

# Bioraspoloživost, metabolizam i antioksidacijska sposobnost polifenola u organima miša C57BL/6

---

**Balta, Vedran**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2018**

*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:217:957362>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**



*Repository / Repozitorij:*

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





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

VEDRAN BALTA

**BIORASPOLOŽIVOST, METABOLIZAM I  
ANTIOKSIDACIJSKA SPOSOBNOST  
POLIFENOLA U ORGANIMA MIŠA  
C57BL/6**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Zagreb, 2018.



UNIVERSITY OF ZAGREB

FACULTY OF SCIENCE

DIVISION OF BIOLOGY

VEDRAN BALTA

**BIOAVAILABILITY, METABOLISM AND  
ANTIOXIDATIVE DEFENCE OF  
POLYPHENOLS IN DIFFERENT  
ORGANS OF C57BL/6 MICE**

DOCTORAL DISSERTATION

Zagreb, 2018

Ovaj je doktorski rad izrađen u Laboratoriju za fiziologiju i toksikologiju, Zavoda za animalnu fiziologiju, Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr.sc. Domagoja Đikića i prof.dr.sc. Irene Landeka Jurčević.

Dio rada izrađen je i u Laboratoriju za procese sušenja i praćenja stabilnosti biološki aktivnih spojeva u Centru za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju u Zadru, unutar Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu uz stručnu pomoć dr. sc. Sandre Pedisić i dr. sc. Zorana Zorića.

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

## **Zahvala**

*Veliku zahvalnost, u prvom redu, izražavam svojim mentorima prof.dr.sc., Domagoju Đikiću i prof.dr.sc. Ireni Landeka Jurčević na pruženoj prilici, vjeri, nesebičnom vremenu, znanju i savjetima. Hvala im za pomoć pri odabiru teme, motivaciji i usmjeravanjima tijekom cijeloga istraživanja i pisanja ovoga doktorskog rada.*

*Posebnu zahvalnost iskazujem prof.dr.sc. Nadi Oršolić, prof. dr.sc. Verici Dragović-Uzelac i izv. prof. Ivani Kmetič na pojašnjavanju teorijskih spoznaja, korisnim savjetima i razumijevanju u bitnim trenucima pisanja rada.*

*Nadalje, zahvaljujem svim zaposlenicima Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odjeka PMF-a u Zagrebu na nesebičnoj tehničkoj i stručnoj pomoći. Posebna hvala Mariji Potočić, Hrvoju Jedvaju, Niki Đirlić, Lydiji Gaćina, Barbari Nikolić i Dyani Odeh na pomoći prilikom provođenja istraživanja.*

*Također, zahvaljujem dr. sc. Sandri Pedisić i dr. sc. Zoranu Zoriću na pomoći pri provođenju UPLC-MS/MS analize polifenolnih spojeva, te dr.sc. Jasni Padovan na pomoći pri izračunima farmakokinetičkih parametara polifenola.*

*Veliko hvala svim mojim prijateljima, prijateljicama i kolegama, koji su uvijek bili uz mene i bez kojih ovaj cijeli tijek mog poslijediplomskog obrazovanja ne bi prošao tako lako i zabavno.*

*I na kraju, zahvaljujem se svojoj obitelji na ljubavi, strpljenju i potpori koje su mi pružali tijekom izrade ovog rada.*

## **BIORASPOLOŽIVOST, METABOLIZAM I ANTIOKSIDACIJSKA SPOSOBNOST POLIFENOLA U ORGANIMA MIŠA C57BL/6**

VEDRAN BALTA

Zavod za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka PMF-a, Rooseveltov trg 6, Zagreb

U ovome radu je istražena *in vivo* farmakokinetika-apsorpcija, metabolizam i raspodjela polifenolnih spojeva iz vodenog ekstrakta cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.), te vodenog ekstrakta cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima, mastima i ugljikohidratima u organima (tanko crijevo, jetra, mozak, bubreg) miša C57BL/6. Također je istražen bioakumulacijski potencijal nakupljanja molekula polifenola u navedenim organima, te biološki raspoložive maksimalne koncentracije pojedinih skupina molekula polifenola. Osim navedenog, istraženi su glavni biomarkeri oksidacijskog stresa (MDA, PC), aktivacija antioksidacijskih enzima (SOD, GSH, CAT) i antioksidacijski kapaciteti navedenih tkiva. Dobiveni rezultati pokazuju da se od ukupno 32 vrste polifenolnih spojeva koje nalazimo u ekstraktu cvijeta trnine, apsorpcijom i bioraspodjelom po organima u različitim vremenima bioakumuliraju različite vrste polifenolnih spojeva što potvrđuje postavljenu hipotezu o selektivnoj preferenciji za bioakumulacijom i zadržavanjem pojedinog tipa polifenolnih spojeva unutar različitih organa. Rezultati analize antioksidacijskog sustava su također pokazali koje pojedine skupine polifenola i njihovih metabolita aktiviraju enzime uključene u antioksidacijski sustav obrane (SOD, GSH, CAT), a izmjereni antioksidacijski kapaciteti tkiva ukazuju da pojedini organi u pokusnim skupinama pokazuju relativno visoki antioksidacijski kapacitet u odnosu na kontrolnu skupinu životinja. Dobiveni rezultati ovog istraživanja pridonose boljem razumijevanju afiniteta pojedinih skupina polifenola prema pojedinim tkivima i organima s temeljnim ciljem postizanja boljeg antioksidacijskog statusa organizma.

Rad sadrži: 341 stranica, 150 slika, 87 tablica, 358 literaturna navoda, jezik izvornika hrvatski

**Ključne riječi:** *Prunus spinosa* L., bioraspodjela, bioaktivnost, polifenolni spojevi, međureakcije polifenola i makronutrijenta

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

**Ocjenjivači:** prof. dr. sc. Nada Oršolić  
prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac  
izv. prof. dr. sc. Ivana Kmetič

**Zamjena:** izv. prof. dr.sc. Sandra Radić Brkanac

**BIOAVAILABILITY, METABOLISM AND ANTIOXIDATIVE DEFENCE OF  
POLYPHENOLS IN DIFFERENT ORGANS OF C57BL/6 MICE**

VEDRAN BALTA

Department of Animal physiology, Department of Biology, Faculty of Science, Rooseveltov  
trg 6, Zagreb

This thesis deals with the *in vivo* pharmacokinetics-absorption, metabolism and distribution of polyphenolic compounds from the sloe (*Prunus spinosa* L.) flower water extract and the water extract of sloe in combination with a diet enriched by proteins, fat and carbohydrates in the organs (small intestine, liver, brain, kidney) of the mouse C57BL/6. Furthermore, the bioaccumulative potential of polyphenolic compounds in these organs was also investigated, as well as the bioavailable maximum concentration of polyphenolic molecules. In addition, major oxidative stress biomarkers (MDA, PC), antioxidant enzyme activation (SOD, GSH, CAT), and antioxidative capacity of selected tissues were investigated. The obtained results show that out of a total of 32 types of polyphenolic compounds found in the sloe flower extract, various types of polyphenolic compounds bioaccumulate by absorption and biodistribution within organs at different times which confirms the set hypothesis of selective preference for bioaccumulation and retention of a certain type of polyphenolic compounds within different organs. The results of the antioxidation system analysis have also shown which groups of polyphenols and their metabolites activate specific enzymes involved in the antioxidative defence system (SOD, GSH, CAT) and the measured antioxidant tissue capacity indicates that certain organs in the test groups exhibit a relatively high antioxidative capacity in relation to the animal control group. The results of this study contribute to a better understanding of the affinity of certain groups of polyphenols to certain tissues and organs with the fundamental aim of achieving a better antioxidative status of the organism.

Ph.D. thesis contains: 341 pages, 150 figures, 87 tables, 358 references, original in Croatian

**Key words:** *Prunus spinosa* L., biodistribution, bioactivity, polyphenol compounds, interaction polyphenols with macronutrients

**Supervisor:** Prof. Domagoj Đikić, PhD  
Prof. Irena Landeka Jurčević, PhD

**Reviewers:** Prof. Nada Oršolić, PhD  
Prof. Verica Dragović-Uzelac, PhD  
Assoc. Prof. Ivana Kmetič, PhD

**In lieu of:** Assoc. Prof. Sandra Radić Brkanac, PhD

## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Ciljevi rada .....	3
1.2. Hipoteze rada.....	4
1.3. Uporabljenije metode za ispitivanje ciljeva rada.....	<b>Pogreška! Knjižna oznaka nije definirana.</b>
<b>2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>5</b>
2.1. POLIFENOLI .....	5
2.1.1. Klasifikacija i kemijska obilježja polifenola.....	5
2.1.2. Fenolni spojevi cvijeta trnine.....	13
2.2. METABOLIZAM, BIORASPOLOŽIVOST I APSORPCIJA POLIFENOLA.....	19
2.2.1. Metabolizam polifenola .....	19
2.2.2. Bioraspoloživost i apsorpcija polifenola.....	25
2.2.3. Farmakokinetika .....	27
2.3. OKSIDACIJSKI STRES I ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE POLIFENOLA ..	31
2.3.1. Slobodni radikali i oksidacijski stres .....	31
2.3.2. Antioksidansi i antioksidacijsko djelovanje polifenola .....	34
2.4. FIZIOLOŠKI UČINCI POLIFENOLA .....	40
2.4.1. Sinergizam djelovanja polifenola.....	40
2.4.2. Prooksidacijsko djelovanje polifenola .....	40
2.5. MEĐUREAKCIJE POLIFENOLA I MAKRONUTRIJENATA .....	41
2.5.1. Međureakcije polifenola i proteina .....	41
2.5.2. Međureakcije polifenola i lipida .....	42
2.5.3. Međureakcije polifenola i ugljikohidrata.....	45
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>49</b>
3.1. MATERIJALI.....	49
3.1.1. Pokusne životinje .....	49
3.1.2. Pripravci korišteni u pokusu .....	50
3.2. METODE.....	50
3.2.1. Protokol pokusa .....	50
3.2.2. PRIPREMA I ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH POLIFENOLA VODENOG EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE .....	51



3.2.3. ODREĐIVANJE BIORASPOLOŽIVOSTI I METABOLIZMA POLIFENOLA IZ EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE U ORGANIMA MIŠA UPLC MS/MS METODOM .....	51
3.2.4. IZOLACIJA I PRIPREMA TKIVA ZA MJERENJE BIOMARKERA OKSIDACIJSKOG STRESA I ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA TKIVA .....	54
3.2.5. MJERENJE BILJEGA OKSIDACIJSKOG STRESA .....	55
3.2.6. MJERENJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI HOMOGENATA TKIVA	60
3.2.7. STATISTIČKA ANALIZA .....	62
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>63</b>
4.1. UPLC-MS ANALIZA POLIFENOLNIH SPOJEVA U EKSTRAKTU CVIJETA TRNINE ( <i>Prunus spinosa</i> L.) I STANDARDNOJ HRANI ZA MIŠEVE (MUCEDOLA) PRIMJENJENIH U OBRADI I PREHRANI MIŠA C57BL/6 .....	63
4.2. BIORASPOLOŽIVOST POLIFENOLA EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NAKON AKUTNOG I SUBKRONIČNOG UNOSA.....	66
4.2.1. UPLC analiza selektivne bioraspodjele apsorbiranih polifenolnih spojeva iz ekstrakta cvijeta trnine u tankom crijevu, jetri, mozgu i bubregu C57BL/6 miša .....	66
4.3. UTJECAJ RAZLIČITIH VRSTA PREHRANE NA BIORASPOLOŽIVOST POLIFENOLA TRNINE.....	111
4.3.1. UPLC analiza selektivne bioraspodjele apsorbiranih polifenolnih spojeva iz ekstrakta cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima u tankom crijevu, jetri, mozgu i bubregu C57BL/6 miša .....	111
4.3.2. UPLC analiza selektivne bioraspodjele apsorbiranih polifenolnih spojeva iz ekstrakta cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom mastima u tankom crijevu, jetri, mozgu i bubregu C57BL/6 miša .....	157
4.3.3. UPLC analiza selektivne bioraspodjele apsorbiranih polifenolnih spojeva iz ekstrakta cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom ugljikohidratima u tankom crijevu, jetri, mozgu i bubregu C57BL/6 miša.....	200
4.4. ANTIOKSIDACIJSKI UČINAK POLIFENOLA NA AKTIVNOST BILJEGA OKSIDACIJSKOG STRESA U ORGANIMA MIŠA C57BL/6 .....	243
4.4.1. Vrijednosti lipidne peroksidacije (MDA) tankog crijeva, jetre, mozga i bubrega	243
4.4.2. Vrijednosti ukupnog glutationa (GSH) tankog crijeva, jetre, mozga i bubrega ...	249
4.4.3. Vrijednosti enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) jetre, bubrega, mozga i tankog crijeva.....	254
4.4.4. Vrijednosti enzimske aktivnosti katalaze (CAT) jetre, bubrega, mozga i tankog crijeva.....	261
4.4.5. Vrijednosti karboliniranih proteina (PC) tankog crijeva, jetre, mozga i bubrega.	267
4.1. REZULTATI MJERENJA ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA .....	271

4.1.1. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta tkiva jetre, bubrega, mozga i tankog crijeva FRAP i ABTS metodom .....	271
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>281</b>
5.1. Bioraspoloživost polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine u različitim organima miša....	281
5.1.1. Bioraspoloživost polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine u različitim organima miša i njihova usporedba s kontrolnom skupinom .....	281
5.1.2. Bioraspoloživost polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima.....	291
5.1.3. Bioraspoloživost polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom mastima.....	294
5.1.4. Bioraspoloživost polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine u kombinaciji sa saharozom i njihova usporedba sa čistim ekstraktom .....	296
5.2. Učinak polifenola u C57BL/6 miša na vrijednost biomarkera oksidacijskog stresa u različitim organima.....	298
5.3. Učinak polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine na vrijednost antioksidacijskog kapaciteta u različitim organima C57BL/6 miša .....	305
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>309</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>311</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>340</b>

## 1. UVOD

Ljekovito bilje i pripravci od ljekovitog bilja najstariji su način liječenja različitih bolesti. Sadrže mnoge bioaktivne molekule kojima se pripisuju pozitivni učinci na zdravlje organizma. Jedni od najzastupljenijih i najbrojnijih skupina sekundarnih biljnih tvari jesu fenolni spojevi ili polifenoli koji, ukoliko su uneseni u ljudski organizam prehranom, posjeduju brojna dokazana fiziološka i antioksidacijska svojstva (Scalbert i Williamson, 2000; Havsteen, 2002). Mnoge skupine ovih spojeva su pokazale širok raspon bioloških učinaka u prevenciji raka, dijabetesa, kardiovaskularnih, neurodegenerativnih i drugih bolesti (Li i Paxton, 2011; Rao *i sur.*, 2016).

Većina je istraživanja polifenola usmjerena na pozitivne učinke u liječenju ili ublažavanju mnogih patoloških stanja, zbog dokazane sposobnosti polifenola da inhibiraju specifične enzime, stimuliraju hormone i neurotransmitere, keliraju prijelazne metale poput bakra i željeza, moduliraju receptore i interferiraju sa staničnim signalnim putovima te neutraliziraju oksidacijske procese slobodnih radikala u organizmu ljudi i životinja (Cao *i sur.*, 1997; Scalbert i Williamson, 2000; Del Rio *i sur.*, 2013).

S obzirom da je primjena polifenola ograničena na topičku i oralnu upotrebu, biološki učinci pojedinih komponenti prisutnih u biljnim ekstraktima ili drugim biljnim pripravcima ovise o njihovoj apsorpciji, metabolizmu, raspodjeli i izlučivanju iz organizma, tj. bioraspoloživosti nakon njihovog unosa u organizam kao i redukcijskih svojstava nastalih metabolita. Iz tog razloga se sve veće značenje pridaje istraživanju metaboličkih procesa polifenola u organizmu pa je potrebno široko znanje o njihovoj farmakokinetici i bioraspoloživosti kako bi se utvrdio stvaran utjecaj dnevnog unosa tih komponenata na zaštitu i poboljšanje zdravstvenog statusa organizma. Razumijevanje procesa uključenih u apsorpciju i raspodjelu polifenola je ključno za određivanje njihovih potencijalnih bioaktivnih učinaka *in vivo*, kao i sveukupnog značaja u sprječavanju niza bolesti povezanih s oksidacijskim stresom (Rice-Evans *i sur.*, 2000; Qiao *i sur.*, 2014).

Novija istraživanja o bioapsorpciji polifenola, navode slabu bioraspoloživost nakon izlaganja organizma relativno visokim dozama. Glavna zapreka u njihovoj farmakološkoj upotrebi je niska bioraspoloživost povezana s međureakcijama polifenola u različitim fazama probave, apsorpcije i procesa raspodjele, koji mijenjaju njihovu molekularnu strukturu, posebice međureakcije s hranom, probavnim enzimima, crijevnim prijenosnicima i krvnim proteinima (Gonzales *i sur.*, 2015). Tijekom apsorpcije polifenola dolazi do promjene molekula u različitim metaboličkim procesima.

Jedna od biljaka čiju ljekovitost narodna medicina poznaje od davnina je trnina (*Prunus spinosa* L.). Svi dijelovi trnina, a posebno cvjetovi i plodovi bogati su polifenolima i predstavljaju dobar izvor smjese polifenola za ispitivanje afiniteta crijevne bioapsorpcije u miševa. Plodovi trnina tradicionalno su konzumirani u Hrvatskoj, uglavnom među seoskim stanovništvom, tijekom zimskih mjeseci. Plodovi su najčešće termički obrađeni kako bi se smanjila gorčina i trpkost. Konzumacija trnina u drugoj polovici 20. stoljeća znatno je smanjena, a u 21. stoljeću potpuno je napuštena, vjerojatno kao posljedica poslijeratne urbanizacije i opadanja broja seoskog stanovništva. U drugim mediteranskim zemljama još se konzumira u raznim prehrambenim proizvodima. Zbog iznimno zanimljivih ljekovitih svojstava i farmakološkog djelovanja, posljednjih se godina preispituju industrijska i farmakološka svojstva svih dijelova biljke trnina kao potencijalni farmakološki izvor polifenola, nutriceutika i funkcionalne hrane (Menendez-Baceta *i sur.*, 2012; Alarcón *i sur.*, 2015; Mikulic-Petkovsek *i sur.*, 2016; Meschini *i sur.*, 2017).

U ovom *in vivo* istraživanju kao bogat izvor polifenola korišten je vodeni ekstrakt cvijeta trnina. Prednosti tekućih ekstrakata su: isti omjer aktivnih spojeva u početnom materijalu i pripravku za upotrebu, lakše rukovanje i doziranje te zadržavanje hlapivih komponenata u ekstraktu (Redchenkova i Khiskova, 2006). Prema dosadašnjim istraživanjima cvijet trnina sadrži visok maseni udio polifenola poput kvercetina, kampferola i rutina (Olszewska *i sur.*, 2001; Elez Garofulić *i sur.*, 2018) za koje je poznato da imaju izrazito antioksidacijsko djelovanje te blagotvorni učinak na zdravlje, kako ljudi, tako i životinja (Yuksel, 2015).

## 1.1. Ciljevi rada

Iako postoje literaturni podatci o apsorpciji, raspodjeli, metabolizmu (ADM) i koncentracijama apsorbiranih polifenolnih molekula u pojedinim organima, tj. bioraspoloživosti, podatci uglavnom opisuju bioraspoloživost pojedinih molekula, a nema podataka o istovremenom učinku ili farmakokinetici ovih molekula iz prirodnih biljnih ekstrakata koji prate dinamiku apsorpcije ili promjene više različitih skupina polifenolnih molekula istovremeno.

Ciljevi ovog doktorskog rada su:

1. Utvrditi na *in vivo* modelu miša apsorpciju, raspodjelu i metabolizam pojedinih skupina polifenolnih molekula nakon unosa biljnog ekstrakta cvijeta trnine i ekstrakta cvijeta trnine s prehranom obogaćenom proteinima, mastima i šećerima, tijekom vremena u tkivima jetre, bubrega, mozga i tankog crijeva.
2. Istražiti kvalitativne i kvantitativne promjene polifenola ekstrakta cvijeta trnine i ekstrakta cvijeta trnine s prehranom obogaćenom proteinima, mastima i šećerima te njihove specifične afinitete za zadržavanjem u navedenim tkivima pri akutnoj i subkroničnoj izloženosti ovisno o uvjetima probave.
3. Istražiti afinitet pojedinih polifenolnih skupina za specifične organe, bioakumulacijski potencijal nakupljanja u pojedinim organima te biološki raspoloživu maksimalnu koncentraciju koju doseže pojedina skupina fenola unesena u obliku ekstrakta cvijeta trnine, te ekstrakta cvijeta trnine s prehranom obogaćenom proteinima, mastima i šećerima.
4. Odrediti antioksidacijski utjecaj polifenola ekstrakta cvijeta trnine na biomarkere oksidacijskog stresa (MDA, PC, CAT, GSH, SOD). Povezati bioraspoloživost pojedine skupine polifenola ili njihovih metabolita s aktivacijom antioksidacijskog sustava obrane u navedenim organskim sustavima.
5. Odrediti antioksidacijski kapacitet pojedinih tkiva u homogenatima pojedinih organa, te povezati biomarker oksidacijskog stresa s antioksidacijskim kapacitetom tkiva i pojedinim polifenolnim molekulama najviše akumuliranim u pojedinom organu ovisno o afinitetu molekule.

## **1.2. Hipoteze rada**

Hipoteze ovog doktorskog rada su:

- apsorpcijom i bioraspodjelom po organima u različitim vremenima bioakumuliraju se različite vrste polifenolnih spojeva
- bioraspoloživost polifenola ovisi o primjenjenoj dozi
- polifenoli aktiviraju enzime uključene u antioksidacijski sustav obrane
- prehrana obogaćena proteinima, mastima i ugljikohidratima utječe na apsorpciju i bioraspodjelu polifenola

## **1.3. Uporabljene metode za ispitivanje ciljeva rada**

Sastav pojedinih polifenolnih skupina, tj. bioraspoloživost i metabolizam polifenola u organima miša bit će provedeno pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti povezane sa spektrometrom masa (UPLC MS/MS).

Lipidna peroksidacija utvrdit će se mjerenjem krajnjeg produkta lipidne peroksidacije malondialdehida (MDA). Za utvrđivanje količine oštećenja proteina koristit će se metoda mjerenja karboniliranih proteina po Levine *i sur.* (1994), a antioksidacijska sposobnost polifenola procijenit će se određivanjem koncentracije GSH s DNTB-om (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina). Aktivnost SOD-a odredit će se inhibicijom redukcije citokroma C u sustavu ksantin/ksantin oksidaza prema modificiranoj metodi Flohé i Ötting (1984), dok će se aktivnost katalaze (CAT) odrediti mjerenjem količine enzima potrebnog za razgradnju 1  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

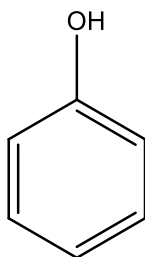
Antioksidacijski kapacitet tkiva u homogenatima pojedinih organa bit će određen spektrofotometrijskim metodama gašenja radikal-kationa 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske) kiseline (ABTS) i željezo reducirajućim antioksidacijskim potencijalom (engl. *ferric reducing antioxidant potential* – FRAP).

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. POLIFENOLI

#### 2.1.1. Klasifikacija i kemijska obilježja polifenola

Fenolni spojevi ili polifenoli su skupina sekundarnih biljnih metabolita koji su jedni od najbrojnijih spojeva u biljnom svijetu. Prema kemijskim obilježjima, polifenoli su spojevi koji u svojoj strukturi sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina (-OH) vezane izravno na jedan ili više aromatskih ugljikovodika (Vermerris i Nicholson, 2006). Njihova opća formula je Ar-OH, gdje je Ar fenil, supstituirani fenil ili neka druga arilna skupina. Cijela skupina ima naziv po osnovnom predstavniku, fenolu (Slika 1). Polifenoli su po mnogočemu slični alkoholima, ali kod njih hidroksilna skupina nije vezana na zasićeni atom ugljika, već direktno na aromatski ugljikovodik (Vermerris i Nicholson, 2006). Fenol je slaba kiselina, no znatno jača od alkohola, jer je aromatski prsten direktno vezan s kisikom te je veza između vodikovog i kisikovog atoma relativno slaba.



Slika 1. Kemijska struktura fenola (Vermerris i Nicholson, 2006)

Biljkama polifenoli primarno služe kao molekule uključene u obranu od UV zračenja ili napada patogena, pigmentaciju, rast, razmnožavanje i antioksidacijsku zaštitu (Manach *i sur.*, 2004). Pozitivna djelovanja polifenola navedena u znanstvenim istraživanjima obuhvaćaju: antiupalno, antimikrobno, antifungalno, diuretičko, antihepatotoksično, antihipertenzivno, antiaritmično, antikoagulirajuće, spazmolitičko, kardiotonično, antialergijsko, antiulkusno, analgetsko, antimalarično, antikancerogeno, hipoglikemijsko i antioksidacijsko djelovanje (Petrik, 2008; Huang *i sur.*, 2010; Mishra *i sur.*, 2013; Moreno *i sur.*, 2015; Toiu *i sur.*, 2018). Zahvaljujući antioksidacijskim sposobnostima koje posjeduju, imaju značajnu ulogu u prevenciji različitih bolesti povezanih s oksidacijskim stresom, posebice kada je riječ o kardiovaskularnim i neurodegenerativnim bolestima te karcinomu. Također sudjeluju i u regulaciji aktivnosti širokog spektra enzima važnih za endogenu borbu s reaktivnim metabolitima kisika (glutation peroksidaza, katalaza, dismutaza) i staničnih receptora, kao i

inhibiciji njihove ekspresije (ksantin oksidaza) zbog čega im se i pripisuju gore navedena svojstva (Middleton *i sur.*, 2000; Valls *i sur.*, 2009; Tsao, 2010).

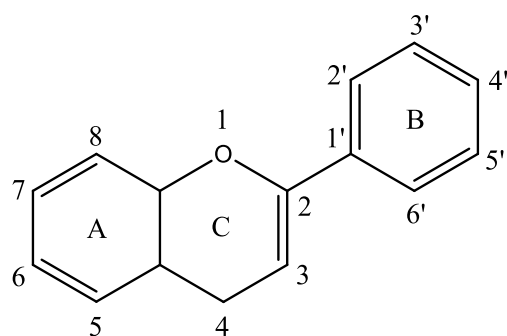
Iako se fenolni spojevi najčešće spominju kao spojevi s fenolnim prstenom oni su zapravo veoma raznolika skupina sekundarnih metabolita zbog čega su u literaturi prisutni mnogi načini njihove klasifikacije: prema strukturi, na temelju broja ugljikovih atoma u molekuli, na temelju biološke aktivnosti, biosintetskog puta i sl. (Tsao, 2010). Postoji preko 8000 strukturnih varijanti fenolnih spojeva, a općenito se kategoriziraju na flavonoide i neflavonoide (Figueiredo-González *i sur.*, 2014). Svi polifenoli nastaju od zajedničkog intermedijera, fenilalanina, odnosno bliskog prekursora šikiminske kiseline (Pandey i Rizvi, 2009a).

