Radic Biol Med* 9:19-21
- Choo JJ (2003) Green Tea Reduces Body Fat Accretion Caused by High-fat Diet in Rats through  $\beta$ -adrenoceptor Activation of Thermogenesis in Brown Adipose Tissue. *J Nutr Biochem* 14: 671-676
- Coskun O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S (2004) Quercetin, a Flavonoid Antioxidant, Prevents and Protects Streptozotocin-induced Oxidative Stress and  $\beta$ -cell Damage in Rat Pancreas. *Pharmacol Res* 51:117-123
- Crespy V, Williamson G (2004) A Review of the Health Effects of Green Tea Catechins In vivo Animal Models. *J Nutr* 134: 3431-3440
- Duthie SJ, Collins AR, Duthie GG, Dobson VL (1997a) Quercetin and Myricetin Protect Against Hydrogen Peroxide-induced DNA Damage (Strand Breaks and Oxidised Pyrimidines) in Human Lymphocytes. *Mutat Res* 393: 223-231
- Duthie SJ, McMillan P (1997b) Uracil Misincorporation in Human DNA Detected Using Single Cell Gel Electrophoresis. *Carcinogen* 18:1709-1714
- El-Alfy AT, Ahmed AAE, Fatani AJ (2005) Protective Effect of Red Greip Seeds Proanthocyanidins Against Induction of Diabetes by Alloxan in Rats. *Pharmacol Res* 52:264-270



- Erdos S MD, Szabo L Clinical Experience with the Use of Flavin7®, Pilot Study. <http://www.flavin-7.com/studies.php>
- Feillet-Coudray C, Rock E, Coudray C, Grzelowska K, Azais-Breasco V, Dardevet D, Menzer A (1999) Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Experimental Diabetes. *Clinica Chimica Acta* 284:31-43
- Feillet-Coudray C, Coudray C, Gueux E, Mazur A, Abrams SA, Rayssiguier Y (2000) Compartmental Analysis of Magnesium Kinetics in Mg-sufficient and Mg-deficient Rats. *Metabol* 49:1-5
- Fenech M (1993a) The Cytokinesis-block Micronucleus Technique and Its Application to Genotoxicity Studies in Human Populations. *Environ Health Perspect* 101:101-107
- Fenech M (1993b) The Cytokinesis-block Micronucleus Technique: A Detailed Description of the Method and Its Application to Genotoxicity Studies in Human Population. *Mutant Res* 285:35-44
- Fenech M (2002) The In vitro Micronucleus Technique. *Mutant Res* 455:81-95
- Fenech M, Chang WP, Kirsh-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E (2003) HUMN Project: Detailed Description of the Scoring Criteria for the Cytokinesis-block Micronucleus Assay Using Isolated Human Lymphocyte Cultures. *Mutant Res* 534:65-75
- Fenech M, Morley AA (1989) Kinetochores detection in Micronuclei: An Alternative Method for Measuring Chromosome Loss. *Mutagen* 4:98-104
- Frankel EN, (1993) Inhibition of Human LDL Oxidation by Resveratrol. *Lancet* 341: 1103-1104
- Galijatovic A, Walle UK, Walle T (2000) Induction of UDP-glucuronosyltransferase by the Flavonoids Chrysin and Quercetin in Caco-2 cells. *Pharm Res* 17:21–26

- Gambelunghe C, Rossi R, Somnavilla M, Ferranti C, Rossi R, Ciculi C, Gizzi S, Micheletti A, Rufini S (2003) Effects of Chrysin on Urinary Testosterone Levels in Human Males. *J Med Food* 6: 387-390
- Gaspar J, Rodrigues, Laries A, Silva F, Costa S, Monteiro MJ, Monteiro C, Rueff J (1994) On the Mechanisms of Genotoxicity and Metabolism of Quercetin. *Mutagenesis* 9: 445-449
- Graziani Y, Chayoth R, Karny N, Feldman B, Levy J (1982) Regulation of Protein Kinases Activity by Quercetin in Ehrlich Ascites Tumor Cells. *Biochem Biophys Acta* 714: 415-421
- Hayashi M, MacGregor J.T, Gatehouse DG, Adler ID, Blakey DH, Detringer SD, Krishna G, Morita T, Russo A, Sutuo S (2000) In vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. Some Aspects of Protocol Design Including Repeated Treatments, Integration With Toxicity Testing, and Automated Scoring. *Environ Mol Mutagen* 35:234-252
- Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, Vanparys P, MacGregor JT (1991) Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: Past, Present, and Future. *Environ Mol Mutagen* 18:277-291
- Heo HJ, Choi SJ, Kim HK, Shin DH (2004) Effect of Antioxidant Flavanone, Naringenin from Citrus junos on Neuroprotection. *J Agric Food Chem* 52:1520-1525
- Iarmacovari G, Ceppi M, Botta A, Orsière T, Bonassi S (2008) Micronuclei Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes of Cancer patients: A Meta Analysis. *Mutat Res* 659:274-283
- Jagetia GC, Reddy TK (2002) The grapefruit Flavanone Naringin Protect Against the Radiation-induced Genomic Instability in the Mice Bone Marrow: A Micronucleus Study. *Mutat Res* 519:37-48
- Ji LL (1999) Antioxidants and Oxidative Stress in Exercise. *Proc Soc Exp Biol Med* 222: 283-292