#### **2.1.1.1. Flavonoidi**

Flavonoidi su jedni od najzastupljenijih i najviše istraženih polifenola. To je skupina polifenolnih spojeva koji se nalaze u mnogim biljkama, koncentrirani u sjemenkama, pokožici ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću (Kazazić, 2004). S obzirom da flavonoidi imaju izraženu antioksidacijsku i antiradikalnu aktivnost, pripisuju im se mnoga terapijska djelovanja, npr. antibakterijsko, antiupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno djelovanje, a znatno utječu na boju i okus hrane (Kazazić, 2004). U samim biljkama flavonoidi djeluju antioksidacijski, antimikrobno, kao fotoreceptori te kao agensi za privlačenje pozornosti, odbijanje od prehrane i zaštitu od UV zračenja.

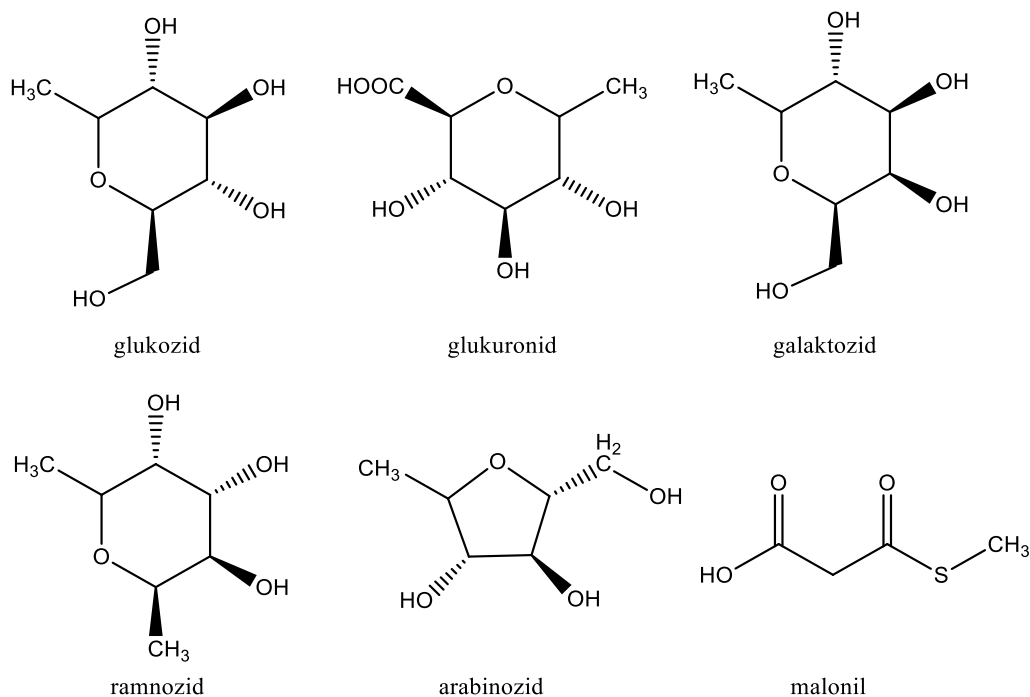
Aktivnost flavonoida ovisi o kemijskoj strukturi, stupnju hidroksilacije, ostalim zamjenama u strukturi poput konjugata, ili stupnja polimerizacije (Kumar i Pandey, 2013). Flavonoidi su velika skupina niskomolekularnih sekundarnih biljnih polifenola s istom osnovnom strukturom koju čini difenilpropanski kostur  $C_{15}$  ( $C_6-C_3-C_6$ ) (Slika 2) koji se sastoji od dva aromatska prstena (A i B) povezana s piranskim prstenom (C) koji sadrži kisik (Symonowicz i Kolanek, 2012). Do danas je poznato više od 9000 flavonoida (Wang *i sur.*, 2018).





Slika 2. Osnovna struktura flavonoida (Symonowicz i Kolanek, 2012).

Flavonoidi se međusobno razlikuju prema stupnju oksidacije centralnog prstena, izuzev halkona i dihidrohalkona kod kojih je piranski prsten otvoren. Mogu biti hidroksilirani, metoksirani, glikozidirani s monosaharidima ili oligosaharidima, a često su esterificirani organskim kiselinama. U prirodi flavonoidi dolaze u slobodnom ili konjugiranom obliku, a u biljkama se najčešće nalaze u obliku glikozida zbog šećerne grupe ili više njih koje su povezane preko -OH (*O*-glikozid) ili ugljik-ugljik (*C*-glikozid) veze. Pronađeno je više od 60 šećera koji su povezani na ovakav način s flavonoidima. Glikolizacija kod flavonoida uglavnom se događa na položaju C-3, a rjeđe na položaju C-7 (Kazazić, 2004). Najčešći glikozidi su glukozid, glukuronid, galaktozid, arabinozid, ramnozid, apiozilglukozid i malonil (Slika 3) (Hollman i Arts, 2000; Huang *i sur.*, 2010). Osim u obliku glikozida, flavonoidi mogu biti prisutni i u nestabilnoj formi aglikona (Cai *i sur.*, 2006; Fresco *i sur.*, 2006).

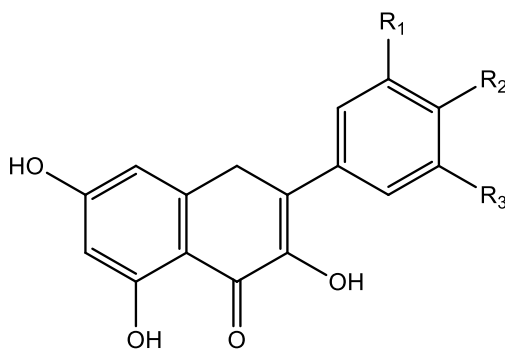


Slika 3. Najčešći šećeri povezani s flavonoidima (Huang *i sur.*, 2010).

Sinteza flavonoida u biljkama uvjetovana je brojnim faktorima kao što su svjetlost, uvjeti okoliša, genetika biljke, stupanj zrelosti i vrsta biljke. Ovisno o broju i položaju vezanih hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije centralnog C-prstena, flavonoidi se dijele u brojne podskupine: flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavan-3-oli, flavanoni te antocijane koji uključuju i antocijanidine (Manach *i sur.*, 2004; Pandey i Rizvi, 2009a). Ostale grupe flavonoida koji se u hrani nalaze u vrlo malim količinama su halkoni, dihidrohalkoni, dihidroflavonoli, flavan-3,4-dioli, kumarini i auronni (Manach *i sur.*, 2004; Pandey i Rizvi, 2009b).

## Flavonoli

Flavonole karakterizira osnovna C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> struktura (Slika 4). U stanicama se pojavljuju gotovo isključivo kao glikozidi. Najčešći šećer vezan za molekulu aglikona flavonola je glukoza, ali se vezati mogu i galaktoza, ramnoza, arabinoza, ksiloza. Flavonoli također mogu biti acilirani s različitim cimetnim ili nekim drugim fenolnim kiselinama (Robards *i sur.*, 1999; Hollman i Arts, 2000; Häkkinen, 2000). Pojavljuju se u nadzemnim dijelovima biljaka, dok su u biljnim dijelovima koji se razvijaju ispod površine zemlje nađeni samo u tragovima.



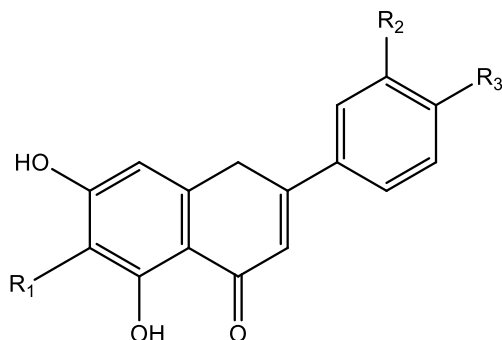
*kvercetin*: R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=OH; *miricetin*: R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=OH; *kampferol*: R<sub>2</sub>=OH

Slika 4. Strukturna formula flavonola (Huang *i sur.*, 2010).

Flavonolni aglikoni dosta se razlikuju u hidroksilaciji i metilaciji, pa su zbog toga također izuzetno velika podgrupa spojeva. U flavonole spadaju kvercetin, miricetin, kampferol, morin, galangin, a njihovi glikozidi (rutin, astragalin) su dominantni predstavnici ove skupine flavonoida (Huang *i sur.*, 2010). Najčešći aglikoni flavonola kvercetin i kampferol sami imaju najmanje 279 do 347 različitih glikozidnih kombinacija (Tsao i McCallum, 2010). Ovi flavonoli slabo su topivi u vodi i žute su boje. Aglikoni flavonola nisu prisutni u biljkama, ali ako su prisutni, vjerojatno su rezultat nekog procesa obrade hrane kao što je zamrzavanje, sterilizacija ili fermentacija (Manach *i sur.*, 2004).

## Flavoni

Flavoni su strukturno slični flavonolima, osim što im nedostaje hidroksilna skupina na C-3 atomu (Slika 5). Nisu rasprostranjeni kao flavonoli, iako su značajne količine nađene u celeru, peršinu i sličnim biljkama. Flavoni imaju veliku mogućnost supstituiranja, kao što je hidroksilacija, metilacija, *O*- i *C*-glikolizacija, te alkilacija (Del Rio *i sur.*, 2013). U skupinu flavona spadaju spojevi luteolin, apigenin, baikalein, krisin i njihovi glikozidi (apigetrin, viteksin i baikalin) (Huang *i sur.*, 2010).

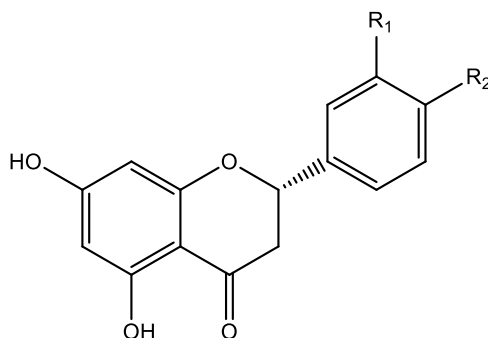


*luteolin*: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH, R<sub>3</sub>=OH; *apigenin*: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=OH; *krisin*: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=H;  
*baikalein*: R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=H

Slika 5. Strukturna formula flavona (Huang *i sur.*, 2010).

## Flavanoni

Flavanone karakterizira odsutnost dvostruke veze na C-2 atomu (Slika 6), a pojavljuju se kao hidroksilni, glikolizirani i *O*-metilizirani derivati. U izrazito velikim količinama nalaze se u citrusnom voću i to posebice u kori (Del Rio *i sur.*, 2013). U skupinu flavanona spadaju naringenin, hesperetin, eriodiktol i njihovi glikozidi (naringin, hesperidin i likviritin) (Huang *i sur.*, 2010).

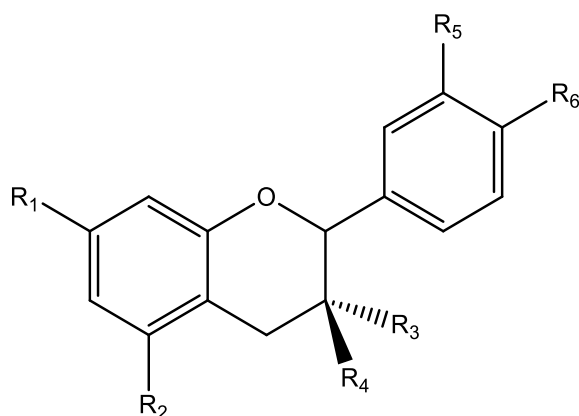


*hesperetin*: R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=OCH<sub>3</sub>; *naringenin*: R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=OH; *eriodiktol*: R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=OH

Slika 6. Strukturna formula flavanona (Del Rio *i sur.*, 2013)

## Flavan-3-oli

Flavan-3-oli su kompleksna skupina flavonoida koji imaju zasićenu vezu između C-2 i C-3 atoma (Slika 7). Flavan-3-oli obuhvaćaju velik broj spojeva od najjednostavnijih monomera (katehini, epikatehini, galokatehini), dimera do oligomera i polimernih kondenzata (proantocijanidini) (Del Rio *i sur.*, 2013). Flavan-3-oli se uvriježeno zovu katehini (Tsao, 2010). Katehini imaju dva epimera, ovisno o prostornoj konfiguraciji veza između prstena B i 2. mjesta ugljikovog atoma te hidroksilne grupe na 3. mjestu. Ova dva epimera, epikatehin(-) i katehin(+) te njihovi derivati, epigalokatehin i galokatehin, zajednički su kategorizirani kao katehini. Galokatehin i epigalokatehin sadrže dodatnu hidroksilnu grupu na prstenu B. Flavan-3-oli ili katehini često se nalaze u kori voća i nekih vrsta povrća. Važno svojstvo flavan-3-ola je njihova sposobnost polimerizacije. Ova polimerizacija događa se kao rezultat autooksidacije, ali češće su te reakcije katalizirane nekim enzimima (polifenoloksidaza), koji se nalaze u većini biljnih tkiva (Hollman i Arts, 2000). Polimerni oblici odgovaraju procijanidinima, koji se zovu i proantocijanidini ili kondenzirani tanini. Procijanidini obično sadrže dvije do šezdeset jedinica monomera flavan-3-ola i polimerizacija se najčešće odvija ugljik-ugljik vezom između mjesta 8 i mjesta 4 (Tsao i McCallum, 2010). U voću se flavan-3-oli najčešće nalaze u obliku oligomernih ili polimernih formi tj. u obliku proantocijanidina ili tanina, no moguće je pronaći i slobodne monomere flavan-3-ola. Tako se monomeri (+)-katehin, (-)-epikatehin, (+)-galokatehin i (-)-epigalokatehin nalaze u voću češće u slobodnoj formi, a rjeđe u formi glikozida što ih razlikuje od ostalih flavonoida (Mattila *i sur.*, 2006).

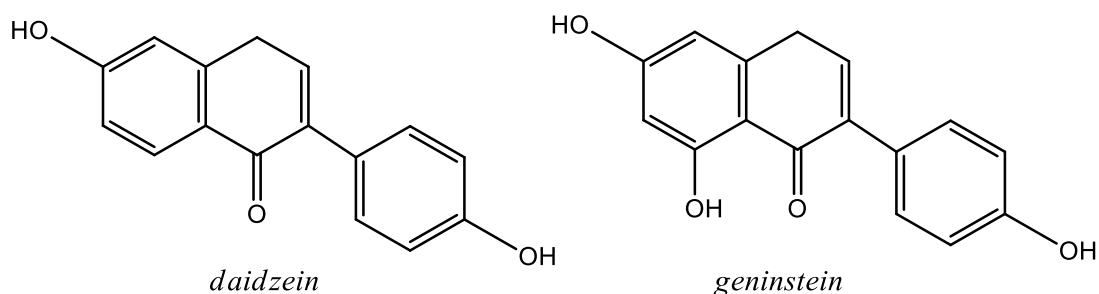


*katehin*:  $R_1=R_2=R_4=R_5=R_6=OH$ ,  $R_3=H$ ; *epikatehin*:  $R_1=R_2=R_3=R_5=R_6=OH$ ,  $R_4=H$

Slika 7. Strukturna formula flavan-3-ola (Del Rio *i sur.*, 2013).

## Izoflavoni

Izoflavoni se strukturno razlikuju od ostalih flavonoida po tome što imaju svoj B prsten vezan na C-3 atom umjesto na C-2 atom. Nađeni su isključivo u mahunarkama i soji. Značajne količine daidzeina i genisteina (Slika 8) se pojavljuju u soji uglavnom u obliku 7-O-(6"-O-acetil) glukozida. Fermentirani proizvodi od soje mogu biti bogati aglikonima, što je rezultat hidrolize glikozida, a proizvodi čija proizvodnja uključuje zagrijavanje, primjerice sojino mlijeko i tofu, sadrže smanjene količine izoflavona, većinom u formi daidzeina i genisteina koji su rezultat degradacije malonil- i acetilglukozida (Del Rio *i sur.*, 2013). Zajedno s lignanima čine skupinu fitoestrogena, zbog strukture koja je slična strukturi estrogena.

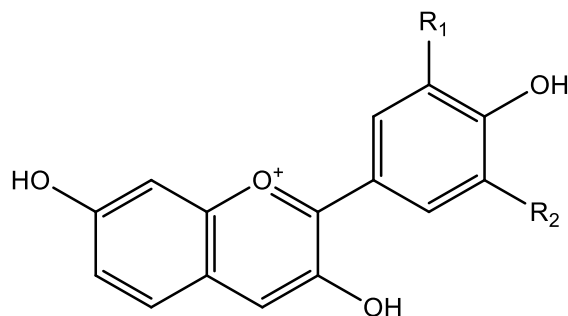


Slika 8. Strukturne formule izoflavona daidzeina i genisteina (Del Rio *i sur.*, 2013)

## Antocijani

Antocijani pripadaju najvećoj skupini flavonoida (Balasundram *i sur.*, 2006). U prirodi su najveća i najvažnija skupina pigmenata topljivih u vodi s preko 600 različitih spojeva (Clifford, 2000). Antocijani (od grčkog *anthos*=cvijet i *kianos*=plava) su pigmenti odgovorni za nijanse narančaste, ružičaste, ljubičaste i plave boje u cvijeću i plodovima nekih biljaka. Glavni su sastojci crvenih, plavih i ljubičastih pigmenata u većine cvjetnih latica, voća i povrća (Anderson i Jordheim, 2006). Po kemijskoj strukturi antocijani su glikozilirani, polihidroksi ili polimetoksi derivati 2-benzil-1-benzopirilium kationa (flavilium kationa) te sadrže dva fenolna prstena (A i B) koji su povezana preko centralnog piranskog prstena C. Aglikoni antocijana se nazivaju antocijanidini, a obično su penta (3,5,7,3',4') ili heksa supstituirani (3,5,7,3',4',5'). U prirodi je do sada poznato 6 antocijanidina: pelargonidin, cijanidin, peonidin, delfinidin, petunidin i malvidin (Tsao, 2010) (Slika 9). Ovi se aglikoni međusobno razlikuju po broju hidroksilnih i metoksilnih grupa na B prstenu flavilium kationa. Antocijanidini se kao takvi rijetko nalaze u prirodi. U obliku glikozida odnosno antocijana nalaze se u cvijeću, voću itd. Antocijani su mnogo stabilniji i topljiviji u vodi od antocijanidina zbog glikozilacije (Rein, 2005). Najčešći šećeri vezani za molekulu

antocijanidina su glukoza, ramnoza, galaktoza, arabinoza, rutinoza, soforoza, sambubioza i dr. (de Ancos *i sur.*, 1999.; Kähkönen *i sur.*, 2003). Antocijani mogu biti acilirani i s raznim hidroksicimetnim (kafeinska, *p*-kumarinska, ferulinska kiselina) ili alifatskim kiselinama (octena, jabučna, oksalna) (Clifford, 2000).



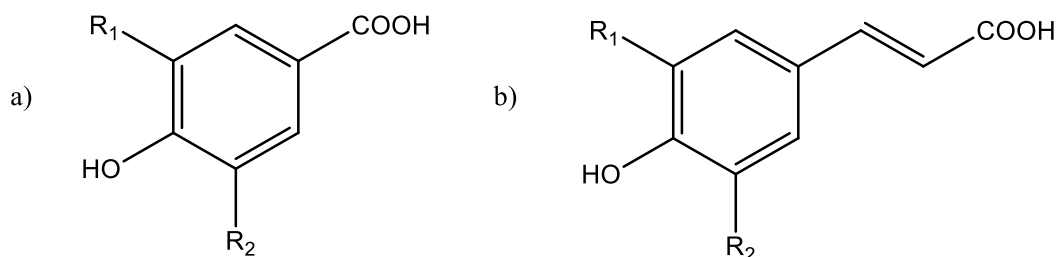
*delfinidin*:  $R_1=OH$ ,  $R_2=OH$ ; *cijanidin*:  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ; *malvidin*:  $R_1=OCH_3$ ,  $R_2=OCH_3$ ;  
*peonidin*:  $R_1=OCH_3$ ,  $R_2=H$ ; *petunidin*:  $R_1=OH$ ,  $R_2=OCH_3$ ; *pelargonidin*:  $R_1=H$ ,  $R_2=H$

Slika 9. Strukturna formula antocijanidina (Huang *i sur.*, 2010)

### 2.1.1.2. Neflavonoidi

Nakon flavonoida, drugu skupinu po važnosti i zastupljenosti biljnih polifenola čine fenolne kiseline. Strukturu fenolnih kiselina čini benzenski prsten povezan karboksilnom skupinom (Lafay i Gil-Izquierdo, 2008). Prirodne fenolne kiseline u slobodnom ili u konjugiranom obliku pojavljuju se u obliku amida, estera ili su vezane s šećerima u obliku glikozida. Razlikujemo dvije skupine fenolnih kiselina: derivate hidroksibenzojeve kiseline i derivate hidroksicimetne kiseline (Slika 10). U skupinu derivata hidroksibenzojeve kiseline ubrajamo: vanilinsku, siringinsku, galnu, *m*-hidroksibenzojevu, protokatehinsku kiselinu, dok u derivate hidroksicimetne kiseline ubrajamo: *p*-kumarinsku, ferulinsku, kafeinsku, sinapinsku i klorogensku kiselinu (Han *i sur.*, 2007; Pereira *i sur.*, 2009; Dai *i sur.*, 2010; Huang *i sur.*, 2010).

Fenolne kiseline i njihova aktivnost su godinama predmet brojnih bioloških, kemijskih i medicinskih istraživanja. Kao i većina ostalih polifenola posjeduju snažnu antioksidacijsku, antiinflamatornu, antikancerogenu i antimikrobnu aktivnost, a također su pokazale i pozitivan učinak u liječenju mnogih kardiovaskularnih bolesti i sprječavanju ateroskleroze (Manda *i sur.*, 2010). Za biološku aktivnost je zaslužan isključivo aglikonski dio molekula.



a) *p*-hidroksibenzojeva kiselina:  $R_1 = R_2 = \text{H}$ ; protokatehinska kiselina:  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{OH}$ ;  
galna kiselina:  $R_1 = R_2 = \text{OH}$ ; vanilinska kiselina:  $R_1 = \text{OCH}_3$ ,  $R_2 = \text{H}$ ; siringinska kiselina:  
 $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$

b) *p*-kumarinska kiselina:  $R_1 = R_2 = \text{H}$ ; kafeinska kiselina:  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{OH}$ ; ferulinska kiselina:  $R_1 = \text{H}$ ,  
 $R_2 = \text{OCH}_3$ ; sinapinska kiselina:  $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$

Slika 10. Strukturne formule fenolnih kiselina (Huang *i sur.*, 2010)

### 2.1.2. Fenolni spojevi cvijeta trnine

Trnina (*Prunus spinosa* L.) je višegodišnja biljka iz porodice *Rosaceae*. Raste kao trnovit, listopadni grm na padinama neobrađenih područja. Biljka je grm, visok od 1 do 3 metra kojem su mladi izdanci baršunasto dlakavi, a prostrane grane završavaju oštrim trnjem. Kora je crno-smeđe boje. Listovi su s peteljkom ovalnog oblika i nazubljeni, s donje strane u početku razvoja oskudno dlakavi, a kasnije goli. Bijeli cvjetovi pojavljuju se neposredno prije listanja tako da se jedva zamjećuju grane, imaju po pet bijelih latica, a pojavljuju se pojedinačno ili po dva-tri zajedno (Slika 11). Plodovi su koštunice okrugla oblika veličine do 1,5 cm, tamnoplave boje (Slika 11). Vrlo se čvrsto drže grana pa na njima ostaju do proljeća. Meso im je zelenkasto, trpkasto i kiselo, te se teško odvaja od koštice, a okus kiseo i trpak, te steže. Miris i okus najbliži su gorkom bademu. Trnina cvjeta od ožujka do svibnja, a plodovi sazrijevaju u kasno ljeto i jesen te se ponekad mogu naći na biljci i tijekom zimskog razdoblja. Cvjeta najranije među domaćim grmljem (Popescu i Caudullo, 2016). Biološka klasifikacija trnine prikazana je u Tablici 1.



Slika 11. Cvijet i plod trnine (Popescu i Caudullo, 2016).

Tablica 1. Biološka klasifikacija biljke trnine\*

Carstvo	<i>Plantae</i> (biljke)
Odjeljak	<i>Magnoliophyta</i> (kritosjemenjače)
Razred	<i>Magnoliopsida</i> (dvosupnice)
Red	<i>Rosales</i>
Porodica	<i>Rosaceae</i> (ružovke)
Rod	<i>Prunus</i> L.
Vrsta	<i>Prunus spinosa</i> L. (trnina)

\*preuzeto od Grlić (2005).

Uobičajeni nazivi u hrvatskom govornom području za ovu vrstu su: crna trnina, crni trn, divlje šljivice, trnavka, trnula, trnjina, trnjula, mrki trn, kukinj (Grlić, 2005). U Hrvatskoj je vrlo rasprostranjena, većinom uz rubove šuma, na neplodnom tlu i pašnjacima, najčešće na vapnenačkom tlu. Porijeklom je iz Europe i zapadne Azije, a raste u većini dijelova južno-srednje Europe, osim na donjoj polovici Pirinejskog poluotoka, gdje se širi sjeverno sve do južnog dijela Skandinavskog poluotoka. Istočno doseže Malu Aziju, Kavkaz i Kaspijsko jezero. Može se pronaći i na izoliranim područjima u Tunisu i Alžiru, a uvezena je i lokalno uzgajana i u Sjevernoj Americi te na Novom Zelandu (Popescu i Caudullo, 2016).

Zdravstveni učinak polifenola ovisi o konzumiranoj količini i njihovoj bioraspoloživosti (Pichichero *i sur.*, 2009). Danas su u velikoj mjeri uspostavljene metode izolacije, identifikacije i kvantifikacije polifenola i drugih fitokemikalija (Zhimin *i sur.*, 2012).