- Johnson MK, Loo G (2000) Effects of Epigallocatechin Gallate and Quercetin on Oxidative Damage to Cellular DNA. *Mutat Res* 459: 211-218
- Josipovi P, Oršoli N (2008) Citotoksi nost Polifenolnih/Flavonoidnih Spojeva u Kulturi Leukemijskih Stanica. *Arh Hig Rada Toksikol* 59:299-308
- Jung UJ, Lee M-K, Park YB, Jeon S-M, Choi M-S (2006) Antihyperglycemic and Antioxidant Properties of Caffeic Acid in db/db Mice. *J Pharm and Experim Therap* 318:476-483
- Kao Y-H, Chang H-H, Lee M-J and Chen C-L (2006) Tea, Obesity, and Diabetes. *Mol Nutr Food Res* 50:188 – 210
- Krishna G, Hayashi M (2000) In vivo Rodent Micronuclei Assay: Protocol and Data Interpretation. *Mutant Res* 455:155-166
- Krishna G, Hayashi M (2000) In vivo Rodent Micronucleus Assay: Protocol, Conduct and Data Interpretation. *Mutat Res* 455: 155-166
- Lee JC, Kim J, Park JK, Chung GH, Jang YS (2003) The Antioxidant, Rather than Prooxidant, Activities of Quercetin on Normal Cells: Quercetin Protects Mouse Thymocytes from Glucose Oxidase-mediated Apoptosis. *Experim Cell Res* 291:386-397
- Lee TP, Matteliano ML, Middleton E (1982) Effect of Quercetin on Human Polymorphonuclear Leukocyte Lysosomal Enzyme Release and Phospholipid Metabolism
- Manach C, Schalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L (2004) Polyphenols: Food Sources Bioavailability *Am J Clin Nutr* 79:727-747
- Meister A, Anderson ME (1987) Glutathione. *Annual Rev Biochem* 52:711-760
- Mi-Kyung L, Song-Hae B, Tae-Sook J, Surk-Sik M, Seung-Eun L, Yong Bok P, Myung-Sook C (2002) Supplementation of Narigenin and Its Synthetic Derivative

Alters Antioxidant Enzyme Activities of Erythrocyte and Liver in High Cholesterol-fed Rats. *Bioorg Med Chem* 10:2239-2244

- Miller AL (1996) Antioxidant Flavonoids: Structure, Function and Clinical Usage. *Alt Med Rev* 1:103-111
- Murugan P, Pari L (2007) Influence of Tetrahydrocurcumin on Erythrocyte Membrane Bound Enzymes and Antioxidant Status in Experimental Type 2 Diabetic Rats. *J Etnopharm* 113:479-486
- Nakane H, Ono K (1990) Differential Inhibitory Effects of Some Catechin Derivatives on the Activities of Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase and Cellular Deoxyribonucleic and Ribonucleic Acid Polymerase. *Biochem* 29:2841-2845
- Natarajan AT (2002) Chromosome Aberrations: Past, Present and Future. *Rev Mut Res* 504:3-16
- Norppa H, Luomahaara S, Heikanen H, Roth S, Sorsa M, Renzi L, Lindholm C (1993) Micronucleus Assay in Lymphocytes As a Tool to Biomonitor Human Exposure to Aneuploidogens and Clastogens. *Environ Health Perspect Supplements* 101:139-143
- Nüsse M, Miller BM, Viaggi S, Grawé J (1996) Analysis of the DNA Content Distribution of Micronuclei Using Flow Sorting and Fluorescent In situ Hybridization With a Centromeric DNA Probe. *Mutagen* 11:405-413
- Okada K, Wangpoengtrakul C, Tanaka T, Toyokun S, Uchida K, Osawa T (2001) Curcumin and Especially Tetrahydrocurcumin Ameliorate Oxidative Stress-induced Renal Injury in Mice. *J Nutr* 31:2090-2095
- Oršoli N, Baši I (2007) Cancer Prevention by Propolis and Its Polyphenolic Compounds in Experimental Animals. *Rec Prog Med Plants* 17:55-113
- Oršoli N, Baši I (2008) Honey Bee Products and Their Polyphenolic Compounds in Treatment of Diabetes. *Rec Prog Med Plants, Phytopharm Therap Values* 22:455-471

- Oršoli N, Horvat-Knežević A, Benković V, Bašić I (2008) Benefits of Use of Propolis and Related Flavonoids Against the Toxicity of Chemotherapeutic Agents. *Scien Ev Use Propolis Ethnomed* 195-222
- Ortiz-Andrade RR, Sanchez-Salgado JC, Navarrete-Vasquez G, Webster SP, Binnie M, Garcia-Jimenez S, Leon-Rivera I, Cigarroa-Vasquez P, Villalobos-Molina R, Estrada-Soto S (2008) Antidiabetic and Toxicological Evaluations of Naringenin in Normoglycaemic and NIDDM Rat Models and Its Implications on Extra-pancreatic Glucose Regulation. *Diabetes, Obesity Metab* 10:1097-1104
- Pulcini P, Allegrini F, Festuccia N (2006) Fast SPE Extraction and LC-ESI-MS-MS Analysis of Flavonoids and Phenolic Acids in Honey. *Apiacta* 41: 21-27
- Pyrko P (2007) The Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP As a Novel Target for Increasing Chemosensitivity in Malignant Gliomas. *Cancer Res* 67:9809
- Rueff J, Laires A, Gaspar J, Borba H, Rodrigues A (1992) Oxygen Species and the Genotoxicity of Quercetin. *Mutat Res* 265:75-81
- Saija A, Tomaino A, Trombetta D, De Pasquale A, Uccella N, Barbuzzi T, Paolino D, Bonina F (2000) In vitro and In vivo Evaluation of Caffeic and Ferulic Acids as Topical Photoprotective Agents. *Int J Pharma* 199:39-47
- Stopper H, Müller SO (1997) Micronuclei As a Biological Endpoint for Genotoxicity - a Minireview. *Toxicol in Vitro* 11:661-667
- Surrallés J, Puerto S, Ramírez MJ, Creus a, Marcos R, Mullanders LHF, Natarajan AT (1998) Links Between Chromatin Structure, DNA Repair and Chromosome Fragility. *Mutant Res* 404:39-44
- Villar I.C., Galisteo M, Gera R, O'valle F, Garcia-Saura M.F, Zaruzelo A, Duarte J (2004) Effects of the Dietary Flavonoid Chrysin in Isolated Rat Mesenteric Vascular Bed. *J Vascular Res* 41:509-516
- Walle T (2004) Absorption and Metabolism of Flavonoids. *Free Radical Biol Med* 36:829-837

- Walle T, Otake Y, Brubaker J A, Walle U K, Halushka P V (2001) Disposition and Metabolism of the Flavonoid Chrysin in Normal Volunteers. *Br J Clin Pharm* 51:143-146
- Way Tzong-Der, Hui-Yi Lin, Kuo-Tai Hua, Jang-Chang Lee, Wen-Hsin Li, Maw-Rong Lee, Chung-Hsiang Shuang and Jen-Kun (2009) Beneficial Effects of Different Tea Flowers Against Human Breast Cancer MCF-7 Cells. *Food Chem* 114:1231-1236
- Yamashita Y, Kawada S, Nakano H (1990) Introduction of Mammalian Topoisomerase II Dependant DNA Cleavage by Noninteractive Flavonoids, Genistein and Orbol. *Biochem Pharm* 39:737-744
- Yeh SL, Wang WY, Huang CS, Hu ML (2006) Flavonoids Suppresses the Enhancing Effect of Beta-carotene on DNA Damage Induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in A549 Cells. *Chem Biol Interact* 160:175-182
- Yen GC, Duh PD, Tsai HL, Huang SL (2003) Pro-oxidative Properties of Flavonoids in Human Lymphocytes. *Biosci Biotechnol Biochem* 67:1215-1222
- Zang K, Das NP(1994) Inhibitory Effects of Plant Polyphenols on Rat Liver Glutathione S-transferase. *Biochem Pharm* 47:2063-2068
- Zanolini P, Avallone R, Baraldi M (2000) Behavioral Characterisation of the Flavonoids Apigenin and Chrysin. *Fitoterapia* 71:1117-123
- Žarković N, Lonari I, Pipak A, Jurić G, Wonisch W, Borović S, Waeg G, Vuković T, Žarković K (2001) Patofiziološke Značajke Sekundarnih Glasnika Slobodnih Radikala i Oksidativni Stres. *Oksidativni Stres i Djelotvornost Antioksidanata*, Med Naklada Zagreb 13-32