Cvjetovi i listovi trnine bogati su polifenolima, poput 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). Štoviše, cvjetovi sadrže proantocijanidine tipa A, lišće karotenoide i norizoprenoide, a oba dijela biljke sadrže fenolne kiseline, tanine i vitamin C (Olszewska *i sur.*, 2001; Elez Garofulić *i sur.*, 2018). Fenolni spojevi koji su do sada određeni u cvijetu trnine prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. UHPLC-PDA-ESI-MS podatci polifenola u suhim ekstraktima cvijeta *P. spinosa* određeni u dosadašnjim istraživanjima\*

Fenolni spoj	Kemijska formula	Vrsta ekstrakcije	Literatura
<b>Fenolne kiseline</b>			
3- <i>O</i> -kafeoil kininska kiselina (neoklorogenska kiselina) <sup>a,b</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	BF, EAF, MED, WR	(Clifford <i>i sur.</i> , 2003)
Heksozid kafeinska kiselina <sup>b</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	BF, MED	
3- <i>O</i> - <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina <sup>b</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	BF, EAF, MED, WR	(Clifford <i>i sur.</i> , 2003)
5- <i>O</i> -kafeoil kininska kiselina <sup>b</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	BF, EAF, MED, WR	(Clifford <i>i sur.</i> , 2003)
3- <i>O</i> -feruloil kininska kiselina <sup>b</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	BF, EAF, MED, WR	(Clifford <i>i sur.</i> , 2003)
Kafeinska kiselina <sup>b</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	DEF	(Pinacho <i>i sur.</i> , 2015)
4- <i>O</i> -kafeoil kininska kiselina (kriptoklorogenska kiselina) <sup>a,b</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	BF, EAF, MED, WR	(Clifford <i>i sur.</i> , 2003)
Heksozid ferulinska kiselina <sup>b</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	BF, EAF, MED	
5- <i>O</i> - <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina <sup>b</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	BF, EAF, MED	(Clifford <i>i sur.</i> , 2003)
4- <i>O</i> - <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina <sup>b</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	BF, EAF, MED	(Clifford <i>i sur.</i> , 2003)
<i>p</i> -kumarinska kiselina <sup>a,b</sup>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	DEF	
4- <i>O</i> -feruloil kininska kiselina <sup>b</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	BF	(Clifford <i>i sur.</i> , 2003)
<b>Flavan-3-oli</b>			
(-)-epikatehin <sup>a,b</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	DEF	(Pinacho <i>i sur.</i> , 2015)
(epi)katehin-A-(epi)katehin	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	EAF, MED, BF, DEF	(Pinacho <i>i sur.</i> , 2015; Hamed <i>i sur.</i> , 2014; Li i Deinzer, 2008; Kolodziej <i>i sur.</i> , 1991)
(epi)afzalehin-A-(epi)katehin	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	EAF, DEF	(Pinacho <i>i sur.</i> , 2015; Hamed <i>i sur.</i> , 2014; Li i Deinzer, 2008; Kolodziej <i>i sur.</i> , 1991)
(epi)afzalehin-A-(epi)katehin	C <sub>30</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	EAF	(Hamed <i>i sur.</i> , 2014; Li i Deinzer, 2008; Kolodziej <i>i sur.</i> , 1991; Pinacho <i>i sur.</i> , 2015)
(+)-katehin (CA) <sup>a,b</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	DEF	(Pinacho <i>i sur.</i> , 2015)
<b>Flavonoli</b>			
Kampferol heksozid <sup>b</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	BF, EAF, MED	
Kampferol ramnozid-heksozid <sup>b</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	BF	
Kampferol diheksozid <sup>b</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	BF, MED	
Kampferol 3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-arabinopiranozid-7- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranozid <sup>a,b</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	BF, MED	(Pinacho <i>i sur.</i> , 2015; Owczarek <i>i sur.</i> , 2017)
Kampferol-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-ksilopiranozid-7- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranozid (lepidozid) <sup>a,b</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	EAF, MED	(Owczarek <i>i sur.</i> , 2017)
Kampferol ramnozid-heksozid <sup>b</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	BF	
Kampferol heksozid-pentozid <sup>b</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub>	BF	
Kampferol pentozid <sup>b</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	EAF, DEF, MED	
Kampferol heksozid- ramnozid <sup>b</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	BF	
Kampferol 3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-arabinofuranozid-7- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranozid <sup>a</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	BF, EAF, DEF, MED	(Owczarek <i>i sur.</i> , 2017)
Kampferol heksozid-pentozid <sup>b</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub>	BF, EAF, MED	

Tablica 2. nastavak

Fenolni spoj	Kemijska formula	Vrsta ekstrakcije	Literatura
Kampferol 3,7-di- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranozid (kampferitrin) <sup>a</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	BF, EAF, MED	(Olszewska i Wolbiś, 2002a; Owczarek <i>i sur.</i> , 2017)
Kampferol 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-ksilopiranozid <sup>a</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	EAF, DEF, MED	(Olszewska i Wolbiś, 2001)
Kampferol heksozid <sup>b</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	EAF	
Kampferol heksozid-ramnozid <sup>b</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	BF	
Kampferol 3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-arabinofuranozid (juglanin) <sup>a</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	EAF, DEF, MED	(Olszewska i Wolbiś, 2001)
Kampferol 3- <i>O</i> -(4"- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukopiranozil)- $\alpha$ -L-ramnopiranozid (multiflorin B) <sup>a</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	BF, EAF, MED	(Olszewska i Wolbiś, 2002a)
Kampferol 3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranozid (afzeil) <sup>a</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	EAF, DEF, MED	(Olszewska i Wolbiś, 2001)
Kampferol acetil-heksozid-ramnozid <sup>a</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	EAF, MED	
Kampferol 7- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranozid <sup>a</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	BF, EAF, DEF, MED	(Olszewska i Wolbiś, 2001)
Kampferol <sup>a</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	EAF, DEF, MED	(Pinacho <i>i sur.</i> , 2015; Olszewska i Wolbiś, 2001)
Kampferol 3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> - <i>E</i> - <i>p</i> -kumaroil)- $\alpha$ -L-arabinofuranozid-7- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranozid <sup>a</sup>	C <sub>35</sub> H <sub>34</sub> O <sub>16</sub>	EAF, DEF, MED	(Olszewska i Wolbiś, 2002b)
Kampferol 3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> - <i>E</i> - <i>p</i> -kumaroil)- $\alpha$ -L-arabinofuranozid <sup>a</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	EAF, DEF, MED	(Olszewska i Wolbiś, 2001)
Kvercetin 3- <i>O</i> - $\alpha$ -D-ksilopiranozid (reintrin) <sup>a</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	EAF, DEF, MED	(Olszewska i Wolbiś, 2002a)
Kvercetin 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-galaktozid (hiperozid) <sup>a,b</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	EAF, MED	
Kvercetin 3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-arabinopiranozid (guaiaverin) <sup>a</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	EAF, DEF, MED	(Olszewska i Wolbiś, 2002a)
Kvercetin-3-(6"- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranozil)- $\beta$ -D-glukopiranozid (rutin) <sup>a,b</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	BF, MED	(Pinacho <i>i sur.</i> , 2015)
Kvercetin 3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukopiranozid (izokvercetin) <sup>a</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	EAF, MED	(Olszewska i Wolbiś, 2002a)
Kvercetin heksozid-pentozid <sup>b</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>16</sub>	BF, MED	
Kvercetin 3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-arabinofuranozid (avikularin) <sup>a</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	EAF, DEF, MED	(Pinacho <i>i sur.</i> , 2015; Olszewska i Wolbiś, 2001)
Kvercetin 3- <i>O</i> -(4"- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukopiranozil)- $\alpha$ -L-ramnopiranozid <sup>a</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	BF, EAF, MED	(Olszewska i Wolbiś, 2002a)
Kvercetin 3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranozid (kvercetin) <sup>a</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	EAF, DEF, MED	(Olszewska i Wolbiś, 2002a)
Kvercetin-3- <i>O</i> -(2"- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukopiranozil)- $\alpha$ -L-arabinofuranozid (rutin) <sup>a,b</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>16</sub>	BF, MED	(Olszewska i Wolbiś, 2002b)
Kvercetin <sup>a</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	EAF, DEF, MED	(Pinacho <i>i sur.</i> , 2015; Olszewska i Wolbiś, 2001)
Kvercetin 7- <i>O</i> - $\alpha$ -L-ramnopiranozid <sup>b</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	EAF	
Kvercetin acetil-heksozid-ramnozid <sup>b</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>32</sub> O <sub>17</sub>	EAF, MED	
Kvercetin <i>p</i> -kumaroil-pentozid <sup>b</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>24</sub> O <sub>13</sub>	DEF, MED	
Izorametn diheksozid <sup>b</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>17</sub>	BF, MED	
Nepoznat spoj		EAF, DEF, MED	

<sup>a</sup>Identificirano s autentičnim standardima.

<sup>b</sup>Otkriven po prvi puta u cvijetu *P. spinosa*.

Otapalo korišteno za ekstrakciju: MED –metanol-voda (7:3, v/v); DEF dietil-eter; EAF –etil-acetat; BF – *n*-butanol; WR – voda.\*preuzeto od Marchelak *i sur.* (2017).

Osim flavonoida i fenolnih kiselina, cvjetovi i listovi trnine sadrže sterole te triterpene. U cvjetovima su prisutni terpenoidni alkoholi  $\alpha$ - i  $\beta$ -amirini, od kojih je zastupljeniji  $\beta$ -amirin. Iz smjese triterpenskih kiselina identificirane su oleinska i ursolična. Od sterola je u najvećoj koncentraciji identificiran  $\beta$ -sitosterol, a u malim količinama potvrđena je i prisutnost  $\gamma$ -sitosterola, stigmasterola i sterol glikozida (Wolbiš *i sur.*, 2001).

Plod trnine sadrži značajan udio ukupnih fenola. Po koncentraciji najviše se ističu antocijani, (cijanidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-rutinozid, peonidin-3-*O*-glukozid) flavanol glikozidi (kvercetin, kampferol), fenolne kiseline (derivati neoklorogenske i kafeinske kiseline), derivati kumarina, te proantocijanidini tipa A (Barros *i sur.*, 2001).

Govoreći o makronutrijentima ploda trnine najveći udio čine ugljikohidrati i to 88.5% (od monosaharida prevladava glukoza, a od polisaharida celuloza i škrob). Udio proteina iznosi 3,4%, a udio masti svega 1,2-1,6% gdje prevladavaju nezasićene masne kiseline nad zasićenim masnim kiselinama te su najzastupljenije oleinska i linolenska masna kiselina. Od vitamina, najzastupljenija je askorbinska kiselina, također sadrži  $\alpha$  i  $\delta$ - tokoferole te malu količinu  $\beta$ -karotena (Barros *i sur.*, 2001).

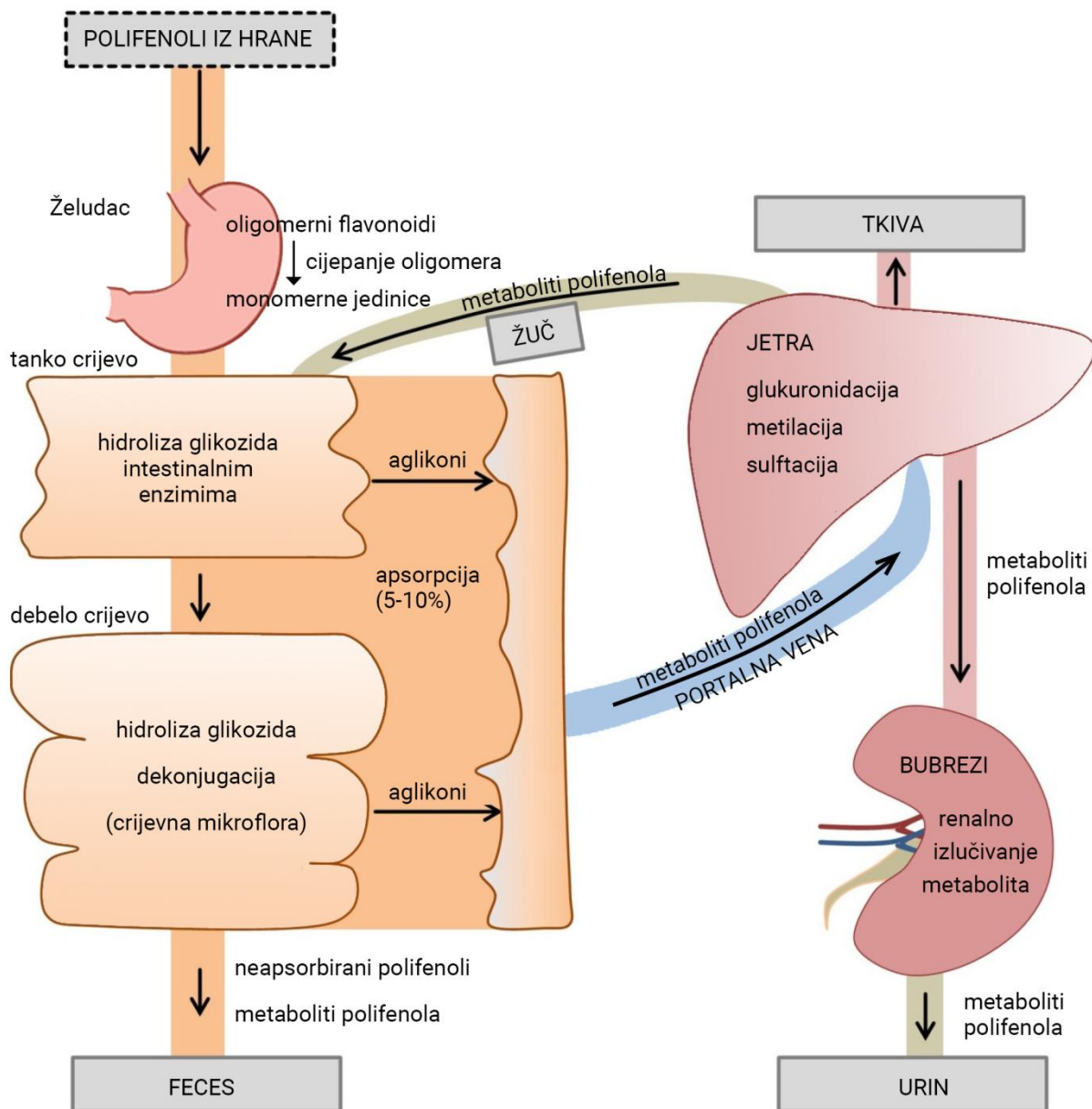
Budući da cvijet trnine, ali i ostali dijelovi biljke sadrže niz antioksidacijskih polifenolnih spojeva, vitamina, organskih kiselina, terpenoida, koji djeluju bioaktivno i pozitivno na ljudski i životinjski organizam, koriste se kao tradicionalni ljekoviti pripravci u narodnoj medicini u liječenju gastrointestinalnih, respiratornih, kardiovaskularnih, urinarnih i bubrežnih tegoba, hipertenzije, hiperkolesterolemije i raznih upalnih procesa u organizmu (Gelenčir, 1989; Blumenthal i Busse, 1998; Kültür, 2007; Calvo i Cavero, 2014; Jarić *i sur.*, 2015). Svi dijelovi trnine također posjeduju antioksidacijska i antimikrobna svojstva, te imaju kemopreventivno djelovanje (Borkowski *i sur.*, 1994; Guimarães *i sur.*, 2013; Popescu i Caudullo, 2016).

## **2.2. METABOLIZAM, BIORASPOLOŽIVOST I APSORPCIJA POLIFENOLA**

Antioksidacijski potencijal polifenola, tj. njihova potencijalna bioaktivnost *in vivo* ovisi o njihovom metabolizmu, apsorpciji, raspodjeli i izlučivanju iz organizma nakon njihovog unosa i redukcijskih svojstava nastalih metabolita (Viskupičová *i sur.*, 2008). Razumijevanje procesa uključenih u apsorpciju i raspodjelu polifenola je ključno za određivanje njihovih potencijalnih bioaktivnih učinaka *in vivo*, kao i sveukupnog značaja u sprječavanju niza bolesti. Postoji puno podataka u literaturi koji opisuju biotransformaciju flavonoida i drugih polifenola u tankom i debelom crijevu gastrointestinalnog sustava odnosno jetri (Spencer, 2003; Hollman, 2004; D' Archivio *i sur.*, 2010; Del Rio *i sur.*, 2013).

### **2.2.1. Metabolizam polifenola**

Danas je poznato da se polifenoli, nakon unosa, podvrgavaju metabolizmu, te da je njihova koncentracija u krvi znatno niža unatoč visokom unosu polifenola prehranom. Vrlo mali broj polifenola unesenih prehranom se izlučuje u nepromijenjenom obliku. Zbog toga je za očekivati kako na djelovanje polifenola u organizmu ne utječu samo ishodišne molekule, već i biološke značajke metabolita koji nastaju tijekom njihove razgradnje. Na Slici 12. je prikazan pregled nastajanja metabolita polifenola i njihove apsorpcije u ljudskom i životinjskom organizmu (Gessner *i sur.*, 2017).



Slika 12. Prikaz metabolizma i apsorpcije polifenola u ljudskom i životinjskom organizmu (Gessner *i sur.*, 2017).

### 2.2.1.1. Metabolizam polifenola u gornjem dijelu probavnog sustava

Promjene polifenola u gornjem dijelu probavnog sustava nisu intenzivne te polifenoli u tanko crijevo uglavnom dopijevaju u nepromijenjenom obliku.

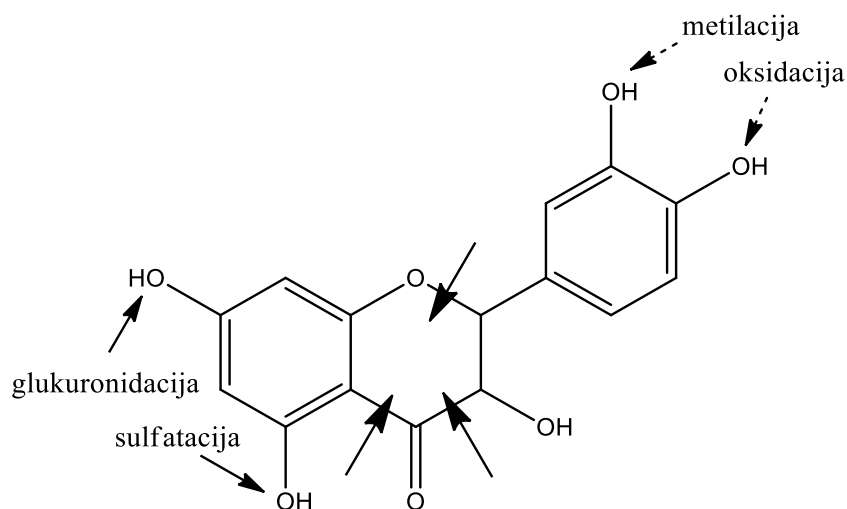
Istraživanja koja opisuju učinak sline i želučanog soka na promjenu strukture flavonoida, dokazala su da slina gotovo ne djeluje na stabilnost katehina iz zelenog čaja (Tsuchiya *i sur.*, 1997). Nadalje, inkubacija procijanidinskih oligomera (dimer-heksamer) u ljudskoj slini tijekom 30 minuta ne rezultira njihovim raspadom u manje oligomerne jedinice, što upućuje da te tvari ostaju intaktne u ustima i ždrijelu prije nego uđu u želudac (Spencer, 2003).

Pojedina istraživanja dokazala su da u usnoj šupljini dolazi do hidrolize flavonoidnih glikozida s glukoznim šećernim jedinicama poput kvercetin 4'-glukozida i genistein-7-glukozida bez daljnih strukturnih promjena. Nastankom farmakološki aktivnih aglikona omogućen je njihov učinak na inhibiciju proliferacije raka usne šupljine. Hidroliza se zbiva uglavnom enzimima epitelnih stanica, ali uz pomoć bakterija. Razlika u mikroflori usne šupljine značajno pridonosi varijabilnosti hidrolize glukozidnih flavonoida što utječe na metaboliziranje flavonoida i njihove učinke u organizmu (Walle *i sur.*, 2003).

Nakon prolaska kroz jednjak uneseni polifenoli dospijevaju u želudac. Iako se neki flavonoidi zbog niskog pH i djelovanja bakterija mogu razgraditi do fenolnih kiselina, u kiselim uvjetima želuca uglavnom nema značajnijih promjena (Weldin *i sur.* 2003). Flavonoidni glikozidi stabilni su na hidrolizu u kiselim uvjetima želuca te nepromijenjeni dospijevaju u tanko crijevo. *In vitro* istraživanje pokazalo je da su flavan-3-olni oligomeri u rasponu od dimera do dekamera izrazito nestabilni u uvjetima niskog pH kakav je prisutan u želudcu. Inkubacija procijanidina želučanim sokom u rasponu od 10 minuta do 3 sata je uzrokovala brzu razgradnju oligomera na epikatehinske monomerne i dimerne jedinice, ali i neke druge, tijekom kasnijeg vremenskog perioda (Spencer, 2003). Premda su neka istraživanja pokazala da ne postoji cijepanje procijanidina u želudcu, kemijska razgradnja procijanidina u *in vitro* uvjetima pri niskom pH je dobro određena; prema tome, ako je pH u želudcu dovoljno nizak, procijanidini će se brzo razgraditi do manjih flavan-3-olnih jedinica koje će nakon toga ući u tanko crijevo. Istraživanja provedena u *in vivo* uvjetima pokazala su da ne dolazi ni do kakve promjene u strukturi polimernih proantocijanidina u želudcu tako da u tanko crijevo dospijevaju nepromijenjeni (Manach *i sur.*, 2004; Rzeppa *i sur.*, 2012).

### **2.2.1.2. Metabolizam polifenola u tankom crijevu i jetri**

Jetra i tanko crijevo (osobito jejunum i ileum) su ključni organi odgovorni za različite biotransformacije, što dovodi do nastanka različitih konjugiranih oblika flavonoida. Međutim, bubreg i druga tkiva također su uključeni u metabolizam flavonoida (Manach *i sur.*, 2004). Najvažnije metaboličke reakcije biotransformacije flavonoida jesu glukunoridacija, sulfatacija, *O*-metilacija, oksidacija, redukcija i hidroliza (Rice-Evans, 2001) (Slika 13). Day *i sur.* (2000) utvrdili su da te reakcije znatno utječu na antioksidacijsko djelovanje flavonoida i njihovu međureakciju s proteinima. Važnost specifičnih reakcija konjugacije polifenola nije u potpunosti objašnjena i ovisi o prirodi supstrata i ingestirajućoj dozi (Manach *i sur.*, 2004).



Slika 13. Potencijalna mjesta biotransformacije i cijepanja prstena flavonoida (Rice-Evans, 2001).

Glavna metabolička reakcija kojoj podliježu flavonoidi je reakcija glukuronidacije. Sastoji se od prijenosa glukuronske kiseline koja je vezana kao UDP-glukuronska kiselina na određeni supstrat mikrosomalnim enzimima uridin-5'-difosfat glukuronizil transferaze (UGT). UGT porodica enzima pokazuje izuzetnu raznolikost u prepoznavanju supstrata i katalizira glukuronidaciju velikog broja funkcionalnih skupina (npr. -OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>, -SH). Reakcija se događa na luminalnoj strani endoplazmatskog retikuluma, a pretpostavlja se da najvažniju ulogu imaju UGT1A9 i UGT1A3, prisutne u crijevima i jetri (Chen *i sur.*, 2008). Reakcija glukuronidacije služi organizmu kako bi supstrate pojedinih metaboličkih putova učinio bolje topljivima u vodi. Smatra se da je 80% metaboličkog puta flavonoida rezultat djelovanja enzima UGT (Wu *i sur.*, 2011b,c). Također je dokazano da je reakcija glukuronidacije regiospecifična i da uvelike ovisi o strukturi flavonoida (Zhang *i sur.*, 2006; Wong *i sur.*, 2009; Wu *i sur.*, 2011a,b,c; Tang *i sur.*, 2012). Tako su flavonoidi sa supstituiranom OH skupinom na prstenu B (hesperetin) manje podložni glukuronidaciji, dok su oni s 3',4'-O-dihidroksi (kateholnim) prstenom B predominantno transportirani u obliku glukuronida, a intenzivno su glukuronidirani i oni s jednom OH skupinom na prstenu B. Tako je primjerice, naringenin u seroznoj tekućini nađen samo kao naringenin-7 glukuronid (Spencer, 2003). Proces glukuronidacije je vrlo brz i učinkovitiji od procesa oksidacije posredovan citokromom P450 (Otake *i sur.*, 2002).



Kemijska reakcija sulfatacije posredovana je sulfotransferazama (SULT), enzimima odgovornim za kataliziranje sulfatacije flavonoida i mnogih lijekova. SULT1A1 i SULT1A2 su uključeni u sulfataciju fenolnih supstrata, dok su SULT1A1 i SULT1A3 odgovorni za sulfataciju (-)epikatehina (Vaidyanathan i Walle, 2003). S obzirom da se sulfatirani flavonoidi vraćaju natrag u crijevni lumen i nisu dobro apsorbirani, proces sulfatacije flavonoida važan je u razumijevanju biološke raspoloživosti flavonoida (Barrington *i sur.*, 2009). Između mnogih izooblika porodice enzima SULT, najvažniji izoenzim u sisavaca, uključen u metabolizam polifenola, kao što su flavonoidi je SULT1A3 (Wu *i sur.*, 2011a; Meng *i sur.*, 2012). U istraživanjima koja su obuhvaćala sulfataciju flavonoida, utvrđeno je da se proces sulfatacije događa uglavnom na položaju C7-OH, a uklanjanje hidroksilne skupine smanjuje ili inhibira proces sulfatacije (Wu *i sur.*, 2011a; Meng *i sur.*, 2012; Yang *i sur.*, 2012).

Razlika u enzimskoj kinetici glukuronidacije i sulfatacije istražena je na primjeru baikaleina (Zhang *i sur.*, 2006). Iako se sulfatacija odvija uz veći afinitet enzima prema supstratu, kinetika sulfatacije već je pri manjem povećanju koncentracije supstrata inhibitorna. S druge pak strane, glukuronidacija se odvija uz veću učinkovitost i kapacitet te je dominantan metabolički put u širokom rasponu koncentracije supstrata i u jetri i u crijevima (Zhang *i sur.*, 2006). Na promjenu djelovanja flavonoida konjugacija utječe različito. Manach *i sur.* (2005) su utvrdili su da sulfatni esteri i glukuronidi djelomice zadržavaju antioksidacijsko djelovanje te i dalje odgađaju *in vitro* oksidaciju niskomolekularnih lipoproteina. Međutim, istraživanja Zhanga *i sur.* (2006) su dokazala da glukuronidacija flavonoida smanjuje njihove biološke učinke. Glukuronidi daidzeina i genisteina imaju 10 odnosno 40 puta niži afinitet prema estrogenim receptorima u usporedbi s pripadajućim aglikonima (Scalbert *i sur.*, 2002).

*O*-metilacija flavonoida je uobičajena ksenobiotička transformacija u mikroorganizmima, biljkama i sisavcima katalizirana *O*-metiltransferazama (OMT) (Hosny *i sur.*, 2014). Flavan-3-oli su u usporedbi s drugim flavonoidima podložniji metilaciji u jejunumu, što je objašnjeno specifičnošću katehol-*O*-metiltransferaze (COMT) prema ovim spojevima. Iako su glavni metaboliti u seroznoj tekućini nakon perfuzije jejunuma s katehinom i epikatehinom glukuronidi (na položaju 5 i 7 prstena A), također su nađene visoke razine *O*-metil (uglavnom 3'-*O*-metil katehin) i *O*-metil-glukuronidnih formi. Procijanidni dimeri građeni od podjedinica flavan-3-ola u manjem se dijelu metiliraju u odnosu na nekonjugirane flavan-3-ole jer je tijekom njihovog cijepanja metabolizam ograničen. U jetri se odvija daljna metilacija katehina, kao i druge vrste konjugacijskih procesa.

*O*-metilacija može smanjiti biološku aktivnost polifenola: antioksidacijsko djelovanje i učinak na endotelnu funkciju (Spencer, 2003). Brža i potpunija metilacija apsorbiranih flavonoida reducira izloženost ishodišnih flavonoida endotelu krvnih žila. Samo kod pojedinaca koji su imali niže razine 4-*O*-metil galne kiseline, predloženog biljega *O*-metilacije flavonoida, došlo je do poboljšanja endotelne funkcije nakon uzimanja čaja. Stoga varijabilnost u odgovoru epitelne funkcije na flavonoide čaja i prevenciji kardiovaskularnih bolesti može biti uzrokovana interindividualnim razlikama u *O*-metilaciji (Hodgson *i sur.*, 2006).

Metilacija također može utjecati na smanjenje toksičnosti flavonoida i općenito polifenola. Naime, većina polifenola sadrži kateholne grupe koje *in vivo* mogu biti oksidirane u toksične kinone. Slični kinoni nastali iz endogenih estrogena i kateholamina, dovode do nastajanja superoksidnih radikala kroz reakciju s nukleofilnim molekulama u stanicama. Reakcija metilacije kvercetina objašnjava izostanak karcinogenog djelovanja *in vivo* unatoč dobro definirane mutagenosti *in vitro* (Scalbert *i sur.*, 2002).

Analogno metabolizmu lijekova i drugih stranih spojeva, u početku se smatralo da je metabolizam polifenola posredovan oksidacijom enzimima citokroma P450 (CYP). Stoga su se mnoga istraživanja usredotočila na međureakciju polifenola i CYP enzima, posebice CYP1A1 CYP1A2 (Tsyrllov *i sur.* 1994; Lee *i sur.* 1998; Moon *i sur.* 2000). Iako se oksidacija odvija u manjoj mjeri u odnosu na reakcije konjugacije, ona može utjecati na biološku aktivnost flavonoida (Otake *i sur.*, 2002). Naime, i najmanje promjene u strukturi flavonoida mogu značajno utjecati na njihovo djelovanje u organizmu. Najčešće se smanjuje biološka aktivnost i ubrzava izlučivanje, ali postoje dokazi i o nastajanju biološki aktivnijih spojeva. Tako hidroksilacijom i demetilacijom, reakcijama kataliziranim CYP enzimima mogu nastati polihidroksilirani spojevi s jačim antioksidacijskim djelovanjem od ishodišnih molekula. Primjerice, hidroksilacijom kampferola i *O*-demetilacijom tamariksetina nastaje kvercetin, čiji je prsten B zahvaljujući kateholnoj 3',4' skupini pogodniji za delokalizaciju elektrona od monohidroksilnog ili metoksilnog prstena B.

Nakon metabolizma polifenola i njihove apsorpcije u tankom crijevu, metaboliti polifenola ulaze u sistemski optok krvi gdje se putem portalne vene transportiraju do jetre. Glavni metaboliti pronađeni u portalnoj veni jesu uglavnom glukuronidi i metilirani glukuronidi. Također je utvrđeno da ti polarni konjugati prolaze membranu hepatocita, te se dalje modificiraju i u drugim različitim tipovima stanica, a najčešća sudbina velikog dijela metabolita je izlučivanje putem bubrega.

### **2.2.1.3. Metabolizam polifenola u kolonu pod utjecajem crijevne mikroflore**

Nakon reakcija glukuronidacije, sulfatacije i metilacije, metaboliti polifenola imaju dvije vrste putova. Jedan put vodi metabolite polifenola u plazmu, koji se zatim izlučuju putem bubrega u urin, a drugi put vodi do transporta u debelo crijevo.

U debelo crijevo dopijeva velik broj unesenih polifenola, uključujući one koji se nisu apsorbirali u tankom crijevu (80-90%) i one polifenole koji su se apsorbirani i metabolizirani (u jetri ili tankom crijevu), te potom transportirani natrag u lumen debelog crijeva izravno pomoću membranskih prijenosnika ili putem žuči. Debelo crijevo sadrži bogatu mikrobiotu ( $10^{12}$  mikroorganizama/cm<sup>3</sup>) koja ima veliku katalitičku i hidrolitičku sposobnost, što dovodi do razgradnje polifenola i nastajanja velikog broja novih metabolita (druga faza metabolizma). Na taj način također nastaje enterohepatičko kruženje i produžuje se vrijeme zadržavanja polifenola u organizmu. Velika varijabilnost u opsegu metabolizma u kolonu odraz je inter- i intra- individualnih razlika u mikroflori na koju utječu dob, stres, bolesti i prehrana (Spencer, 2003; Aura, 2008; Cardona *i sur.*, 2013; Ozdal *i sur.*, 2016).

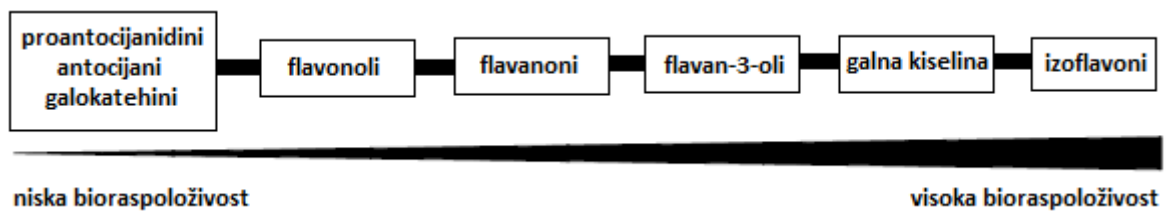
Enzimskom razgradnjom flavonoida u debelom crijevu nastaje veliki broj novih metabolita jer za razliku od enzima čovjeka, bakterijski enzimi mogu katalizirati mnoge reakcije uključujući hidrolizu, dehidroksilaciju, demetilaciju, cijepanje prstena i dekarboksilaciju, te brzu dekonjugaciju (Scheline, 1991). Za razliku od enzima čovjeka, enzimi crijevne mikroflore katalizira cijepanje flavonoidnog glavnog lanca na jednostavnije molekule kao što su fenolne kiseline. Količina apsorpcije flavonoidnih metabolita u crijevu još uvijek nije do kraja razjašnjena, pa je potrebno odrediti ulogu crijevne mikroflore na sveukupnu rasprostranjenost i moguću bioaktivnost flavonoida u hrani. Nadalje, sve je više radova koji ispituju promjene na crijevnoj mikroflori uzrokovane flavonoidima, a koji mogu imati utjecaj na sveukupno zdravlje organizma (Lamuela-Raventós *i sur.* 2005).

### **2.2.2. Bioraspoloživost i apsorpcija polifenola**

Bioraspoloživost se definira kao frakcija oralno primijenjene tvari koja se apsorbira i dostupna je za fiziološku aktivnost ili skladištenje (Bohn, 2014). Najzastupljeniji polifenoli u našoj prehrani ne moraju nužno biti oni s oni s najboljim bioraspoloživim profilom. Stoga, nije toliko bitno znati zastupljenost pojedinog spoja u određenoj hrani i dodacima prehrani već je bitnije znati kolika količina je bioraspoloživa. Premda određeni spoj ima jake

antioksidacijske ili druge biološke aktivnosti *in vitro*, ako spoj ne dođe do ciljnih tkiva njegova biološka aktivnost *in vivo* je vrlo mala (D'Archivio *i sur.*, 2010).

Razna istraživanja usmjerena su na određivanje koncentracije polifenola koji mogu biti apsorbirani u sistemsku cirkulaciju nakon unosa u organizam (Adam *i sur.*, 2002; Serra *i sur.*, 2010). Dosadašnja istraživanja opisuju relativno nisku bioraspoloživost zbog slabe apsorpcije u probavnom sustavu (Shivashankara i Acharya, 2010). Apsorpcija galne kiseline i izoflavona je najbolja, nakon čega slijedi apsorpcija katehina, flavan-3-ola i kvercetin glikozida. Proantocijanidi, galokatehini čaja i antocijana pokazuju najmanju apsorpciju (Slika 14) (Rothwell *i sur.*, 2013; Manach *i sur.*, 2005).

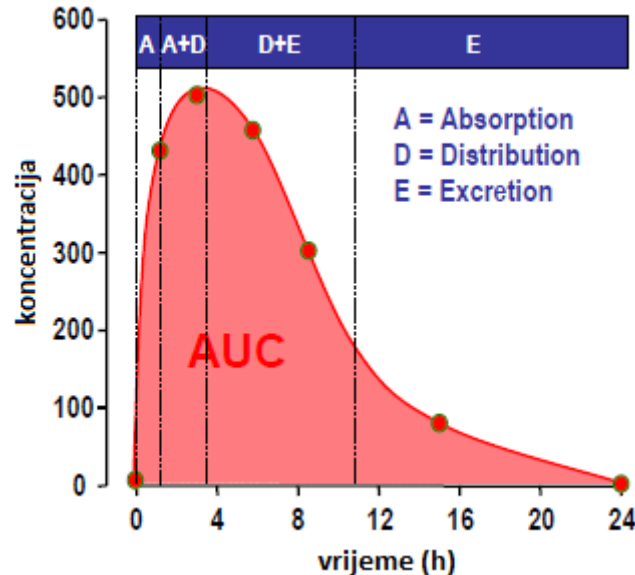


Slika 14. Kvalitativni pregled apsorpcije i bioraspoloživost polifenola (Manach *i sur.*, 2005; D' Archivo *i sur.*, 2007; Viskupičová *i sur.*, 2008)

S obzirom da polifenoli kao bioaktivne komponente iz biljnih izvora moraju imati određenu bioraspoloživost kako bi ispoljile bilo kakav učinak na organizam, potrebno je široko znanje o njihovoj farmakokinetici da bi se utvrdio stvaran utjecaj dnevnog unosa tih komponenata na zaštitu i poboljšanje zdravstvenog statusa.

### 2.2.3. Farmakokinetika

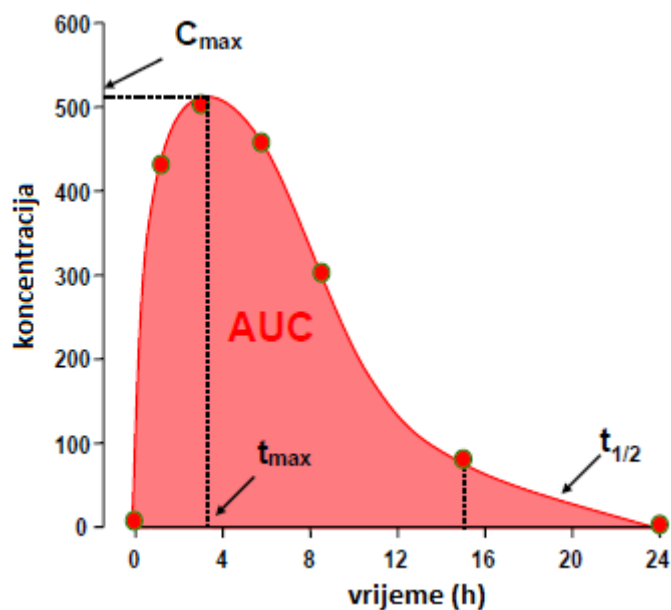
Farmakokinetika proučava apsorpciju bioaktivnog spoja u krv, njegovu raspodjelu po tjelesnim tekućinama i tkivima, metabolizam i njegovo izlučivanje kao i nastalih potencijalnih metabolita, što se zajedno opisuje skraćenicom ADME (engl. Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion). Metabolizam i ekskrecija čine zajedno eliminaciju (Slika 15).



Slika 15. Vremenska promjena koncentracije bioaktivnog spoja u plazmi nakon primjene

Farmakokinetička analiza temelji se na praćenju vremenske promjene koncentracije bioaktivnog spoja u krvnoj plazmi nakon njegove primjene u određenoj dozi na određen način. Iz  $c-t$  krivulje (Slika 16) određuju se farmakokinetički parametri na osnovi kojih se određuje učestalost davanja bioaktivne tvari, doza i vrijeme:

- Površina ispod krivulje AUC (engl. *Area Under Curve*) – kao opseg apsorpcije i sistemske raspoloživosti bioaktivnog spoja. Uzima se da je bioaktivna tvar koja se daje direktno u venu ujedno i 100 % raspoloživa.
- Bioraspoloživost – sistemski dostupan udio bioaktivne tvari koja se daje oralno u odnosu na direktnu vensku primjenu.
- $c_{\max}$  - najveća koncentracija bioaktivne tvari u plazmi nakon primjene.
- $t_{\max}$  – vrijeme postizanja  $c_{\max}$ .
- $k_e$  - konstanta brzine eliminacije bioaktivne tvari.
- $t_{1/2}$  - poluvijek eliminacije ( $t_{1/2} = \ln 2/k_e$ )



Slika 16. Vremenska promjena koncentracije bioaktivnog spoja u plazmi nakon primjene s farmakokinetičkim parametrima

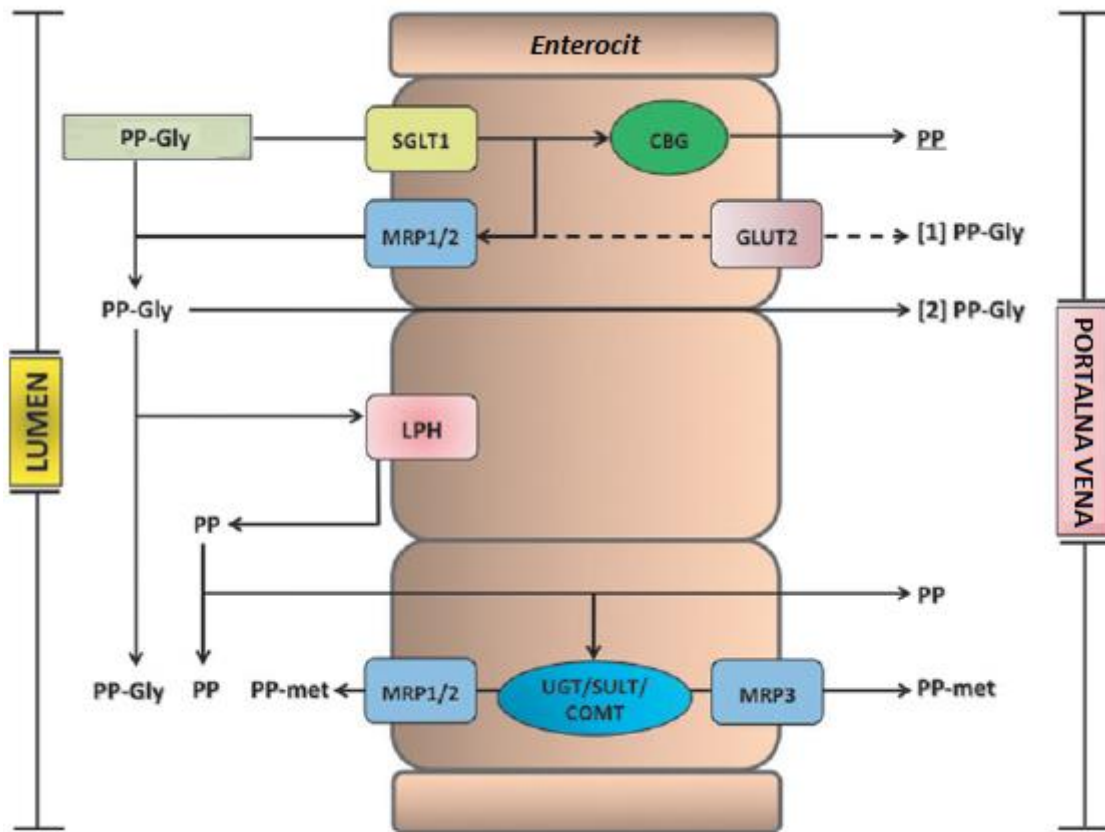
Nova istraživanja donose neke nove poglede na bioraspoloživost polifenola. Czank *i sur.* (2013) je proučavao bioraspoloživost <sup>13</sup>C<sub>5</sub> cianidin-3-glukozida, prikupljanjem uzoraka krvi, mokraće, daha i fecesa u ljudi. Rezultati su pokazali drugačiju bioraspoloživost antocijanina od prethodnih istraživanja (12,3±1,3%), te da su njegovi metaboliti prisutni u cirkulaciji za ≤48 h nakon unosa. Istraživanjima je utvrđeno da doza unosa polifenola ima važan utjecaj na bioraspoloživost. Naime, veće doze mogu imati različit učinak od niže unesenih doza polifenola. Dokazano je da klorogenska kiselina iz kave ima manju bioraspoloživost kad se konzumira u većim dozama (Stalmach *i sur.*, 2014). Nadalje, hranjive tvari poput bjelančevina, ugljikohidrata i lipida koji okružuju polifenole unutar probavnog sustava također imaju veliki utjecaj na bioraspoloživost polifenola.

Istraživanja bioraspoloživosti nisu jednostavna budući da brojni čimbenici utječu na apsorpciju i bioraspoloživost unesenih polifenola u tankom crijevu. Možemo ih podijeliti u dvije osnovne skupine: fitokemijski poput strukture molekula, lipofilnosti, pK<sub>a</sub> i topljivosti te biološki u koje ubrajamo pH lumena, permeabilnost membrane i učinak prvog prolaska kroz jetru (Spencer, 2003). Pri tom najveći utjecaj na intestinalnu apsorpciju pokazuju strukturalni parametri polifenolne komponente poput molekulske mase, glikozilacije i esterifikacije (Scalbert *i sur.*, 2002).

Molekulska masa važan je čimbenik koji utječe na apsorpciju, a time i bioraspoloživost određenih polifenola. Povećanjem molekulske mase smanjuje se mogućnost apsorpcije u tankom crijevu. Iz tog razloga visokomolekularni proantocijanidini (kondenzirani tanini, spojevi građeni od podjedinica flavan-3-ola) gotovo uopće nisu apsorbirani u tankom crijevu. Kao takvi, nepromijenjeni proantocijanidi ulaze u debelo crijevo gdje se metaboliziraju pod utjecajem crijevne mikroflore, a njihovi metaboliti se apsorbiraju u cirkulaciju i izlučuju putem urina (Williamson i Clifford, 2010). Prema tome, slaba apsorpcija proantocijanidina bi mogla biti značajna za postizanje lokalnog učinka na sluznicu crijeva ili pri djelovanju fenolnih kiselina koje nastaju razgradnjom enzimima crijevne mikroflore. Suprotno navedenom, Shoji *i sur.* (2006) utvrdili su postojanje oligomernih proantocijanidina jabuke i slobodnih procijanidina u krvnoj plazmi štakora mjenjenih 2 sata nakon unosa. Iako je apsorpcija proantocijanida bila sporija u odnosu na flavan-3-ole i druge polifenole, zaključili su da se oligomerni proantocijanidi apsorbiraju u tankom crijevu i nisu bili degradirani u spojeve niže molekulske mase (Shoji *i sur.*, 2006).

U hrani većina polifenola postoji u glikolizidnoj formi, povezani sa šećernom grupom. U ovakvoj prirodnoj formi oni se, u pravilu, ne mogu apsorbirati te moraju biti hidrolizirani putem intestinalnih enzima ili crijevne mikroflore. Antocijani predstavljaju iznimku jer se intaktni glikozidi mogu apsorbirati i detektirati u cirkulaciji (Velayutham *i sur.*, 2008; Bulotta *i sur.*, 2014). Apsorpcija polifenola može jako varirati između različitih skupina polifenola, kao i među različitim konjugatima istog spoja. Tako apsorpcija nekih flavonoidnih glikozida može biti brza, ali i vrlo spora što utječe na bioraspoloživost polifenola. Prema tome, stupanj glikolizacije i tip šećerne jedinice znatno utječe na apsorpciju pojedinih flavonoida u tankom crijevu, izuzev flavan-3-ola koji u hrani nisu prisutni u obliku glikozida (Morand *i sur.*, 2000; Karakaya, 2004; Crozier *i sur.*, 2010, Arrts *i sur.*, 2009). Tako je istraživanjem u štakora i svinja dokazano da se kvercetin-3-*O*- $\beta$ -glukozid bolje apsorbira od rutina (ramnoglukozida kvercetina) pa čak i od pripadajućeg aglikona (Hollman *i sur.*, 1999). Slaba apsorpcija ramnoglukozida kvercetina pripisana je mikrobnj deglikolizaciji i smanjenoj koncentraciji ramnozidaza u dvanaesniku (Morand *i sur.*, 2000; Cermak *i sur.*, 2003). Iako su polifenolni glukozidi općenito preniske lipofilnosti da bi mogli pasivno difundirati kroz biološke membrane poput aglikona, dva su mehanizma koja objašnjavaju bolju apsorpciju kvercetin-*O*-3- $\beta$ -glukozida u odnosu na aglikon kvercetin. U prvi je uključen membranski prijenosnik SGLT-1 (o natriju ovisan glukozni prijenosnik). Njime se glukozidi transportiraju u lumen enterocita gdje su potom supstrati za citosolnu -glukozidazu (CBG) široke specifičnosti. U

drugi mehanizam uključena je laktaza-florizin hidrolaza (LPH) smještena na membrani enterocita s aktivnim mjestom okrenutim prema lumenu crijeva. Svojom aktivnošću otpušta aglikone koji potom mogu pasivno difundirati preko membrane (Slika 17) (Scalbert *i sur.*, 2002; Németh *i sur.*, 2003).



Slika 17. Model apsorpcije polifenola. Kratice: PP-polifenol aglikon; PP-Gly, polifenol glikozid; PP-met, polifenol metabolit

Utjecaj šećerne komponente istraživana je i na primjeru cijanidina i peonidina čiji glukozidi pokazuju značajno veću učinkovitost transporta od galaktozida (Yi *i sur.*, 2006). Prijenosnik monokarboksilata (MCT) uključen je u apsorpciju epikatehin galata (ECG), flavonoidnog spoja iz podskupine flavan-3-ola koji u prirodi ne dolaze u obliku glikozida. Zahvaljujući tom prijenosniku nakupljanje katehina iz čaja u epitelnim stanicama probavnog sustava moglo bi biti odgovorno za njihov farmakološki učinak (Vaidyanathan i Walle, 2003). Isti prijenosnik ima ulogu u apsorpciji jednostavnih fenolnih kiselina, koje se uz to još transportiraju i paracelularnim putem.

Na smanjenu apsorpciju flavonoida, a time i smanjenu bioraspoloživost znatno utječu membranski proteini iz ABC porodice (engl. *ATP-binding cassette*) koji se nalaze na apikalnim i bazalnim membranama epitelnih stanica (Morris i Zhang, 2006). Najznačajniji



među njima jesu proteini višestruke otpornosti na lijekove; prvi otkriveni prijenosnik u eukariota bio je MDR1 (od engl. *Multidrug resistance protein 1*, ABCB1, P-gp) te potom otkrića drugih prijenosnika povezanih s višestrukom rezistencijom na lijekove, MRP1 (od engl. *Multidrug-resistance associated protein 1*, ABCC1), te BCRP (od engl. *Breast cancer resistance protein*, ABCG2) koji glikozide, ali i konjugate nastale u enterocitima transportiraju nazad u lumen crijeva (Vaidyanathan i Walle, 2003; Tian *i sur.*, 2006a). Intestinalnu apsorpciju također smanjuje esterifikacija. Katehini koji su esterificirani s galnom kiselinom, kafeinska kiselina s kina kiselinom (klorogenska kiselina) (Lafay *i sur.*, 2006) i ferulinska vezana za arabinoksilane iz stanične stijenke biljaka, pokazuju znatno manju bioraspoloživost od pripadajućih slobodnih oblika (Adam *i sur.*, 2002).

## **2.3. OKSIDACIJSKI STRES I ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE POLIFENOLA**

### **2.3.1. Slobodni radikali i oksidacijski stres**

Molekulski kisik je neophodan za život aerobnih organizama, a sastavni dio aerobnog metabolizma uključuje i stvaranje slobodnih radikala. Slobodni radikali su atomi ili molekule koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj elektronskoj ljusci. Ti nespareni elektroni su proton akceptori ili donori drugim molekulama. Upravo to je razlog koji ih čini vrlo nestabilnim i visoko reaktivnim, pri čemu reagiraju s anorganskim i organskim spojevima (Cheeseman i Slater, 1993). Slobodni radikali nastaju u redukcijsko-oksidacijskim reakcijama stanice, fiziološkim procesima poput oksidacijske fosforilacije u mitohondriju, apsorpcijom energije zračenja, oksidacije masnih kiselina u peroksisomima, fagocitoze i dr. (Lee i Wei, 2000). Isto tako mogu nastati kao posljedica ionizirajućeg zračenja, enzimatskih oksidacija i autooksidacijom kemjskih spojeva, u prvom redu tiola, oksihemoglobina i hidrokinona. Prilikom tih reakcija dolazi do redukcije molekulskog kisika, a kao produkt nastaju superoksidi uz prisutvo prijelaznih metala (Ashor *i sur.*, 2014). Slobodne radikale ne predstavljaju samo reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*, ROS), već i drugi oksidansi poput reaktivnih dušikovih radikala (engl. *reactive nitrogen species*, RNS), sulfatnih radikala i drugih (Tablica 4).

Tablica 4. Reaktivne vrste (ROS, RNS) koji doprinose nastanku oksidacijskog stresa\*

	Naziv tvari	Kemijska formula	Obilježje
Radikali	Superoksidni anion	$\cdot O_2^-$	Nestabilna vrsta, signalna uloga, sinaptička plastičnost, produkt mnogih antioksidacijskih reakcija
	Hidroksilni radikal	$HO\cdot$	Vrlo reaktivna i nestabilna vrsta, stvara se u Fentonovoj i Haber-Weissovnoj reakciji uz željezo kao katalizator
	Alkoksi radikal	$RO\cdot$	Organski (lipidni) radikal
	Peroksil radikal	$ROO\cdot$	Nastaje iz organskog hidroperoksida (ROOH), uklanjanjem vodika
	Dušikov oksidni radikal	$\cdot NO$	Okolišni toksin, endogena signalna molekula
	Radikal dušikova dioksida	$\cdot NO_2$	Vrlo reaktivna vrsta, okolišni toksin
Čestice koji nisu slobodni radikali	Vodikov peroksid	$H_2O_2$	Stanična toksičnost, signalna uloga, generacija drugih slobodnih radikala
	Hipokloritni anion	$OCl^-$	Reaktivna vrsta kisika i klor, enzimski generiran mijeloperoksidazom
	Singletni kisik	$^1O_2$	Prvi ekscitirani oblik ksika
	Ozon	$O_3$	Okolišni toksin
	Organski hidroperoksid	ROOH	Nestabilni, lako se raspadaju u radikale, pa služe kao katalizatori radikalske reakcije
	Peroksinitrit	$ONOO^-$	Vrlo reaktivna vrsta, okolišni toksin
	Dušikovi oksidi	$NO_x$	Okolišni toksin, uključuje derivate NO i $\cdot NO_2$ nastale u procesu sagorijevanja

\*preuzeto od Ashor *i sur.* (2014)

U svrhu obrane od oksidacijskih oštećenja organizam je tijekom evolucije razvio kompleksan antioksidacijski sustav koji pomaže u očuvanju homeostaze organizma (Beattie, 2006). U slučaju neravnoteže dolazi do oksidacijskog stresa (Lobo *i sur.*, 2010).

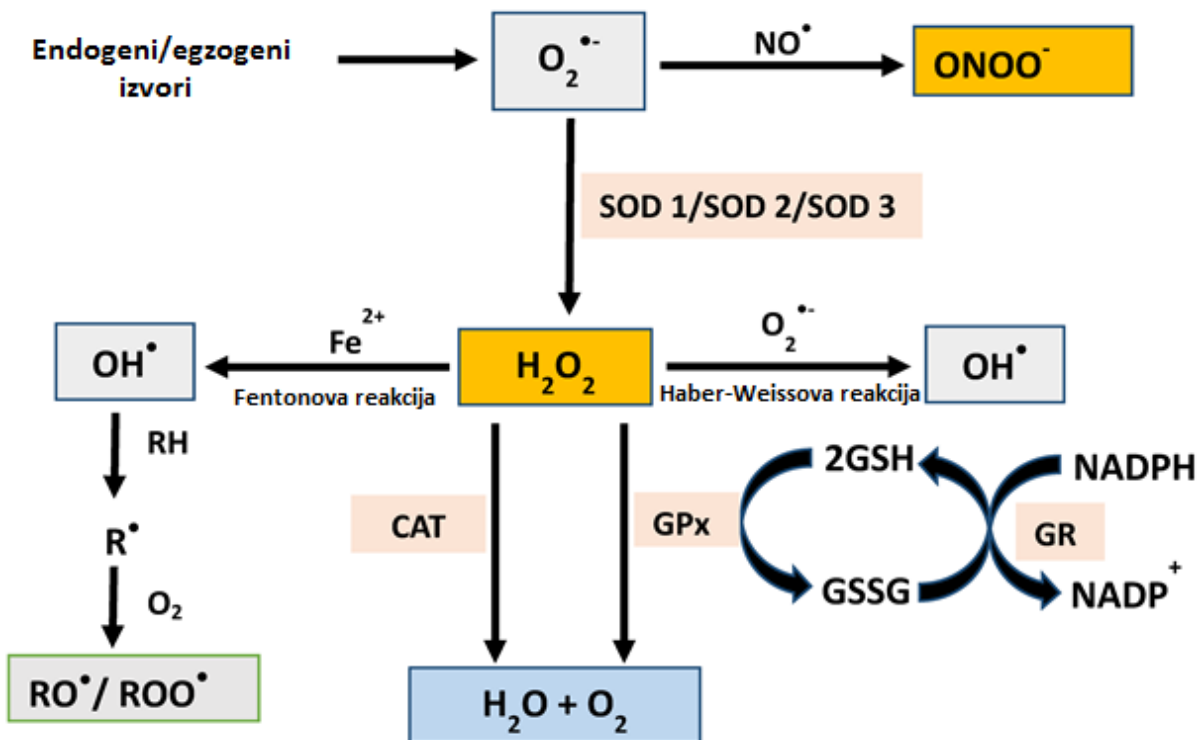
Oksidacijski stres je pojam koji se odnosi na neravnotežu između stvaranja oksidansa i antioksidacijskog obrambenog sustava organizma, što dovodi do potencijalnog oštećenja tkiva i organa (Sies, 1991; Betteridge, 2000). Oksidacijski stres je povezan s procesom starenja i različitim kroničnim oboljenjima kao što su ateroskleroza i dijabetes, dok je prehrana voćem i povrćem bogatim s antioksidansima kao što su polifenoli, vitamin C i karotenoidi povezana sa smanjenim rizikom pojave takvih kroničnih oboljenja (Maruyama i Iso, 2014). U najbitnije stanične izvore oksidacijskog stresa ubrajamo stvaranje ROS prilikom nepotpune redukcije kisika u respiratornom lancu mitohondrija kao i obrambeni sustav organizma koji uključuje oksidacijski prasak posredovan NADPH oksidazom pri čemu nastaju superoksidni radikali i mijeloperoksidaze što dovodi do stvaranja hipokloritne kiseline (Lovrić *i sur.*, 2008).

Reaktivne kisikove vrste doprinose održavanju homeostaze u organizmu sudjelujući u fiziološkim reakcijama i staničnim funkcijama, ali također mogu u određenim uvjetima dovesti do oštećenja stanica. U stanicama organizma, na molekularnoj razini, slobodni radikali djeluju različito pri različitim koncentracijama: pri niskim koncentracijama imaju pozitivan učinak jer sudjeluju u međustaničnom signaliziranju i obrani od patogena, dok visoke koncentracije mogu modificirati proteine, oštetiti DNA i stanične transkripcijske elemente, te inicirati lančanu reakciju koja uzrokuje lipidnu peroksidaciju (Saadatian-Elahi *i sur.*, 2009). U slučaju oštećenja proteina, nastaju oksidirani oblici proteina koji, iako se brzo uklanjaju kao funkcionalno inaktivni, mogu također postepeno akumulirati i pridonijeti oštećenjima povezanim s različitim bolestima (Kehrer i Lund, 1994). ROS također mogu oksidirati DNA baze. Oksidirani oblik DNA nastao na ovakav način, ima za posljedicu nastanak mutacija i razvoj kancerogeneze. Ovim promjenama naročito je podložna mitohondrijska DNA jer nije zaštićena histonima (što je slučaj s jezgri DNA), a nalazi se u okruženju koje se smatra glavnim izvorom kisikovih vrsta (Yu, 1994). Lipidna peroksidacija (LPO) nastaje reakcijom ROS-a s lipidima membrane, koje su sastavni dio staničnih membrana i kao takve imaju važnu strukturalnu i funkcionalnu ulogu u stanici. Peroksidacija lipida neizbježno mijenja i oštećuje lipidnu molekularnu strukturu. Osim toga, LPO je glavni izvor ostalih citotoksičnih produkata. Produkti LPO (malondialdehid i 4-hidroksinon-2-enal) su biološki aktivni i mogu djelovati na razne stanične komponente, uključujući membrane i enzime (Ayala *i sur.*, 2014).

### 2.3.2. Antioksidansi i antioksidacijsko djelovanje polifenola

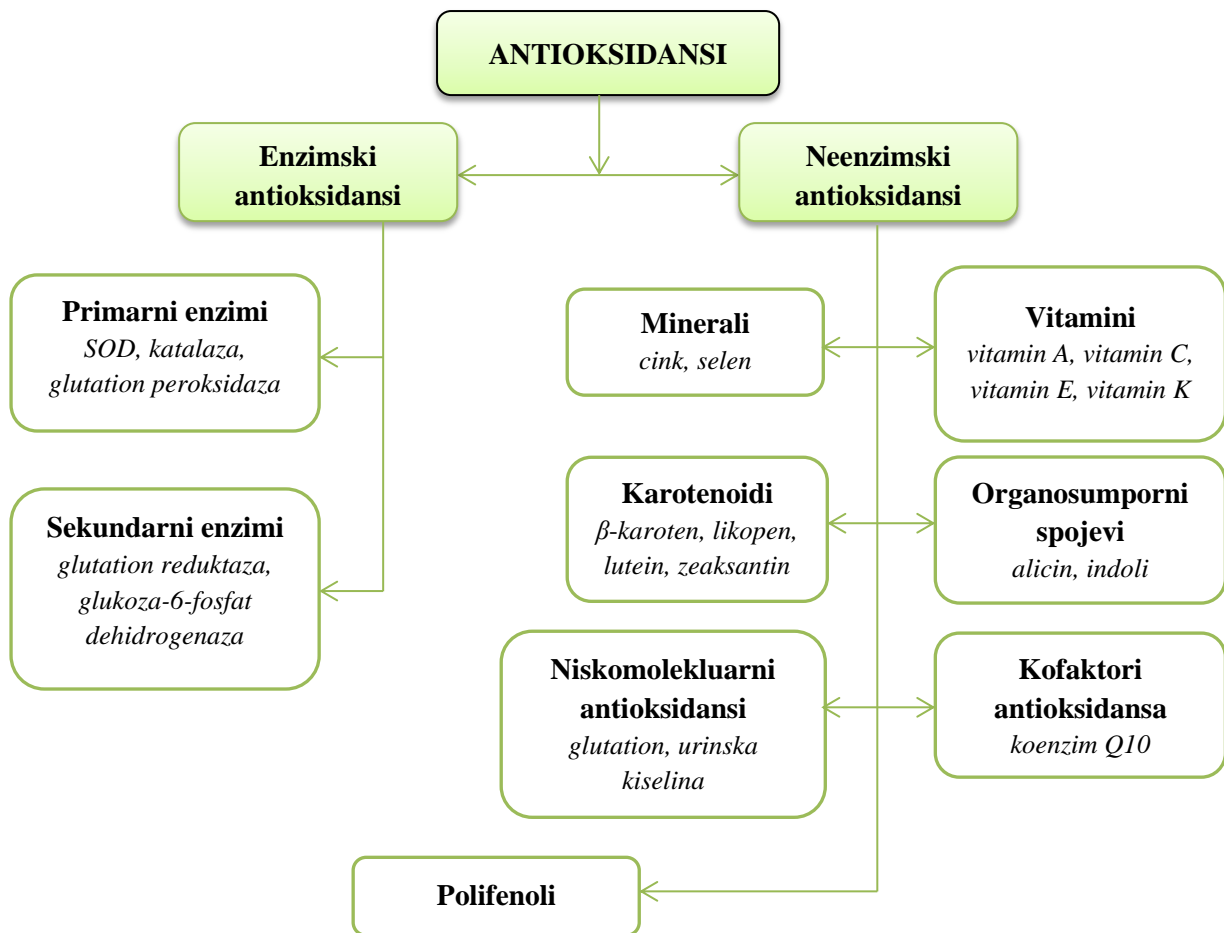
Antioksidansi su molekule koje inhibiraju oksidaciju drugih molekula time što se same oksidiraju u reakciji s visokoreaktivnom molekulom poput slobodnog radikala. Njihova fiziološka uloga očituje se u prevenciji oštećenja staničnih komponenti uslijed kemijskih reakcija slobodnih radikala. Glavni mehanizmi koje antioksidansi pokazuju uključuju redukciju metala poput željeza i bakra, vezanje slobodnih radikala doniranjem elektrona ili protona, kreiranje kompleksa s metalnim prooksidansima (keliranje metala), vezanje singletnog kisika te stimuliranje aktivnosti antioksidacijskih enzima. Prvi je mehanizam razbijanja lanca prema kojem primarni antioksidans donira elektron slobodnom radikalu prisutnom u sustavu. Drugi mehanizam uključuje uklanjanje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS) i reaktivnih dušikovih vrsta (RNS) uklanjajući katalizator koji započinje lančanu reakciju (Lobo *i sur.*, 2010; Sahari i Berenji, 2015).

Prema prirodi antioksidansi se mogu podijeliti u dvije velike kategorije, enzimske i neenzimske antioksidanse. Neki od njih proizvode se endogenim putem (enzimi, niskomolekularni antioksidansi i enzimski kofaktori), dok se neenzimski antioksidansi uglavnom unose putem prehrane (Bunaciu *i sur.*, 2015). Enzimski antioksidacijski sustav obrane uključuje antioksidacijske enzime poput superoksid-dismutaze, glutation-reduktaze, katalaze i ostale enzime koji imaju ključnu ulogu u detoksifikaciji radikala u nereaktivne molekule (Van der Oost *i sur.*, 2003; Lotito *i sur.*, 2011; Birben *i sur.*, 2012) (Slika 18). U fiziološkim uvjetima ovi enzimi zadržavaju nisku koncentraciju radikala u stanici i njihova aktivnost regulirana je preciznim mehanizmima na molekularnoj razini. Svi ovi enzimi su bitni za održanje homeostaze između oksidacijskog i antioksidacijskog kapaciteta kao i za preživljavanje svih aerobnih organizama.



Slika 18. Izvori i generacija različitih reaktivnih kisikovih vrsta. Kratice: CAT, katalaza; GPx, glutation peroksidaza; GR, glutation-reduktaza; SOD, superoksid dismutaza; RH, lipidna membrana; R., alkilni radikal (Ajuwon *i sur.*, 2017).

Neenzimski antioksidansi obuhvaćaju prirodne endogene produkte stanice, hranjive egzogene tvari i sintetičke produkte. Neenzimski antioksidansi uključuju polifenole, vitamine, karotenoide, organosulfatne spojeve, minerale, glutation, albumin, metalotionein, transferin, urate, bilirubin, ceruloplazmin, koji, obzirom na različitu strukturu i afinitet, ostvaruju i različite mehanizme djelovanja antioksidacijske zaštite (Bunaciu *i sur.*, 2015) (Slika 19).



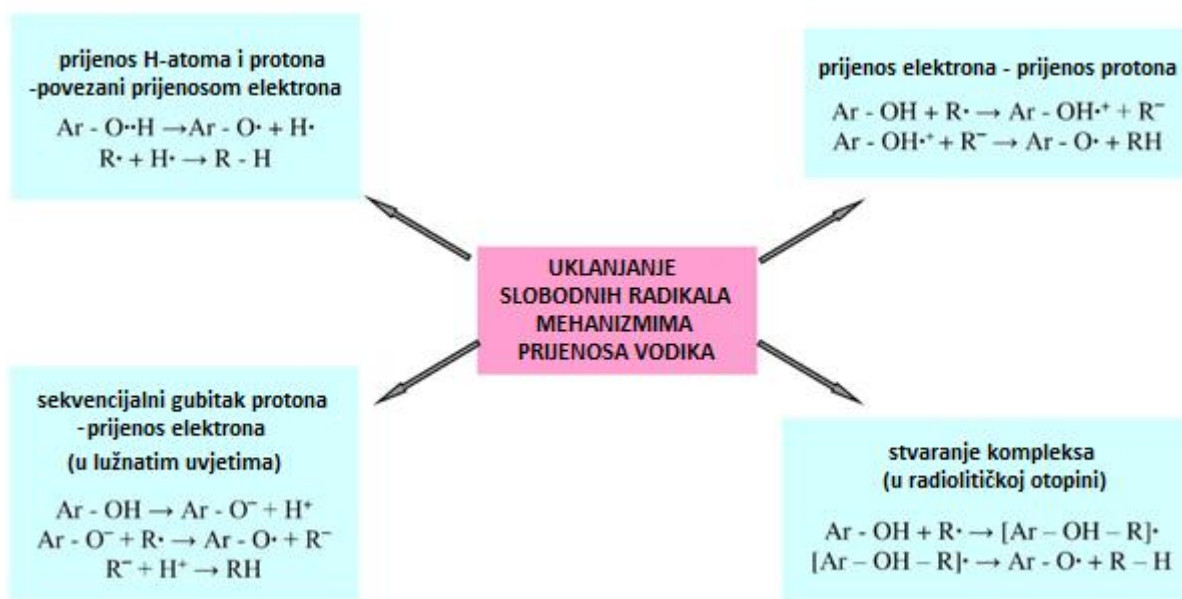
Slika 19. Podjela antioksidansa (Bunaciu *i sur.*, 2015)

Polifenoli mogu djelovati kao antioksidansi na nekoliko načina. Najučinkovitiji su kada neutraliziraju slobodne radikale i tako prekidaju lančanu reakciju slobodnog radikala. Polifenol kao antioksidans mora zadovoljiti dva uvjeta:

- i) kada je prisutan u maloj koncentraciji u odnosu na tvar podložnu oksidaciji, mora bitno usporiti ili spriječiti reakciju oksidacije,
- ii) iz njega nastali radikal mora biti stabilan da ne bi poticao lančanu reakciju (Halliwell *i sur.*, 1995).

Radikali se obično stabiliziraju premještanjem elektrona, stvaranjem intramolekularnih vodikovih veza ili daljnjom reakcijom s drugim lipidnim radikalom (Shahidi i Wanasundara, 1992).

Antioksidacijsko djelovanje polifenola u neutraliziranju slobodnih radikala obuhvaća prijenos vodikovog atoma iz aktivne hidroksilne skupine polifenolnog spoja na slobodni radikal ( $\text{Ar-OH} + \text{R}\cdot \rightarrow \text{Ar-O}\cdot + \text{RH}$ ) (Di Meo *i sur.*, 2013). Za prikazanu reakciju, Di Meo *i sur.* (2013) predložili su četiri mehanizma koji su prikazani na Slici 20.



Slika 20. Polifenolna aktivnost uklanjanja slobodnih radikala mehanizmima prijenosa vodika. Kratice: R·, slobodni radikal; Ar-OH, fenolni spoj. (Di Meo *i sur.*, 2013).

Antioksidacijski potencijal polifenola ovisi o kemijskoj strukturi molekule, odnosno o fenolnoj strukturi od koje potječu antioksidacijske sposobnosti. Glavne strukturne značajke polifenola važne za sposobnost neutraliziranja slobodnih radikala jesu: hidroksilne skupine, *O*-metilacija, 2-3 dvostruka veza u konjugaciji s 4-keto skupinom, glikozidacija, te stupanj polimerizacije (Yang *i sur.*, 2012).

### ***Hidroksilne grupe***

Pretpostavlja se da antioksidacijsku aktivnost flavonoida uglavnom određuje raspored supstituenata. Antioksidacijska aktivnost većine polifenolnih antioksidansa ovisi o rasporedu i ukupnom broju hidroksilnih skupina (Cao *i sur.*, 1997; Burda i Oleszek, 2001; Chen *i sur.*, 2002; Leopoldini *i sur.*, 2011). Na sposobnost flavonoida pri neutraliziranju reaktivnih vrsta kisika najviše utječu hidroksilne grupe na B prstenu. Doniranjem vodikova atoma i elektrona hidroksilnim i peroksidnim radikalima dolazi do njihove stabilizacije, a ujedno nastaje i relativno stabilni flavonoidni radikal. Između strukturnih homologa flavona i flavonona, neutraliziranje peroksil i hidroksil radikala, povećava se s ukupnim brojem OH- grupa (Cao *i sur.*, 1997).

3'4'-katehol struktura B prstena pojačava inhibiciju oksidacije lipida. Takva struktura je najznačajnija odlika polifenola u neutraliziranju peroksil (Cao *i sur.*, 1997; Dugas *i sur.*,

2000), superoksid i peroksinitril radikala (Haenen *i sur.*, 1997). Na primjer, iako i luteolin i kempferol imaju jednaku hidroksilnu konfiguraciju, luteolin ima jaču sposobnost vezanja peroksil radikala od kempferola zbog toga što kempferol nema B prsten katehola (Van Acker *i sur.*, 1996). Neutraliziranje peroksinitril radikala pomoću katehina također se pripisuje B prstenu katehola (Kerry i Rice-Evans, 1999). Oksidacija flavonoida se odvija na B prstenu katehola te nastaje stabilan o-semikinon radikal. Flavoni kojima nedostaje kateholna ili o-trihidroksil struktura tvore vrlo nestabilne radikale i slabi su neutraliziranju slobodnih radikala.

Važnost drugih hidroksilnih grupa je manje razjašnjena, ali osim što povećava ukupni broj OH- grupa, A prsten vrlo malo doprinosi antioksidacijskoj aktivnosti. Heterociklički dio flavonoida doprinosi antioksidacijskoj aktivnosti tako što osigurava prisutnost slobodnih OH- grupa i omogućava konjugaciju između aromatskih prstenova. S obzirom da su halkoni aktivni antioksidansi, zatvoreni C prsten nije neophodan za aktivnost flavonoida (Matthiesen *i sur.*, 1997). Neutraliziranje slobodnih radikala pomoću flavonoida jako ovisi i o slobodnoj 3-OH- grupi (Burda i Oleszek, 2001), tako da je utvrđeno da flavonoidi koji imaju slobodnu 3-OH- grupu i 3',4'-katehol strukturu posjeduju 10 puta jaču sposobnost neutraliziranja slobodnih radikala. Superiornost kvercetina u inhibiciji oksidativnih oštećenja, bez obzira jesu li ona uzrokovana djelovanjem metala ili ne, pripisuje se slobodnoj 3-OH- grupi koja ujedno i povećava stabilnost radikala flavonoida. Zakretni kut B prstena s obzirom na ostatak molekule flavonoida, također snažno utječe na antioksidacijsku aktivnost. Flavonoli i flavan-3-oli posjeduju slobodnu 3-OH- grupu i planarne su strukture za razliku od flavona i flavanona. Planarnost molekule omogućuje konjugaciju, premještanje elektrona i povećanje stabilnosti flavonoid fenoksil radikala (Van Acker *i sur.*, 1996; Heim *i sur.*, 2002).

### ***O-metilacija***

Razlika u antioksidacijskoj aktivnosti između polihidroksiliranih i polimetoksiliranih flavonoida uglavnom je zbog razlike u hidrofobnosti i molekularnoj planarnosti. Kvercetin snažno neutralizira peroksidne radikale, a zatim slijede njegovi *O*-metilirani i *O*-glikozidirani derivati (Dugas *i sur.*, 2000). Smanjenje antioksidacijske aktivnosti *O*-metiliranjem (Arora *i sur.*, 1998; Dugas *i sur.*, 2000; Burda i Oleszek, 2001) može se objasniti efektom narušavanja planarnosti. Iako se odnosom metoksilnih i hidroksilnih supstituenata ne može predvidjeti flavonoidna sposobnost neutraliziranja radikala, prsten B je djelomično osjetljiv na položaje metoksilnih grupa. Prostorne smetnje kateholne strukture s 4'-*O*-metiliranjem značajno



smanjuju antioksidacijsku sposobnost (Dugas *i sur.*, 2000). Općenito, utjecaj *O*-metiliranja ovisi o metodi određivanja antioksidacijske aktivnosti, tipu radikala koji se koristi i slučaju kada tvar koja se oksidira ima strukturu lipida jer tada lipofilnost pridonosi ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti (Heim *i sur.*, 2002).

### ***2,3-dvostruka veza i 4-keto-skupina***

Utvrđeno je da postojanje 2,3-dvostruke veze zajedno s 4-keto-skupinom povećava sposobnost vezanja slobodnih radikala. Konjugacija dvostrukih veza između prstena A i B omogućuje rezonancijsku stabilizaciju preko većeg broja aromatskih jezgara, što povećava stabilnost flavonoidnih radikala. Pretpostavka da su flavan-3-oli jači u neutraliziranju slobodnih radikala nego flavoni (Van Acker *i sur.*, 1996; Rice-Evans *i sur.*, 1996) može se pripisati većem broju hidroksilnih skupina i hidroksilnoj skupini u položaju 3-. Premda se u obzir moraju uzeti i drugi strukturni elementi, sposobnost neutraliziranja slobodnih radikala flavonoidima je povećana kada su prisutna oba elementa (Leopoldini *i sur.*, 2004).

### ***Glikozilacija***

Aglikoni su potencijalno jači antioksidansi od odgovarajućih glikozida (Yu *i sur.*, 2012; Ratty i Das, 1988; Gao *i sur.*, 1999). Dokazano je da se antioksidacijska aktivnost glikozida flavonola iz čaja smanjuje kako se broj glikozidnih jedinica povećava (Plumb *i sur.*, 1999). Osim same prisutnosti i ukupnog broja glikozidnih skupina važnu ulogu ima i položaj u kojem se nalazi pojedina skupina, kao i struktura šećera. Uobičajeno je da su glikozidne jedinice vezane na 3- ili 7- poziciji, ali vezivanje šećera na A prsten rezultira većim smanjenjem aktivnosti nego 3-glikozilacija. Glikozilacija, kao i *O*-metilacija, narušava planarnost B prstena u odnosu na ostatak molekule flavonoida i smanjuje sposobnost premještanja elektrona (Bors *i sur.*, 1990; Van Acker *i sur.*, 1996). Iako su glikozidi slabiji antioksidansi od aglikona (Kroon i Williamson, 1999; Burda i Oleszek, 2001) bioraspoloživost se ponekad pojačava prisustvom glukoze (Hollman *i sur.*, 1999). Osim što šećer zauzima slobodnu hidroksilnu skupinu neophodnu za vezanje radikala, šećer smanjuje planarnost B prstena i/ili mijenja hidrofilitnost molekule što rezultira promjenom dostupnosti za radikale lipida.

### ***Stupanj polimerizacije***

Antioksidacijska aktivnost polimernih flavonoida nije do kraja objašnjena. Procijanidni dimeri i trimeri su učinkovitiji nego monomeri kada su u pitanju superoksid anioni (Vennat *i*

*sur.*, 1994). Tetrameri su učinkovitiji nego trimeri kada su u pitanju peroksinitril i superoksid radikali, dok heptameri i heksameri su znatno učinkovitiji od trimera i tetramera (Vennat *i sur.*, 1994; Arteel i Sies, 1991). Čini se da osim do određenog stupnja polimerizacije dolazi i do povećanja učinkovitosti tj. antioksidacijske aktivnosti.

## **2.4. FIZIOLOŠKI UČINCI POLIFENOLA**

### **2.4.1. Sinergizam djelovanja polifenola**

Utvrđeno je da polifenoli mogu iskazivati različita sinergijska djelovanja što doprinosi njihovim terapijskim ciljevima. Sinergija je pojam koji opisuje uzajamno komplementarno djelovanje dviju komponenti, čiji je zajednički učinak veći od zbroja učinaka pojedinih komponenti. Tako se sinergijski učinak antioksidacijskog djelovanja fizioloških antioksidanata poput vitamina C i E vidi iz primjera povećanja antiproliferativnog učinka kvercetina u interakciji s askorbinskom kiselinom. Taj povećani učinak povezan je s mogućnošću askorbinske kiseline da zaštiti polifenol od oksidacijske degeneracije (Kandaswami *i sur.*, 1993). Sinergijski učinak primijećen je i kod unosa kvercetina i katehina u smanjivanju daljnjeg zgrušavanja krvi, što ukazuje na to da su polifenoli učinkovitiji u kombinaciji (Shivashankara i Acharya, 2010).

Istraživanja dokazuju da je inhibicija stvaranja i rasta tumora učinkovitija primjenom kombinacije različitih polifenola čak i pri znatno nižim koncentracijama u odnosu na tretman jednim polifenolom spojem (Lila, 2004; De Kok *i sur.*, 2008; Fantini *i sur.*, 2015; Lewandowska *i sur.*, 2014). Sinergijsko djelovanje polifenolnih pripravaka dodatno dovodi do istodobnog utjecaja na različite putove bolesti, što doprinosi bržem i učinkovitijem liječenju (De Kok *i sur.*, 2008). Pojedini biljni ekstrakti, korišteni kao mješavina raznih vrsta fenolnih i nefenolnih spojeva posjeduju značajna antitumorska svojstva, međutim ta svojstva se ne mogu strogo pripisati određenom spoju, nego to svojstvo predstavlja njihovo sinergijsko djelovanje (De Kok *i sur.*, 2008; Lewandowska *i sur.*, 2014). Nadalje, brojna istraživanja naglašavaju da je upravo interakcija samih polifenola presudna za blagotvorne učinke polifenola u smanjenju rizika od raznih degenerativnih bolesti (Fantini *i sur.*, 2015; Lewandowska *i sur.*, 2014).

### **2.4.2. Prooksidacijsko djelovanje polifenola**

Neki polifenolni spojevi, osim vrlo korisne antioksidacijske aktivnosti, mogu pod određenim uvjetima pokazivati i negativno prooksidacijsko djelovanje (Azam *i sur.*, 2004; Bouayed i

Bohn, 2010; Dai i Mumper, 2010). Naime, umjesto da antioksidans završi lančanu reakciju slobodnog radikala na način da reagira s idućim slobodnim radikalom, fenoksi radikal može reagirati s kisikom i stvoriti štetne spojeve poput semikinona i kinona (P=O), superoksidnog anion ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) i vodikovog peroksida ( $\text{PO}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{P=O} + \cdot\text{O}_2^-$ ) (Cotelle, 2001; Rasmussen *i sur.*, 2005; Halliwell, 2008; Dai i Mumper, 2010). Ion prijelaznog metala poput dvovalentnog iona bakra također može inducirati prooksidacijsko djelovanje fenolnog spoja koje je proporcionalno ukupnom broju hidroksilnih skupina. Glikozidacija i metiliranje hidroksilnih skupina smanjuju prooksidacijsko svojstvo fenolnog spoja (Cao *i sur.*, 1997). Prooksidacijsko djelovanje polifenolnih spojeva uglavnom se očituje u određenim uvjetima, koji omogućuju njihovu autooksidaciju, primjerice visoka koncentracija antioksidansa, visoki pH s visokom koncentracijom redoks-aktivnih prijelaznih metala i prisutnom molekulom kisika (Halliwell, 2008).

## **2.5. MEĐUREAKCIJE POLIFENOLA I MAKRONUTRIJENATA**

Sve veći broj istraživanja opisuje međureakcije između polifenola i molekula iz hrane (lipidi, proteini, ugljikohidrati), te da te međureakcije mogu imati značajan utjecaj na bioraspoloživost i biološku ulogu polifenola u organizmu.

### **2.5.1. Međureakcije polifenola i proteina**

Postoje brojna istraživanja koja opisuju međureakcije polifenola i proteina. Mnoga fiziološka i tehnološka *in vitro* istraživanja dokazala su da se proteini mogu vezati na polifenole (Arts *i sur.*, 2002; Rawel *i sur.*, 2006; Arts *i sur.*, 2009; Frazier *i sur.*, 2010; Shpigelman *i sur.*, 2010; Yuksel *i sur.*, 2010; Hasni *i sur.*, 2011; Kanakis *i sur.*, 2011; Von Staszewski *i sur.*, 2012; Nagy *i sur.*, 2012; Stojadinovic *i sur.*, 2013), te da su te međureakcije uglavnom hidrofobne nekovalentne međureakcije stabilizirane vodikovim vezama (Yuksel *i sur.*, 2010). Nekovalentne međureakcije uključuju hidrofobne međureakcije, Van der Waalsove sile, vodikove veze i ionske međureakcije. Nekovalentne međureakcije slabije su od kovalentne veze i uvijek su reverzibilne (Nagy *i sur.*, 2012). Jedan od najčešće istraživanih sustava međureakcije polifenola i proteina je sustav čaja i mlijeka. Čaj kao jedno od najpopularnijih pića na svijetu, često se pije s mlijekom. Glavni protein koji se nalazi u mlijeku je kazein. *In vitro* istraživanjem utvrđeno je hidrofobno vezanje polifenola iz zelenog čaja na mliječni protein kazein (Yuksel *i sur.*, 2010). Drugim *in vitro* istraživanjem utvrđeno je da je interakcija između polifenola iz zelenog čaja s  $\alpha$ - i  $\beta$ -kazeinom hidrofилна i hidrofobna s time

da hidrofobna interakcija prevladava (Hasni *i sur.*, 2011). Također je dokazano da nekoliko aminokiselinskih ostataka sudjeluje u nastanku interakcija polifenola i proteina (Hasni *i sur.*, 2011).

Pojedina istraživanja proučavala su utjecaj međureakcije polifenola i proteina na bioraspoloživost polifenola. Ranija istraživanja opisala su minimalne učinke. Schramm *i sur.* (2003) proučavali su utjecaj međureakcije proteina i polifenola (katehina iz kaka) u ljudi. Utvrdili su da međureakcije proteina i polifenola pokazuju minimalne učinak na apsorpciju polifenola. U istraživanju koje su proveli *in vivo*, na ljudskim dobrovoljcima, Van het Hof *i sur.* (1998) utvrdili su da dodatak mlijeka u zeleni i crni čaj ne utječe na bioraspoloživost katehina. Osim navedenog, Serafini *i sur.* (1996) utvrdili su da čaj koji se konzumira bez mlijeka pokazuje smanjeni antioksidacijski potencijal u odnosu na čaj s mlijekom. Također je dokazano da vezanje polifenola na proteine ovisi o broju hidroksilnih skupina polifenola. Tako se tanini koji sadrže preko 12 hidroksilnih grupa vrlo snažno vežu za proteine tvoreći kompleks s proteinima prisutnim u slini što rezultira njihovom smanjenom apsorpcijom te bioraspoloživosti (Hasni *i sur.*, 2011; Kanakis *i sur.*, 2011).

Novija istraživanja opisuju pozitivne ili negativne učinke. Duarte i Farah (2011) smatraju da interakcijom mliječnih sastojaka i polifenola iz kave u ljudi može dovesti do negativnih učinaka na bioraspoloživost. Ribnicky *i sur.* (2014) su proučavali bioraspoloživost polifenola iz biljke estragona (*Artemisia dracuncululus* L.) u miševa, u obliku čistog ekstrakta i u kombinaciji sa sojinim proteinima. Rezultat je bio da je apsorpcija i biodostupnost polifenola bila bolja s izolatom soje. Nadalje, Mullen *i sur.* (2009) utvrdili su da mlijeko znatno smanjuje izlučivanje metabolita flavan-3-ola putem mokraće. Slično tome, dokazano je i da jogurt ima značajan utjecaj na izlučivanje fenolnih kiselina putem mokraće. Ukupno izlučivanje fenolnih kiselina mjerenih unutar 24 sata iznosilo je 62  $\mu\text{mol}$  nakon konzumacije čistog soka od naranče, dok je ukupno izlučivanje fenolnih kiselina nakon konzumacije soka od naranče u kombinaciji s jogurtom značajno pala na 9,3  $\mu\text{mol}$  (Roowi *i sur.*, 2009).

### **2.5.2. Međureakcije polifenola i lipida**

Polifenoli mogu biti u interakciji s lipidima iz hrane. Pojedina istraživanja pokazala su moguću ulogu tih interakcija u procesu apsorpcije masti (Shishikura *i sur.*, 2006; Uchiyama *i sur.*, 2011), koje bi mogle imati pozitivne učinke na zdravlje.

Proces probave lipida iz hrane započinje žvakanjem hrane u ustima, gdje se lipidi emulgiraju u manje kapljice nakon čega putuju do želudca i dvanaesnika. Unutar probavnoga sustava,

emulgirane masti izložene su površinski aktivnim komponentama (micele) radi veće učinkovitosti probave. Nakon toga, enzim lipaza obavlja proces lipolize, razlaganja lipida na alkohol glicerol i više masne kiseline koji tada mogu difundirati kroz probavni epitel (Shishikura *i sur.*, 2006). Formiranje emulzije i površinski aktivnih tvari važno je za aktivnost lipaze (Shishikura *i sur.*, 2006). Prema tome, bilo koja molekula koja bi mogla djelovati na svojstvo emulzije ili aktivnost lipaze, potencijalno može utjecati na proces apsorpcije masti. Naime, molekule koje okružuju emulzije mogu se naći unutar kapljice ulja, u vodenoj fazi koja okružuje kapljicu ulja ili u površinskoj regiji. Takav raspored odjeljivanja uglavnom određuje polarnost molekula. Nepolarne molekule mogu se naći unutar lipidne faze, polarne molekule unutar vodene faze, a amfipatske molekule na granici tih dviju faza. Iz toga položaja, molekule mogu promijeniti površinu ili veličinu kapljice ulja koja je važna za aktivnosti lipaze. Gledajući s toga stajališta, takve vrste molekula mogu utjecati na smanjenje aktivnosti lipaze, a time i na smanjenje apsorpcije masti, što na kraju može dovesti do blagotvornih učinaka na pretilost.

Shishikura *i sur.* (2006) istraživali su utjecaj polifenola na proces emulgiranja na *in vitro* modelu. Model emulzije koji stimulira uvjete crijeva, načinjen je od maslinova ulja, fosfatidilkolina i žučnih soli (Shishikura *i sur.*, 2006). Utvrđeno je da polifenoli zelenoga i crnoga čaja u dodiru s emulzijom povećavaju i smanjuju specifičnu površinu kapljica. Kao razlog tomu navodi se interakcija polifenola i fosfatidilkolina (Shishikura *i sur.*, 2006). Fosfatidilkolin posjeduje hidrofilnu glavu na vanjskoj površini kapljice emulzije, a s obzirom na to da polifenoli imaju mnogobrojne hidroksilne skupine, na taj način dolazi do međumolekulskih interakcija i stvaranja kompleksa ostvarenih vodikovim vezama. Osim toga, polifenoli mogu djelovati kao vezna mjesta između kompleksa u obliku agregata, čime se povećava površina kapljica. Još jedan razlog za povećanje veličine kapljica može biti i ugradnja polifenola čaja unutar lipidnoga sloja koji može dovesti do promjene fizikalno-kemijskih svojstava emulzije (povećanje veličine kapljica i smanjenje površine). Utvrđeno je da uvjeti koji dovode do povećane veličine kapljica mogu uzrokovati smanjenje aktivnosti lipaze i apsorpciju masnoće. Druga istraživanja također podržavaju inhibiciju procesa apsorpcije masti i aktivnosti lipaze. Uchiyama *i sur.* (2011) proučavali su utjecaj polifenola crnoga čaja na dijetom inducirane pretilosti u štakora. Pokazali su da polifenoli crnoga čaja inhibiraju aktivnost lipaze i time inhibiraju crijevnu apsorpciju lipida. Nadalje, pokazali su da polifenoli crnoga čaja potiskuju povećanu razinu triglicerida u plazmi štakora. Sugiyama *i sur.* (2007) proučavali su učinke polifenola i procijanida jabuka na aktivnost lipaze (*in vitro*) i

apsorpciju triglicerida (na miševima i ljudima). Prema njihovim rezultatima, polifenoli i procijanidi jabuka također inhibiraju aktivnost lipaze i apsorpciju triglicerida.

Istraživanja pokazuju da interakcija lipida i polifenola ima samo mali utjecaj na pristupačnost apsorpcije polifenola. Schramm *i sur.* (2003) proučavali su učinak obroka bogatoga lipidima, bjelančevinama i ugljikohidratima na apsorpciju flavan-3-ola iz kakaa u ljudi. Otkrili su da lipidi iz mlijeka i maslaca imaju minimalne učinke na apsorpciju flavan-3-ola. Paralelno, *in vivo* istraživanje na modelu svinja otkrilo je da su veće razine sadržaja dijetetske masti povećale apsorpciju flavonoida, što je pripisano povećanom lučenju žučnih soli koje tvore micelarne strukture tijekom primjene visoko masne prehrane (Lesser *i sur.*, 2004). To *in vivo* istraživanje potvrđuje važnost micelarne ugradnje flavonoida na apsorpciju u tankome crijevu. Povećana apsorpcija flavonoida nakon unosa masti također podrazumijeva da je interakcija flavonoida s pankreasnim lipazama doista minimalna.

Druga istraživanja pokazuju da polifenoli mogu pokazati neke potencijalne bioaktivnosti u probavnom sustavu, odnosno da mogu stvoriti pozitivan antioksidacijski okoliš ili reagirati sa štetnim produktima lipidne peroksidacije. Naime, lipidi u želudcu mogu biti podložni djelovanju oksidacijskih reakcija koje dovode do povećanja lipidne peroksidacije. To je posebno važno za mesno brašno zato što meso sadrži različite polinezasićene masne kiseline, kolesterol i druge spojeve osjetljive na lipidnu peroksidaciju. Produkti lipidne peroksidacije mogu se apsorbirati, a ujedno i time uzrokovati različite neželjene učinke (Gorelik *i sur.* 2013). Polifenoli dospjeli u probavni sustav mogu potencijalno reagirati sa štetnim produktima lipidne peroksidacije i smanjiti njihov utjecaj. Gorelik *i sur.* (2013) proučavali su dodatak crvenoga vina u jelo pripremljeno od mesa, te njegov učinak na štetan produkt lipidne peroksidacije (malondialdehid) koji nastaje nakon probave mesnoga obroka, u štakora. Dodavanje crnoga vina može potpuno zaštititi lipoproteine niske gustoće (LDL) modificirajući produkte lipidne peroksidacije. Zaštita LDL-a pripisuje se antioksidacijskom mehanizmu polifenola. Drugi je predloženi mehanizam mehanizam međureakcije polifenola i produkata lipidne peroksidacije. Druga istraživanja dokazala su proces inhibicije oksidacije lipida od djelovanja polifenola (kvercetina, rutina, (+)-katehina, kafeinske i klorogenske kiseline) (Lorrain *i sur.* 2010, 2012). Santos *i sur.* (2013) predložili su da međureakcije između lipida i polifenola mogu biti korisne za formiranje nanonosača polifenola kroz probavni sustav. Barras *i sur.* (2009) proučavali su opterećenje lipidnih nanokapsula polifenolima. Lipidne nanokapsule mogu se upotrijebiti kao nosači za spojeve koji su osjetljivi na promjenu pH, kao

i za transport lijeka koji je hidrofoban. Zaključili su da lipidne nanokapsule također mogu biti korisne kao nosači flavonoida.

Iz navedenoga proizlazi da interakcija između lipida i polifenola može imati pozitivnu ulogu u smanjenju apsorpcije procesa masti koje bi mogle imati pozitivan zdravstveni učinak. Pored toga, međureakcije lipida i polifenola mogu dovesti do zaštite polifenola pri prolasku kroz probavni sustav. To možda omogućuje blagotvoran učinak polifenola unutar probavnoga sustava. Produkti lipidne peroksidacije mogu prouzročiti razne štetne posljedice koje bi potencijalno mogle biti umanjene aktivnošću polifenola. Nadalje, međureakcije lipida i polifenola upotrebljavane su u stvaranju nanokapsule na temelju kojih lipidi mogu služiti kao nosači polifenola kroz probavni sustav.

### **2.5.3. Međureakcije polifenola i ugljikohidrata**

Postoji velik broj istraživanja koja opisuju međureakciju polifenola i ugljikohidrata, uglavnom polisaharida (Le Bourvellec *i sur.*, 2009; Padayachee *i sur.*, 2012a, 2012b; Rosa *i sur.*, 2013; Pekkinen *i sur.*, 2014), a te međureakcije imaju važnu ulogu u ljudskom tijelu.

Međureakcije polifenola i ugljikohidrata uglavnom su istraživane u *in vitro* uvjetima. Karboksilne i hidroksilne skupine fenolnih kiselina mogu se vezati na škrob i druge polisaharide vodikovim vezama, keliranjem i kovalentnim vezama, stvarajući mostove i unakrsne veze (Chi *i sur.*, 1992). Proučavanjem sustava fenolnih kiselina i škroba utvrđeno je da međureakcije fenolnih kiselina i škroba značajno pridonose inhibicijskom učinku hidrolize škroba (Kandil *i sur.*, 2012). Osim fenolnih kiselina, različita istraživanja dokazala su da proantocijanidini također mogu biti u interakciji s različitim polisaharidima stanične stijenke (pektin, celuloza i dijetalna vlakna) (Le Bourvellec *i sur.*, 2009; Padayachee *i sur.*, 2012a, 2012b). Dokazano je da antocijanidi pokazuju visoki afinitet za pektin u odnosu na globularne i filamentozne polisaharide poput celuloze i ksiloglukana (Le Bourvellec *i sur.*, 2005, 2009; Watrelot *i sur.*, 2013), što je objašnjeno stvaranjem pektinskih hidrofobnih džepova koji su sposobni inkapsulirati procijanide (Le Bourvellec *i sur.*, 2005). Džepovi ili šupljine molekula ugljikohidrata istaknuli su se kao važno mjesto u interakciji između cijanidin-3-*O*-glukozida i  $\beta$ -ciklodekstrina (Fernandes *i sur.*, 2014). Također je dokazano da polifenol-pektinski kompleksi pokazuju visoku sposobnost uklanjanja superoksida i 2,2,-difetil-1-pikirilhidrazil radikala, dok je uklanjanje hidroksilnog radikala smanjena što ukazuje na potencijalne promjene u funkcionalnosti kompleksa (Jacob *i sur.*, 2008).

Posljedice interakcija polifenola i ugljikohidrata mogu biti višestruke. Prije svega imaju utjecaj na biodostupnost i biorasploživost fenolnih spojeva. Pojedina istraživanja utvrdila su smanjenu biodostupnost polifenola uzrokovane interakcijom ugljikohidrata i polifenola. Adam *i sur.* (2002) proveli su istraživanje biorasploživosti ferulinske kiseline dopunjenu složenom dijetom od žitarica u štakora, gdje su utvrdili smanjenu biodostupnost ferulinske kiseline. Kao razlog smanjene biodostupnosti navode međureakciju ferulinske kiseline s dijelovima vlakna putem unakrsnog povezivanja s arabinoksilozom i ligninima. Nadalje, daljnja istraživanja su pokazala bolju biorasploživost ferulinske kiseline ukoliko je struktura mekinja probijena, što rezultira oslobađanjem fenolnih kiselina (Rosa *i sur.*, 2013; Pekkinen *i sur.*, 2014). Suprotno navedenom, pojedina istraživanja su pokazala da se unosom ugljikohidrata u ljudskoj prehrani povećava količina nekih polifenola. U istraživanju provedenom u ljudi, utvrđeno je da konzumacija ugljikohidrata (kruha) značajno povećava unos flavan-3-ola (Schramm *i sur.*, 2003). Neilson *i sur.* (2009) utvrdili su da prisutnost saharoze u čokoladi također pozitivno utječe na biorasploživost flavan-3-ola. Taj učinak može biti posredovan specifičnim učinkom ugljikohidrata u fiziologiji probave (pokretljivosti i/ili izlučivanju) ili povećanom aktivnosti još neidentificiranog ugljikohidratnog-flavan-3-ol prijenosnika (Schramm *i sur.*, 2003). Serra *i sur.* (2010) također su utvrdili u istraživanjima *in vitro* da hrana bogata ugljikohidratima poboljšava apsorpciju monomernih proantocijanidina. Istim istraživanjem dokazano je da je apsorpcija dimera i trimera proantocijanidina potisnuta istovremenom prisutnošću hrane bogate ugljikohidratima.

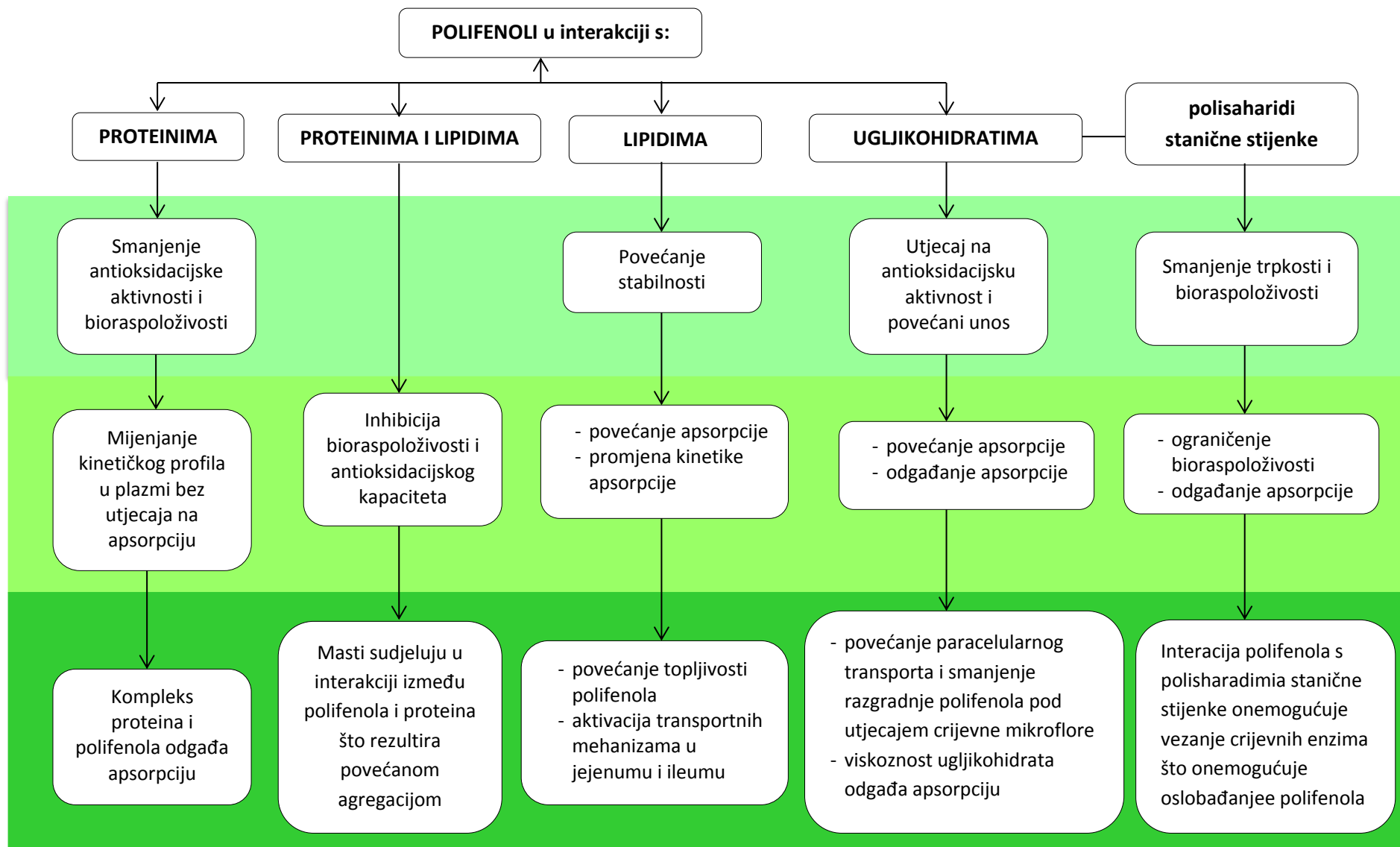
Biorasploživost polifenola vjerojatno ovisi o otpuštanju polifenola iz kompleksa koji je pod utjecajem različitih čimbenika poput: strukture polifenola, složenosti strukture polifenol-ugljikohidrat, te pristupačnosti enzima do ugljikohidrata. Međutim, čak i neoslobođeni polifenoli mogu imati potencijalnu pozitivnu ulogu u ljudskom tijelu. Naime, sve više istraživanja (Palafox-Carlos *i sur.*, 2011; Saura-Calixto, 2011; MacDonald i Wagner, 2012; Tuohy *i sur.*, 2012) ističu različite pozitivne učinke kompleksa polifenola i ugljikohidrata u debelom crijevu. Naime, polifenoli se mogu transportirati u debelo crijevo, gdje mogu biti oslobođeni iz složenih struktura kada su izloženi djelovanju raznih enzima i mikroorganizama prisutnih u debelom crijevu.

Postoji nekoliko različitih učinaka koji proizlaze iz dopreme polifenola u debelo crijevo: (i) doprema kompleksiranih polifenola u debelo crijevo može poboljšati njihovu biodostupnost u debelom crijevu, (ii) polifenoli i ugljikohidrati mogu pozitivno utjecati na rast crijevne



mikroflora, (iii) mikroorganizmi probavnog sustava mogu metabolizirati polifenolne spojeve, (iv) metaboliti mogu pokazivati različite pozitivne učinke, (v) polifenoli i njihovi metaboliti mogu stvoriti pozitivno antioksidacijsko djelovanje. Ovi učinci opisani su u nekoliko preglednih radova (Palafox-Carlos *i sur.*, 2011; Saura-Calixto, 2011; MacDonald i Wagner, 2012; Tuohy *i sur.*, 2012).

Budući da se zdravstvene prednosti polifenola temelje na njihovoj bioraspoloživosti i biodostupnosti, velik dio istraživanja se orijentira na čimbenike koji utječu na njihovu biodostupnost i bioraspoloživost. Dosadašnja istraživanja upućuju na to da unos polifenola zajedno s makronutrijentima hrane znatno utječu na biodostupnost i bioraspoloživost polifenola, a samim time i na njihovu biološku aktivnost. Na slici 21. je prikazan sažeti *in vitro* i *in vivo* učinak makronutrijenata na bioraspoloživost i biokativnost polifenola (Zhang *i sur.*, 2014).



Slika 21. Sažeti prikaz *in vitro* i *in vivo* učinaka makronutrijenata na bioraspoloživost i bioaktivnost polifenola (Zhang *i sur.*, 2014).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Pokusne životinje

Istraživanje je provedeno na miševima iz jedinice za uzgoj laboratorijskih životinja Zavoda za animalnu fiziologiju na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Pokusne životinje bile su miševi visokosrodnog soja C57BL/6, u dobi od tri mjeseca prosječne mase oko 30 g. U ovo istraživanje ukupno je bilo uključeno 312 životinja. Životinje su hranjene tijekom 28 dana. Po 6 životinja je bilo smješteno u kaveze dimenzija 20 cm x 30 cm x 20 cm, na temperaturi od 22 °C, uz neograničen pristup hrani i vodi *ad libitum*. Životinje su držane u uvjetima 12 sati svjetla i 12 sati tame pri 22 °C i 60% vlažnosti. Hrana kojom su hranjeni miševi je standardna hrana za miševe 4RF21 (Mucedola, Italija, oblik pelete 12) čiji je sastav prikazan u Tablici 5. Održavanje i njega svih pokusnih životinja provedena je u skladu sa smjericama koje su na snazi u Republici Hrvatskoj (Zakon o dobrobiti životinja, NN #135, 2006 i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u pokusima ili druge znanstvene svrhe, NN #47, 2011), a provodi se u skladu s Uputama za njegu i korištenja laboratorijskih životinja, DHHS Publ. #(NIH) 86-123. Pokuse je odobrilo Etičko povjerenstvo Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu (broj odobrenja: 251-58-10617-14-21).

Tablica 5. Sastav Mucedola standardne hrane za miševe 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 fosfat	E2 (I)
natrijev klorid	E3 (Co)
sir u prahu	E4 (Cu)
sojino ulje	E5 (Mn)
kvasac	E6 (Zn)

### 3.1.2. Pripravci korišteni u pokusu

1. **Vodena otopina ekstrakta cvijeta trnine**, primijenjena u dozi od 25 mg/kg.
2. **Kolesterol** (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) otopljen u suncokretovom ulju (2%), primijenjen u dozi od 140 mg/kg.
3. **Whey proteini** (Myprotein, Njemačka) otopljeni u vodi (10%), primijenjeni u dozi od 700 mg/kg.
4. **Saharoza** (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka) otopljena u vodi (30%), primijenjena u dozi od 4 g/kg.
5. **Fiziološka otopina** (F.O.) (Natrii chloridi infundibile, Pliva Hrvatska d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Protokol pokusa

Pokus je proveden na miševima visokosrodnog soja C57BL/6. Prije početka pokusa, sve životinje su bile slučajnim odabirom raspoređene u osam eksperimentalnih skupina. Prije početka i tijekom izvođenja pokusa životinje su pojedinačno označene (vodootpornim markerom na repovima), mjerena im je tjelesna masa na temelju koje je određivana količina pojedinačnih pripravka davanih tijekom pokusa.

Tijekom provedbe pokusa u kontinuitetu, životinje su svakodnevno intragastričnim (*ig*) putem dobivale pojedine pripravke oralno korištenjem gastralne kanile. Skupine i način obrade životinja navedene su kako slijedi:

- CO – kontrola (0,3 mL fiziološke otopine)
- ECT – ekstrakt cvijeta trnine (0,3 mL, 25 mg/kg tj.m. na dan)
- P – proteini sirutke (0,2 mL, 700 mg/kg tj.m. na dan)
- ECT + P – ekstrakt cvijeta trnine (0,3 mL, 25 mg/kg tj.m. na dan ) + protein (0,2 mL, 700 mg/kg tj.m. na dan)
- CHOL – kolesterol (0,2 mL, 140 mg/kg tj.m. na dan)
- ECT + CHOL – ekstrakt cvijeta trnine (0,3 mL, 25 mg/kg tj.m. na dan ) + kolesterol (0,2 mL, 140 mg/kg tj.m. na dan)
- CARB – saharoza (0,2 mL, 4 g/kg tj.m. na dan)
- ECT + CARB - ekstrakt cvijeta trnine (0,3 mL, 25 mg/kg tj.m. na dan ) + saharoza (0,2 mL, 4 g/kg tj.m. na dan)

Životinje su žrtvovane 1., 7., 14., 21. i 28. dana provedbe pokusa. Tijekom postupka žrtvovanja sve životinje bile su adekvatno anestetizirane i analgezirane intraperitonealnom (*ip*) primjenom kombinacije Narketana® Vetoquinol S.A., BP 189 Lure Cedex, Francuska (djelatna tvar Ketamin) i Xylapana® Vetoquinol Biowet Sp., Gorzow, R. Poljska (djelatna tvar Ksilazin) u dozi od 25 mg/kg tj.m.

### **3.2.2. PRIPREMA I ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH POLIFENOLA VODENOG EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE**

Izvor biljnog materijala, priprema vodenog ekstrakta cvijeta trnine, proces mikrovalne detekcije, mjerenje ukupnih i pojedinačnih koncentracija polifenola detaljno su opisani u radovima Dragović-Uzelac *i sur.* (2014) i Lovrić *i sur.* (2017). Za analizu kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja ukupnih polifenola, volumenu od 100  $\mu$ L razrijeđenog uzorka ekstrakta je dodano 200  $\mu$ L Folin-Ciocalteu reagensa i 1 mL 20%-tne vodene otopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Apsorbancija smjese mjerena je pri  $\lambda = 765$  nm.

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

Na temelju gore navedene doze ekstrakta cvijeta trnine od 25 mg/kg tjelesne mase ukupnih polifenola, izražene su doze svakog pojedinačnog polifenolnog spoja u ekstraktu cvijeta trnine, kao i u primjenjenoj dozi u mg/kg tjelesne mase miša. Primjenom UPLC-MS/MS metode analiziran je i sadržaj fenolnih spojeva u standardnoj Mucedola hrani za miševе.

### **3.2.3. ODREĐIVANJE BIORASPOLOŽIVOSTI I METABOLIZMA POLIFENOLA IZ EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE U ORGANIMA MIŠA UPLC MS/MS METODOM**

Uzorci za analizu koncentracije polifenolnih spojeva u organima miša (tanko crijevo, jetra, mozak, bubreg) analizirani su u svim pokusnim skupinama u vremenu od 1., 7., 14., 21. i 28. dana, dok su kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine i kontrolne skupine uzorci organa analizirani i nakon 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h i 6 h od intragastrične primjene.

### **3.2.3.1. Priprema uzoraka organa za enzimsku hidrolizu**

Uzeto je 0,5 g tkiva (bubreg, jetra, mozak i tanko crijevo) te homogenizirano u 1 mL 0,4 M fosfatnog pufera koji sadrži 6 mg askorbinske kiseline i 0,5 mg Na<sub>2</sub>EDTA (pH=6,5). Uzorci su centrifugirani 5 minuta na 16000 okr, a dobiveni supernatanti za analizu polifenolnih spojeva iz ekstrakta cvijeta trnine su pospremljeni na -80 °C. Svi postupci su rađeni na ledu, odmah nakon prikupljenih uzoraka organa.

### **3.2.3.2. Enzimska hidroliza i ekstrakcija uzoraka**

Metabolizam polifenola uključuje metilaciju, sulfataciju i konjugaciju s glukuronskom kiselinom te degradaciju glikozidnih kompleksa i heterocikličkih oblika polifenola. Za navedene pretvorbe potrebno je djelovanje enzima  $\beta$ -D-glukozidaze,  $\beta$ -D-glukuronidaze i sulfataze koji su odgovorni za otpuštanje aglikona iz glikozidnih ili glukuronidnih oblika.

Pomiješano je 200  $\mu$ L uzorka (homogenizirani uzorci jetre, bubrega, mozga i tankog crijeva) s 10  $\mu$ L mješavine enzima (250 U  $\beta$ -glukuronidaze i 20 U sulfataze). Enzimska hidroliza se provodi inkubacijom smjese uzoraka i enzima u trajanju od 45 minuta na 37 °C.

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

### **3.2.3.3. Određivanje fenolnih spojeva primjenom UPLC uz MS/MS detekciju (ultra performance liquid chromatography -tandem mass spectrometer)**

Princip određivanja fenolnih spojeva primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (UPLC) uz MS/MS detekciju - metoda vanjskog standarda temelji se na gradijentnoj eluciji, pri čemu se ekstrahirani polifenoli eluiraju u nizu padajuće polarnosti. Pojedinačni fenolni spojevi (flavonol glikozidi i fenolne kiseline) su određeni u uzorcima prema metodi koju su prethodno opisali Serra i *sur.* (2011) uz određene modifikacije. Prema Serri i *sur.* mobilne faze su bile: 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% vodene otopine acetonitrila (v/v), zatim se centrifugiraju na 5000 okr/ 5 min te se 150 µL uzorka prebaci u vialicu. Određivanje fenolnih spojeva u uzorcima je provedeno prema kromatografskim uvjetima navedenim u Tablicama 6 i 7.

Tablica 6. Kromatografski uvjeti UPLC MS/MS analize

<b>Kolona:</b>	Zorbax Eclipse Plus C18, 1,8 µm (100 × 2,1 mm I.D.) (Agilent, Santa Clara, CA, USA)
<b>Pokretna faza:</b>	otapalo <b>A</b> : 0,1% mravlja kiselina u redestiliranoj vodi otapalo <b>B</b> : 0,1% mravlja kiselina u acetonitrilu
<b>Detektor:</b>	MS/MS trostruki kvadropol (QqQ)
<b>Ionski izvor:</b>	ESI
<b>MS parametri:</b>	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)
<b>Eluiranje:</b>	gradijentno – gradijent prikazan u Tablici X.
<b>Temperatura:</b>	35 °C
<b>Vrijeme trajanja:</b>	12,5 min
<b>Injektirani volumen:</b>	2,5 µL

Tablica 7. Gradijent za LC-MS/MS analizu fenolnih spojeva\*

<b>t/min</b>	<b>Otapalo A</b>	<b>Otapalo B</b>	<b>Protok (mL/min)</b>
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

\*Preuzeto od Serra *i sur.* (2011)

Za pripremu baždarnih pravaca korišteni su sljedeći standardi: kvercetin-3-glukozid, kampfferol-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). Tijekom provedbe kvantifikacije spojeva korištena je deionizirana voda Milli-Q kvalitete (Millipore Corp., Bedford, SAD).

Na temelju masenih spektara provedena je identifikacija, a na temelju jednadžbi baždarnih pravaca kvantifikacija bioloških aktivnih spojeva (BAS) u uzorcima provedenih *in vivo* istraživanjima.

### **3.2.4. IZOLACIJA I PRIPREMA TKIVA ZA MJERENJE BIOMARKERA OKSIDACIJSKOG STRESA I ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA TKIVA**

Biomarkeri oksidacijskog stresa i antioksidacijski kapacitet tkiva (tanko crijevo, jetra, mozak, i bubreg) su kod skupina obrađenih intragastričnim unosom ekstrakta trnine (ECT) i kontrolne skupine (CO) analizirani u vremenu od 1., 7., 14., 21. i 28. dana, dok su kod ostalih skupina (ECT+P, P, ECT+CHOL, CHOL, ECT+CARB, CARB) analizirani nakon 28 dana intragastrične primjene navedenih pripravaka. Prije izolacije tkiva životinje su anestetizirane mješavinom Xylapana i Narketana (*ip* 25 mg/kg t.j.m.), te iskrvarene punkcijom iz srca bez antikoagulansa. Jetra, mozak, bubreg i tanko crijevo izvađeni su i izvagani na analitičkoj vagi. Prije vaganja, sadržaj tankog crijeva je prethodno ispražnjen. Za određivanje biljega oksidacijskog stresa i antioksidacijskog kapaciteta, dijelovi jetre, mozga, bubrega i tankog crijeva se homogeniziraju u 50 mM fosfatnom puferu (pH = 7) u omjeru 1:10 (w/v). 50 mM fosfatni pufer pripremljen je miješanjem 17 mL 0,2 M otopine  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  i 183 mL 0,2 M otopine  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , uskladi se pH, te se nadopuni  $\text{dH}_2\text{O}$  do 800 mL. Uzorci tkiva sonificirani su ultrazvučnim homogenizatorom Bandelin Sonoplus HD2070 (Bandelin, Njemačka) upotrebom sonde MS73 (Bandelin, Njemačka), snagom od 10%. Uzorci su sonificirani u 3 ciklusa po 30 sekundi uz stanku od 10 sekundi između ciklusa na +4 °C. Svi postupci su izvođeni na ledu. Sonificirani homogenati centrifugiraju se na 2000 x g 15 minuta u ultracentrifugi Mikro 200R (Hettich, Njemačka) s hlađenjem na +4 °C. Dobiveni supernatanti služe za trenutačno određivanje biljega oksidacijskog stresa ili se pohranjuju na -80 °C za naknadno određivanje njihovih aktivnosti.



### 3.2.5. MJERENJE BILJEGA OKSIDACIJSKOG STRESA

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

Koncentracija proteina u homogenatima jetre, bubrega, mozga i tankog crijeva određena je metodom po Lowry-u (1951), a izražena je u miligramima proteina po mililitru (mg/mL). Metoda se temelji na kemijskoj reakciji dvovalentnih iona bakra koji se u lužnatim uvjetima vežu na amino skupine peptidne veze, pri čemu dolazi do redukcije  $\text{Cu}^{2+}$  u  $\text{Cu}^+$  i nastanka kompleksa  $\text{Cu}^+$ -protein. Dodatkom fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline (Folin-Ciocalteu reagens),  $\text{Cu}^+$ -proteinski kompleks i bočni ogranci aromatičnih aminokiselina reduciraju fosfomolibden i fosfovolfram kiselinu u molidben i fosfovolfram plavilo (kompleks plavo-ljubičastog obojenja s maksimumom apsorbanije pri  $\lambda = 600 \text{ nm}$ ). Intenzitet boje proporcionalan je koncentraciji proteina u uzorku i mjeri se spektrofotometrijski pri  $\lambda = 600 \text{ nm}$ .

Kako bi se mogla odrediti nepoznata koncentracija proteina u uzroku prethodno je napravljen baždarni dijagram, tj. dijagram ovisnosti apsorbanije o poznatoj koncentraciji proteina. Kao standard korišten je albumin goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*, BSA). Iz početne koncentracije BSA,  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  pripremljen je niz otopina poznate koncentracije proteina u rasponu od 0 do  $20 \text{ mg mL}^{-1}$ , uključujući i slijepu probu koja umjesto otopine proteina sadrži destiliranu vodu.

Priprema otopina: Otopina A: 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  u 0,1 M NaOH; otopina B: 0,5%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 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 s destiliranom vodom u omjeru 1:2.

Uzorci za određivanje koncentracije proteina po Lowry-u razrijeđeni su komercijalnim PBS-om i to: jetra, 40 puta, bubreg, 30 puta, tanko crijevo, 20 puta i mozak, 10 puta. U epruvete je dodano  $100 \mu\text{L}$  razrijeđenog uzorka i 2 mL otopine D nakon čega slijedi inkubacija od 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Svaki uzorak rađen je u duplikatu. Nakon inkubacije naglo je dodano  $200 \mu\text{L}$  otopine E uz snažno miješanje (vorteksiranje) i ostavljeno da se inkubira na sobnoj temperaturi 30 minuta. Isti postupak je proveden za izradu baždarnog dijagrama.

Iz standardne krivulje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji BSA određen je nagib pravca i odsječak na y-os. Preko nagiba pravca i odsječka na y-os, izračunate su nepoznate masene koncentracije ( $\gamma$ ) proteina u uzorcima prema formuli:

$$\gamma(\text{proteina}) = \frac{A_{\text{uzorka}} - b}{a} \cdot d$$

gdje  $b$  predstavlja odsječak na y-os standardne krivulje,  $a$  nagib standardne krivulje, a  $d$  faktor razrjeđenja uzroka. Koncentracija proteina izražena je u mg/mL.

### 3.2.5.2. Mjerenje lipidne peroksidacije (MDA)

Lipidna peroksidacija određena je modificiranom metodom koju su opisali Jayakumar *i sur.* (2008). Metoda se temelji na mjerenju koncentracije malondialdehida (MDA) koji je jedan od glavnih produkata lipidne peroksidacije. Reakcijom malondialdehida i tiobarbituratne kiseline stvara se kromogen ružičaste boje koji je moguće mjeriti spektrofotometrijski.

U Eppendorf epruveti pomiješano je 200  $\mu\text{L}$  nerazrijeđenog supernatanta pripremljenih tkiva (jetra, bubreg, mozak i tanko crijevo) s 100  $\mu\text{L}$  8,1%-tne vodene otopine natrijeva dodecil sulfata (SDS-a), 750  $\mu\text{L}$  20%-tne vodene otopine octene kiseline (pH = 3,5) i 750  $\mu\text{L}$  0,8%-tne vodene otopine tiobarbituratne kiseline. Smjesa je zagrijavana 60 minuta u vodenoj kupelji pri temperaturi od 95 °C. Nakon inkubacije smjesa je naglo ohlađena na ledu, a potom centrifugirana 15 minuta na 5000 rpm pri +4 °C. Odvojenom supernatantu izmjerena je apsorbancija pri  $\lambda = 532 \text{ nm}$  i 600 nm spektrofotometrom Libro S22 (Biochrom, Ujedinjeno Kraljevstvo). Ukupna apsorbancija određuje se prema formuli  $A = A_{532 \text{ nm}} - A_{600 \text{ nm}}$ . Koncentracija MDA izračunata je prema formuli:

$$c(\text{MDA}) = \frac{A \cdot V_{\text{reakcijske smjese}} (\text{mL})}{\varepsilon \cdot V_{\text{uzorka}} (\text{mL}) \cdot c_{\text{proteina}} (\text{mg/mL})}$$

gdje  $\varepsilon$  iznosi  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , a duljina kivete  $l$  iznosi 1 cm. Koncentracija lipidnih peroksida izražena je kao nmol MDA/mg proteina.

### 3.2.5.3. Mjerenje aktivnosti ukupnog glutaciona (GSH)

Koncentracija ukupnog glutaciona u uzorcima jetre, bubrega, mozga i tankog crijeva određena je prema modificiranoj metodi koju je opisao Tietze (1969). Postupak određivanja koncentracije ukupnog GSH se temelji na kemijskoj reakciji tiolnog reagensa 5,5'-ditiobis-2-

nitrobenzojeve kiseline (DTNB, Ellmanov reagens) i GSH pri čemu dolazi do nastanka kromofora 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  $\lambda = 412 \text{ nm}$ , a na temelju čega indirektno dobivamo podatak o koncentraciji GSH (Eyer *i sur.*, 2003).

Priprema otopina: Otopina A: 10 mM DTNB (20 mg DNTB-a otopljeno u 5 mL 0,5 M fosfatnog pufera koji sadržava 0,5 M EDTA-e). Reakcijska smjesa B: 20  $\mu\text{L}$  enzima glutation reduktaze i 9980  $\mu\text{L}$  0,8 mM NADPH (6,67 mg NADPH otopljeno je u 10 mL 0,5 M fosfatnog pufera koji sadržava 0,5 M EDTA-e).

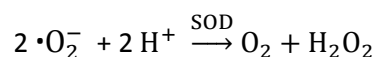
U jednu jažicu mikrotitarske pločice dodano je 20  $\mu\text{L}$  razrijeđenog uzorka, 40  $\mu\text{L}$  0,035 M HCl-a i 40  $\mu\text{L}$  otopine A. Nakon inkubacije od 10 minuta pri sobnoj temperaturi izmjerena je apsorbanacija (prvo mjerenje, DTNB). Nakon prvog mjerenja dodano je 100  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese B, te je mjerena apsorbanacija 5 minuta u pravilnim vremenskim razmacima. Promjena apsorbanacije izračunata je prema formuli:  $\Delta A = A_{\text{bez enzima}} - A_{\text{s enzimom}}$ . Ukupna koncentracija GSH izračunata je prema formuli:

$$c(\text{GSH}) = \frac{\Delta A_{\text{uzorak}} \cdot V_{\text{reakcijske smjese}} (\text{mL})}{\varepsilon \cdot V_{\text{uzorka}} (\text{mL}) \cdot c_{\text{proteina}} (\text{mg/mL})} \cdot d$$

gdje  $\varepsilon(\text{DTNB})$  iznosi  $8,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , a duljina kivete  $l$  iznosi 0,6 cm.  $d$  predstavlja faktor razrjeđenja uzorka. Koncentracija ukupnog glutationa (GSH) u uzrocima jetre, bubrega, mozga i tankog crijeva izražena je kao mU/mg proteina.

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

Superoksid dismutaza katalizira dismutaciju superoksidnih radikala ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) u vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i kisik, pri čemu se jedna molekula  $\cdot\text{O}_2^-$  oksidira u  $\text{O}_2$ , a druga reducira u  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dismutaciju superoksida enzimom možemo prikazati jednadžbom kemijske reakcije:



Aktivnost SOD-a određena je u supernatantima homogenata jetre, bubrega, mozga i tankog crijeva inhibicijom redukcije citokroma C u sustavu ksantin/ksantin oksidaza prema modificiranoj metodi Flohé i Ötting (1984).

Priprema otopina: Otopina A: otopina 1 mM xantina (1,5 mg ksantina otopljeno je u 9,86 mL 1 mM NaOH) i otopina 0,05 mM citokroma C (12,96 mg citokroma C otopljeno je u 85 mL 50 mM fosfatnog pufera, pH =7,8, koji sadržava 0,1 mM EDTA-e) pomiješane u volumnom omjeru 1:10. Otopina B je pripravljena miješanjem 20 µL enzima ksantin oksidaze (XOD, aktivnosti 0,8 U/mL) i 480 µL dH<sub>2</sub>O.

U ovoj metodi korištene su dvije slijepa probe. Prva slijepa proba sastojala se samo od otopine A te je apsorbancija u spektrofotometru mjerena pri  $\lambda = 550$  nm tijekom 3 minute. Druga slijepa proba služila je za podešavanje aktivnosti ksantin oksidaze. U kiveti je pomiješano 1,45 mL otopine A, 25 µL PBS-a i 20-40 µL otopine B. Odmah nakon dodatka enzima i brzog miješanja reakcijske smjese, mjerena je promjena apsorbancije, odnosno aktivnost enzima ksantin oksidaze tijekom 3 minute pri  $\lambda = 550$  nm. 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 U/min u kontrolnoj reakciji bez superoksid dismutaze. U ovom slučaju volumen ksantin oksidaze koji je odgovarao optimalnoj aktivnosti enzima je iznosio 30 µL. Nakon postignute optimalne aktivnosti enzima analizirani su uzorci. U svaku reakcijsku smjesu umjesto PBS-a je dodano 30 µL razrijeđenog supernatanta uzorka, 1,45 mL otopine A i odgovarajući volumen ksantin oksidaze i odmah nakon toga mjerena je apsorbancija u spektrofotometru. Svaki uzorak termostatan je na 25 °C. Jedinica SOD-a definirana je kao količina enzima potrebnog za 50-postotnu inhibiciju redukcije citokroma C u baždarnom pravcu s poznatim koncentracijama SOD-a. Enzimska aktivnost mjerena je kao postotak inhibicije aktivnosti ksantin oksidaze izračunatu prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \left( 100 - \frac{\Delta A_{\text{uzorak}} / \text{min}}{\Delta A_{\text{slijepa proba}} / \text{min}} \right) \cdot 100\%$$

Enzimska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) izračunata je prema formuli:

$$\text{Aktivnost SOD} = \frac{10 \frac{\% \text{ inhibicije} + b}{a} (\text{U/mL})}{c_{\text{proteina}} (\text{mg/mL})} \cdot d$$

gdje  $b$  predstavlja odsječak na y-os standardne krivulje,  $a$  nagib standardne krivulje, a  $d$  faktor razrjeđenja uzroka. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) izražena je kao U/mg proteina.

### 3.2.5.5. Mjerenje aktivnosti katalaze (CAT)

Katalazna aktivnost u supernatantu jetre, bubrega, mozga i tankog crijeva određena je spektrofotometrijski metodom po Aebiju (1984). U kiveti je pomiješano 20  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera i 980  $\mu\text{L}$  10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , što predstavlja slijepu probu. U sljedećoj kiveti je pomiješano 20  $\mu\text{L}$  razrijeđenog uzorka (jetra, bubreg, mozak i tanko crijevo) i 980  $\mu\text{L}$  10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , čime započinje enzimski reakcija. Svaki uzorak termostatiran je na 25 °C. Aktivnost enzima mjerena je jednu minutu pri valnoj duljini  $\lambda = 240 \text{ nm}$ . Pad u apsorbanciji u jedinici vremena je mjera katalazne aktivnosti, pri čemu je jedinica katalazne aktivnosti definirana kao količina enzima koja razgrađuje 1  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  u minuti kod  $\text{pH} = 7,0$  pri 25 °C gdje koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  pada od 10,3 do 9,2 mM. Koncentracija katalaze izračunata je prema formuli:

$$c(\text{KAT}) = \frac{A \cdot V_{\text{reakcijske smjese}} (\text{mL})}{\varepsilon \cdot V_{\text{uzorka}} (\text{mL}) \cdot c_{\text{proteina}} (\text{mg/mL})} \cdot d$$

gdje  $\varepsilon(\text{H}_2\text{O}_2)$  iznosi  $43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , a duljina kivete  $l$  iznosi 1 cm.  $d$  predstavlja faktor razrjeđenja uzorka. Aktivnost CAT-a u uzrocima jetre, bubrega, mozga i tankog crijeva izražena je u  $\mu\text{mol}$  razgrađenog  $\text{H}_2\text{O}_2$  po minuti po miligramu proteina ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min mg proteina}$ ), što odgovara jedinicama CAT-a po miligramu proteina (U CAT/mg proteina).

### 3.2.5.6. Mjerenje karboniliranih proteina (PC)

Za utvrđivanje količine oštećenja proteina korištena je metoda po Levine *i sur.* (1994), a određuje se kao sadržaj karbonilnih skupina u proteinskom uzorku. Karbonilne skupine proteinskog lanca reagiraju s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) otopljenim u HCl-u te daju 2,4-dinitrofenilhidrazon.

Volumenu od 200  $\mu\text{L}$  homogenata uzorka dodano je 300  $\mu\text{L}$  10 mM DNPH u 2M HCl. Tako pripremljeni uzorci su inkubirani pri sobnoj temperaturi tijekom jednog sata uz povremeno miješanje. Proteini su precipitirani s 10% (w/v) trikloroetenom kiselinom (TCA) na -20 °C tijekom 5 minuta te nakon toga centrifugirani na +4 °C pri 12000 g 10 minuta. Supernatant je uklonjen, a precipitat resuspendiran u mješavini etanola i etil acetata u omjeru 1:1 i centrifugiran pri istim uvjetima. Postupak ispiranja peleta je ponovljen sve dok se sav nevezani DNPH nije isprao. Nakon toga je precipitat otopljen u 6 M gvanidin HCl u kupelji na 35 °C. Dobivena otopina je korištena za mjerenje apsorbancije pri  $\lambda = 370 \text{ nm}$ .

Koncentracija proteinskih karbonilnih skupina je izračunata korištenjem molarnog ekstincijskog koeficijenta prema formuli:

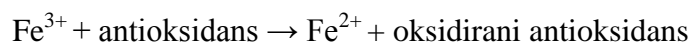
$$c(\text{PC}) = \frac{A_{\text{uzorak}}}{\varepsilon \cdot c_{\text{proteina}} (\text{mg/mL})}$$

gdje  $\varepsilon$  iznosi  $0,022 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ , a duljina kivete  $l$  iznosi 1 cm. Koncentracija proteinskih karbonilnih skupina je prikazana kao omjer količine karbonila i koncentracije proteina, te je izražena kao  $\text{nmol mg}^{-1}$  proteina.

### 3.2.6. MJERENJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI HOMOGENATA TKIVA

#### 3.2.6.1. Metoda FRAP

Mehanizam FRAP metode temelji se na prijenosu elektrona, a kompleks željeza s 2,4,6-tripiridil-s-triazinom –  $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$  koristi se kao oksidans (Benzie i Strain, 1996). Redukcijom žuto obojenog kompleksa  $\text{Fe(III)-TPTZ}$  u  $\text{Fe(II)}$  u prisutnosti antioksidansa i pri niskoj vrijednosti pH reakcijska smjesa mijenja boju u plavo čiji je maksimum apsorbancije na valnoj duljini  $\lambda = 593 \text{ nm}$ . Osnovna kemijska reakcija je ista za sve modifikacije FRAP testova (Berker i sur., 2007):



Mjerna veličina za ovu vrijednost je  $\text{EC}_{50}$ , što nam govori kada je 50%  $\text{Fe}^{3+}$  reducirano u  $\text{Fe}^{2+}$  pod utjecajem ispitivane tvari.

Kod mjerenja aktivnosti metodom FRAP 50  $\mu\text{L}$  nerazrijeđenog supernatanta uzorka tkiva (jetra, bubreg, mozak i tanko crijevo) pomiješano je s 1,5 mL prethodno pripremljenog i zagrijanog FRAP reagensa i 150  $\mu\text{L}$  destilirane vode te je mjerena apsorbancija smjese pri  $\lambda = 593 \text{ nm}$  nakon točno 4 minute. Slijepa proba pripravljena je miješanjem 1,5 mL FRAP reagensa bez TPTZ-a i 200  $\mu\text{L}$  destilirane vode, a kao kontrola (proba bez uzorka) korištena je smjesa 1,5 mL FRAP reagensa i 200  $\mu\text{L}$  destilirane vode. FRAP reagens pripremljen je miješanjem acetatnog pufera (300 mM; pH 3,6), otopine TPTZ (10 mM u 40 mM klorovodičnoj kiselini) te željezo(III) klorida (20 mM) u omjeru 10:1:1. Smjesa je inkubirana 40 minuta na  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Rezultati su izraženi kao postotak redukcije  $\text{Fe}^{3+}$ . Postotak redukcije  $\text{Fe}^{3+}$  - TPTZ izračunat je prema formuli:

$$\% \text{ redukcije} = \frac{(A_t - A_0)}{A_t} \cdot 100\%$$

gdje je  $A_0$  apsorbancija kontrole (bez uzroka), a  $A_t$  apsorbancija uzorka (sa supernatantom tkiva).

### 3.2.6.2. Metoda ABTS

Ovaj test obezbojenja se razvio zbog svoje jednostavnosti i spoznaje da je ABTS stabilan monokation pri pH vrijednosti između 3,5 i 6,5 (Miller *i sur.*, 1993). Metoda služi kao pregledni test antioksidacijske aktivnosti ispitivane tvari. Karakterističan je za testiranje lipofilnih i hidrofilnih antioksidanasa, uključujući flavonoide i hidroksicinamate (fenolne kiseline) te karotenoide i antioksidanse iz plazme.

Metoda ABTS se zasniva na mjerenju obezbojenja radikalnog monokationa  $ABTS\cdot^+$  [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)] plavo zelene boje koji nastaje oksidacijom otopine ABTS. Dodatak antioksidansa izaziva gubitak boje, a ta se promjena detektira pri valnoj duljini  $\lambda = 734$  nm. Dodatkom ispitivane tvari koja ima antioksidacijske sposobnosti ovaj prethodno formirani radikalni kation reducira se u ABTS u mjeri koja ovisi o vremenu djelovanja ispitivane tvari. Redukcija radikala ABTS određena je pomoću metode Re *i sur.* (1999). Volumen od 20  $\mu$ L nerazrijeđenog supernatanta tkiva (jetra, bubreg, mozak i tanko crijevo), pomiješan je s 2 mL otopine ABTS radikala te je nakon 6 minuta inkubacije mjerena apsorbancija proba pri valnoj duljini 734 nm. Otopina ABTS radikala priprema se tako da se 7 mM otopina ABTS-a oksidira sa svježe pripremljenom 140 mM otopinom kalijevog peroksidisulfata pomiješanih u jednakim omjerima. Na dan analize otopina se razrjeđuje s fosfatnim puferom pH 7,4 (PBS) i inkubira na  $t = 30$  °C tako da apsorbancija te otopine iznosi oko 0,700 ( $\pm 0,020$ ). Za slijepu probu korišteno je 1 mL fosfatnog pufera, a kao kontrola (proba bez uzorka) korišteno je 1 mL otopine ABTS radikala i 20  $\mu$ L fosfatnog pufera. Postotak inhibicije ABTS radikala izračunat je prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{(A_0 - A_t)}{A_0} \cdot 100\%$$

gdje je  $A_0$  apsorbancija kontrole (bez uzroka), a  $A_t$  apsorbancija uzorka (sa supernatantom tkiva).

### 3.2.7. STATISTIČKA ANALIZA

Podatci o koncentraciji pojedinih polifenolnih spojeva, vrijednosti farmakokinetičkih parametara ( $c_{\max}/AUC$ ) i antioksidacijskoj obrani organizma prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SV  $\pm$  SD) i/ili standardna pogreška (SV  $\pm$  SP). Farmakokinetički podatci analizirani su pomoću softvera Phoenix 64, SERTAA verzija f.0.03176. Podatci o farmakokinetičkoj analizi i antioksidacijskom obrambenom sustavu uspoređeni su za statističku značajnost ( $p \leq 0.05$ ) između skupina ANOVA i LSD-post hoc testom, te analizirani pomoću SPSS verzije 17.0 softvera.



## 4. REZULTATI

### 4.1. UPLC-MS ANALIZA POLIFENOLNIH SPOJEVA U EKSTRAKTU CVIJETA TRNINE (*Prunus spinosa* L.) I STANDARDNOJ HRANI ZA MIŠEVE (MUCEDOLA) PRIMJENJENIH U OBRADI I PREHRANI MIŠA C57BL/6

UPLC-MS analiza polifenolnih spojeva u ekstraktu cvijeta trnine i Mucedola standardnoj hrani za miševe primjenjenih u obradi i prehrani miša C57BL/6, te pojedinačne doze svakog polifenolnog spoja primjenjenog po mišu (mg/kg tjelesne mase miša po jednoj dozi) prikazana je u Tablici 8.

Primjenom UPLC-MS metode u ekstraktu cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) određeno je ukupno 32 polifenolna spoja koji pripadaju u četiri različite skupine polifenolnih spojeva: fenolne kiseline, flavone, flavan-3-ole i flavonole. U standardnoj Mucedola hrani za miševe, detektirano je ukupno 26 polifenolnih spojeva.

Unutar ekstrakta, najveće koncentracije utvrđene su za 3-*O*-kafeoil kininsku i 3-*p*-kumaroil kininsku kiselinu iz skupine fenolnih kiselina, te (+)-katehin i (-)-epikatehin iz skupine flavan-3-ola, dok su među flavanolima najveće koncentracije utvrđene za spojeve kvercetin-pentozid i kampferol-ramnozid.

Tablica 8. UPLC-MS analiza polifenolnih spojeva u ekstraktu cvijeta trnine i standardnoj hrani za miševе (Mucedola) primjenjenih u obradi i prehrani miša C57BL/6

				Ukupni polifenoli (mg/100 g) suhog cvijeta trnine	Doza ukupnih polifenola (mg/kg tjelesne mase C57BL/6 miša)			
Polifenoli iz ekstrakta cvijeta trnine				2508,6	25,00			
Br.	Ime spoja	RT	m/z	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 polifenolnih 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- <i>O</i> -kafeoil kininska kiselina (neoklorogenska kiselina)	3,979	353	191	192,00	76,53	1913,41	<LOD
3	4- <i>O</i> -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	<i>p</i> -kumarinska kiselina	5,764	163	119	23,67	9,43	235,88	0,05
6	3- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	3,507	337	163	216,00	86,10	2152,59	<LOD
7	4- <i>p</i> -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- <i>O</i> -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

Tablica 8. nastavak

					Ukupni polifenoli (mg/100 g) suhog cvijeta trnine	Doza ukupnih polifenola (mg/kg tjelesne mase C57BL/6 miša)		
<b>Polifenoli iz ekstrakta cvijeta trnine</b>					2508,6	25,00		
br	Ime spoja	RT	m/z	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 polifenolnih spojeva (µg/kg tjelesne mase C57BL/6 miša) u ekstraktu cvijeta trnine	Koncentracija pojedinačnih polifenolnih spojeva u peletu standardne prehrane (Mucedola) (µg/100 mg)
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	luteoiln	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

<LOD-ispod granice detekcije

## **4.2. BIORASPOLOŽIVOST POLIFENOLA EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NAKON AKUTNOG I SUBKRONIČNOG UNOSA**

Temeljem provedenih istraživanja dobiveni su rezultati farmakodinamike i raspodjele polifenolnih spojeva iz ekstrakta cvijeta trnine u organima C57BL/6 miša pri akutnoj i subkroničnoj izloženosti.

U drugom djelu istraživanja odredila se apsorpcija i raspodjela polifenolnih spojeva iz ekstrakta cvijeta u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima, mastima i šećerima.

Rezultati pokazuju da se od ukupno 32 vrste detektiranih polifenolnih spojeva koje nalazimo u ekstraktu cvijeta trnine, apsorpcijom i raspodjelom po organima u različitim vremenima selektivno bioakumuliraju različite vrste polifenolnih spojeva.

### **4.2.1. UPLC analiza selektivne bioraspodjele apsorbiranih polifenolnih spojeva iz ekstrakta cvijeta trnine u tankom crijevu, jetri, mozgu i bubregu C57BL/6 miša**

Akutna i subkronična primjena intragastrične doze vodenog ekstrakta cvijeta trnine pokazale su razlike u broju ( $N$ ) bioakumuliranih polifenolnih spojeva. U tankom crijevu, u vremenu od 0-24. sata intragastrične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine (akutna doza) je ukupno detektirano 31,25% ( $N=10/32$ ) polifenolnih spojeva i njihovih metabolita koje nalazimo u ekstraktu cvijeta trnine, a koji se mogu klasificirati u fenolne kiseline i određene skupine flavonoida: flavonole, flavan-3-ole i flavone.

Primjenom akutne doze, od ukupno 32 spoja pronađenih u ekstraktu cvijeta trnine, samo 6 spojeva, što čini 18,75% od ukupnih spojeva pronađenih u ekstraktu cvijeta trnine i 60% od ukupno detektiranih spojeva u tankom crijevu su imali statistički značajno veći AUC i  $c_{\max}$  u skupini obrađenoj ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na kontrolnu skupinu (CO).

Subkronično doziranje (1.-28.dana) uzrokovalo je veću bioakumulaciju polifenolnih spojeva u tankom crijevu pokusnih životinja. Nakon 28. dana, u tankom crijevu je ukupno detektirano 27 polifenolnih spojeva što čini 84,37% od ukupnog broja polifenolnih spojeva koje nalazimo u ekstraktu cvijeta trnine. Statistički značajno različit i veći AUC ili  $c_{\max}$  u tankom crijevu nakon subkronične obrade, uočen je za 18 polifenolnih spojeva kod skupine ECT u odnosu na kontrolu. To je 56,25% od ukupnih spojeva pronađenih u ekstraktu cvijeta trnine i 66,6% od ukupno detektiranih spojeva u tankom crijevu.

Iz grupe flavonola u tankom crijevu su detektirani derivati kvercetina, kampferola i izoramnetina među kojima su najzastupljeniji spojevi kvercetina i kampferola. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u tankom crijeva pokusnih životinja nakon akutne i subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine prikazani su u Tablici 9 i 10.

Tablica 9. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u tankom crijevu pokusnih životinja tijekom 24 sata od intragastrične primjene (akutna doza) vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Flavonoli detektirani u tankom crijevu; akutna doza (0.-24. h) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)
kvercetin-3-glukozid	-	<LOD	-	3±1,7	3,30±1,90*	5,58±4,5*
kvercetin-3-rutinozid	3±0,9	1,42±0,00	33,4±16,7	0,5±0,0	1,45±0,00	33,7±0,0
kvercetin-ramnozid	0,25±0,1	0,05±0,03	0,2±0,1	3±1,7	2,80±1,61*	3,7±0,3*
kampferol-3-rutinozid	-	<LOD	-	3±1,7	3,02±1,74*	1,5±0,3*

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg tj.m. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO –kontrolna skupina, ECT –ekstrakt cvijeta trnine SD-srednja vrijednost, SV-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Tablica 10. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u tankom crijevu pokusnih životinja tijekom 28 dana intragastrične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Flavonoli detektirani u tankom crijevu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)
kvercetin-3-glukozid	168±0	0,17±0,00	63,9±10,2	504±194	0,56±0,05*	151,0±125,5*
kvercetin-3-rutinozid	168±0	0,78±0,00	270,3±4,3	24±3	1,73±0,21*	952,0±120,8*
kvercetin-ramnozid	336±83	0,96±0,10	387,7±11,8	24±8	1,68±0,95*	723,7±17,3*
kvercetin-pentozil-heksozid	24±8	0,34±0,01	152,3±13,9	24±0	0,45±0,04	179,9±10,2
kvercetin-acetil-heksozid	672±291	0,52±0,01	219,2±23,8	672±0	0,67±0,39	429,9±0,9*
kvercetin-pentozid	168±83	1,37±0,07	654,5±19,2	24±0	1,94±1,03	814,6±8,0
kampferol-ramnozil-heksozid	24±8	0,69±0,02	334,8±4,9	24±0	0,84±0,49	384,6±3,5
kampferol-3-rutinozid	168±0	0,24±0,00	116,3±3,2	168±83	0,28±0,16	132,1±1,2
kampferol-3-glukozid	168±83	0,16±0,00	93,5±2,1	168±0	0,30±0,17*	146,1±3,8*
kampferol-3-O-ramnozid	-	<LOD	-	672±0	0,06±0,00*	9,9±0,0*

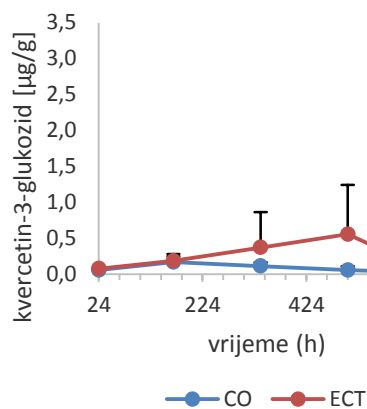
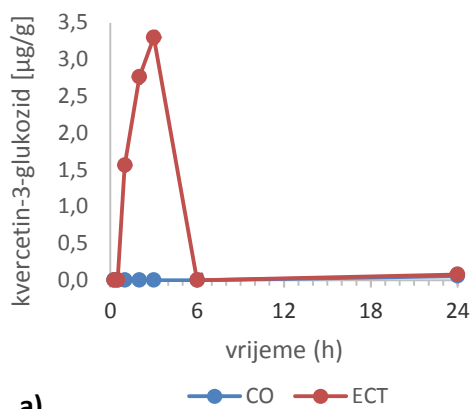
Tablica 10. nastavak

Flavonoli detektirani u tankom crijevu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)
kampferol-acetil-hekozid	504±0	0,04±0,01	13,3±4,7	672±374	0,06±0,05	7,6±2,7
kampferol-pentozil-heksozid	168±83	0,51±0,01	260,6±13,9	24±0	0,85±0,45*	329,4±10,2*
kampferol-pentozid	168±0	2,75±0,00	1344,3±6,1	24±0	5,29±2,9*	1559,4±74,7
izoramnetin-3-rutinozid	24±2	0,39±0,01	252,9±1,5	24±0	0,43±0,25	273,2±4,5

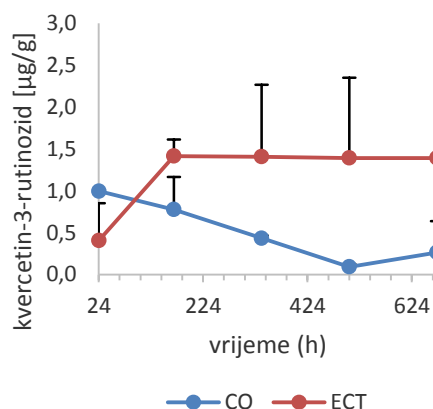
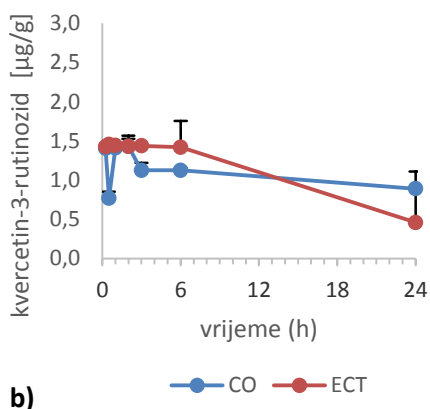
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO –kontrolna skupina, ECT –ekstrakt cvijeta trnine SD-srednja vrijednost, SV-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Farmakokinetika detektiranih spojeva kvercetina u tankom crijevu miša C57BL/6 prikazana je na Slici 22. Među kvercetinским spojevima, (akutna doza) najveće koncentracije (~3,5 µg/g tkiva tankog crijeva) postignute su za spojeve kvercetin-3-glukozid, kvercetin-3-rutinozid i kvercetin-ramnozid (3 h neposredno nakon intragastrične primjene ekstrakta) nakon čega se njihova koncentracija naglo smanjuje do vrlo niskih koncentracija (6 h nakon obrade). Od 1. do 21. dana obrade, vidljiv je blagi porast koncentracije kvercetin-3-glukozida, ali u niskom rasponu koncentracija, dok je 28. dana obrade njegova koncentracija gotovo jednaka nuli. Slična biodinamika vidljiva je i za spoj kvercetin-ramnozid čija koncentracija također nakon dostignute najveće koncentracije naglo pada, ali se od 1. do 14. dana bioakumulira u umjerenim koncentracijama nakon čega je vidljiv ponovni pad prema niskim koncentracijama sve do 28. dana obrade.

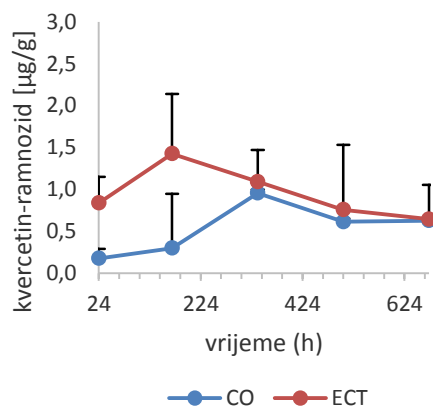
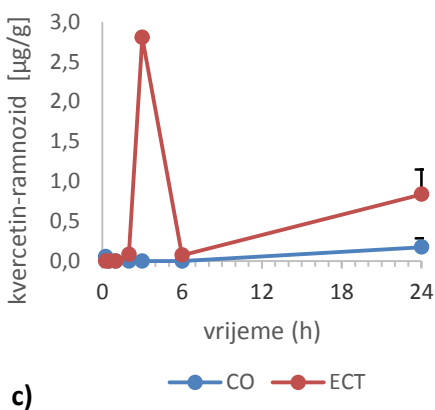
Umjerene koncentracije bioakumulacije detektirane su za spojeve kvercetin-3-rutinozid i kvercetin-pentozid. Koncentracija kvercetin-rutinozida se gotovo kroz cijeli tretman ne mijenja (~1,5 µg/g tkiva tankog crijeva), izuzev 24 sata, gdje je vidljiv nagli pad, pa ponovno povećanje koncentracije gotovo jednako do prvih 24 h nakon primjene ekstrakta. Za spoj kvercetin-pentozid, od 1. do 14. dana uočeno je smanjenje njegove koncentracije, ali i dalje u umjerenom rasponu koncentracija, nakon čega se njegova koncentracija od 21. do 28. dana obrade bioakumulira u niskom rasponu koncentracija. U niskim koncentracijama, detektirani su i kvercetin-acetil-heksozid, čija se biodinamika apsorpcije kroz 28. dana obrade nije značajno mijenjala, te kvercetin-pentozil-heksozid, kojem je koncentracija od 1. do 28. dana bila vrlo niska u usporedbi s drugim kvercetinским spojevima.



a)



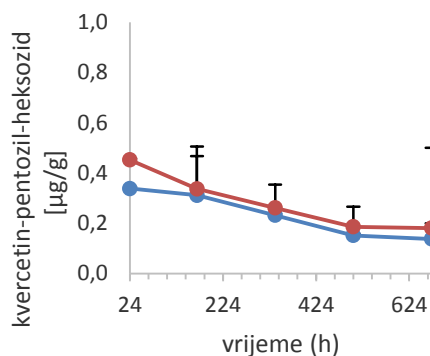
b)



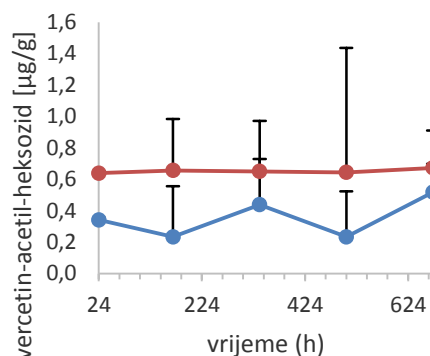
c)

Slika 22. Farmakokinetika i koncentracije spojeva kvercetina: a) kvercetin-3-glukozida, b) kvercetin-3-rutinozida, c) kvercetin-ramnozida, d) kvercetin-pentozil-heksozida, e) kvercetin-acetil-heksozida i f) kvercetin-pentozida u tankom crijevu C57BL/6 miša nakon akutne i subkronične intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

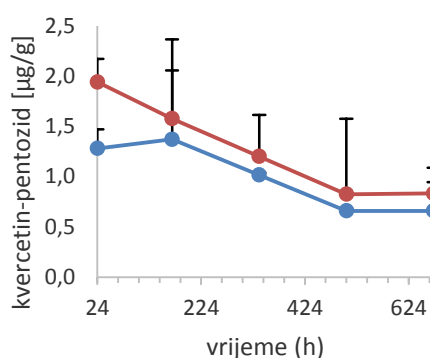
Slika 22. nastavak



d) —●— CO —●— ECT



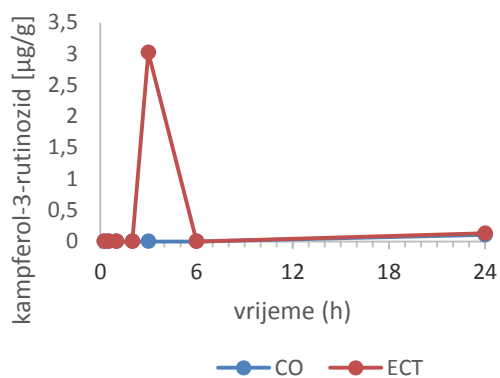
e) —●— CO —●— ECT



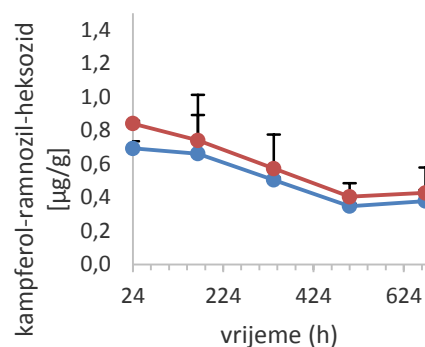
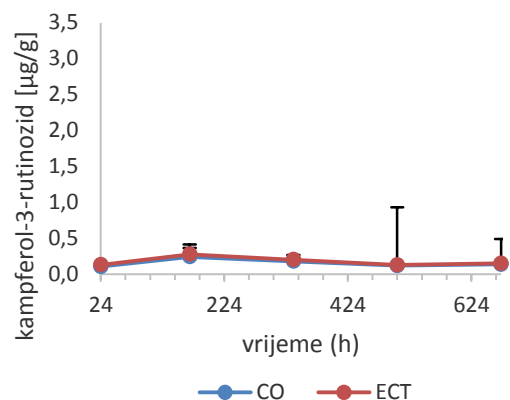
f) —●— CO —●— ECT

Farmakokinetika detektiranih spojeva kampferola u tankom crijevu miša C57BL/6 prikazana je na Slici 23. Među kampferolnim spojevima, kampferol-pentozid bio je jedini unutar relativno visokih koncentracija svih 28 dana obrade, te kampferol-3-rutinozid neposredno 3 h nakon primjene ekstrakta, nakon čega su se njegove koncentracije do 28. dana obrade kretale unutar nižih vrijednosti koncentracija. Koncentracije kampferol-ramnozid-heksozida, kampferol-pentozil-heksozida, kamperol-3-glukozida, te izoramnetin-3-rutinozida kretale su se unutar vrijednosti niskih bioapsorbiranih koncentracija kao i kod kontrolne skupine životinja. Osim navedenih kampferolnih metabolita, detektirani su kampferol-3-O-ramnozid i kampferol-acetil-heksozid čije su se koncentracije u usporedbi s drugim kampferolnim metabolitima kretale u vrlo niskim vrijednostima kako kod pokusne, tako i kod kontrolne skupine životinja.

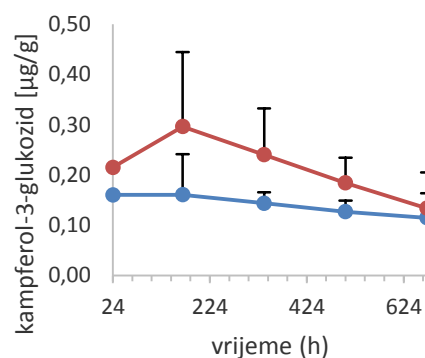




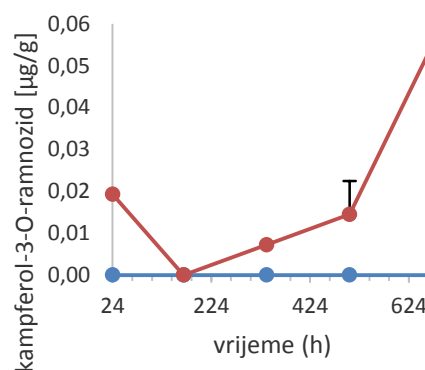
a)



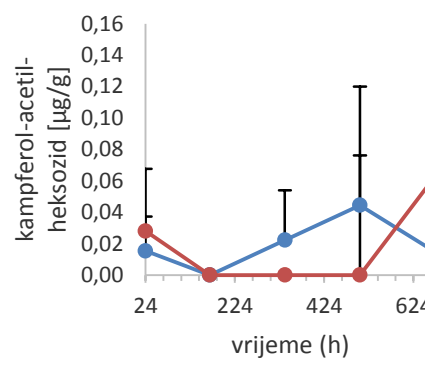
b)



c)



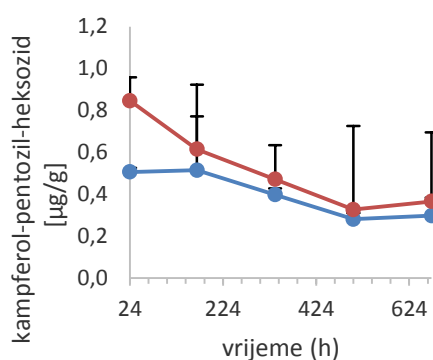
d)



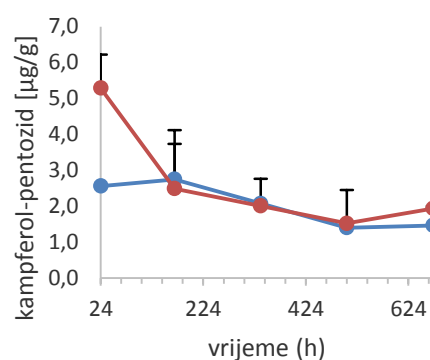
e)

Slika 23. Farmakokinetika i koncentracije kampferola: a) kampferol-3-rutinozida, b) kampferol-ramnozil-heksozida, c) kampferol-3-glukozida, d) kampferol-3-O-ramnozida, e) kampferol-acetil-heksozida, f) kampferol-pentozil-heksozida, g) kampferol-pentozida i h) izoramnetin-3-rutinozida u tankom crijevu C57BL/6 miša nakon akutne i subkronične intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SD-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

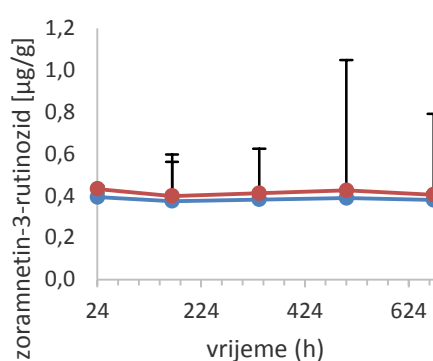
Slika 23. nastavak



f) —●— CO —●— ECT



g) —●— CO —●— ECT



h) —●— CO —●— ECT

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u tankom crijevu pokusnih životinja nakon akutne i subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine prikazani su u Tablici 11 i 12.

Tablica 11. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u tankom crijevu pokusnih životinja tijekom 24 sata od intragastrične primjene (akutna doza) vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine flavona detektirani u tankom crijevu; akutna doza (0.-24. h) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)
Apigenin	-	<LOD	-	3±2,0	0,11±0,02*	0,4±0,3*

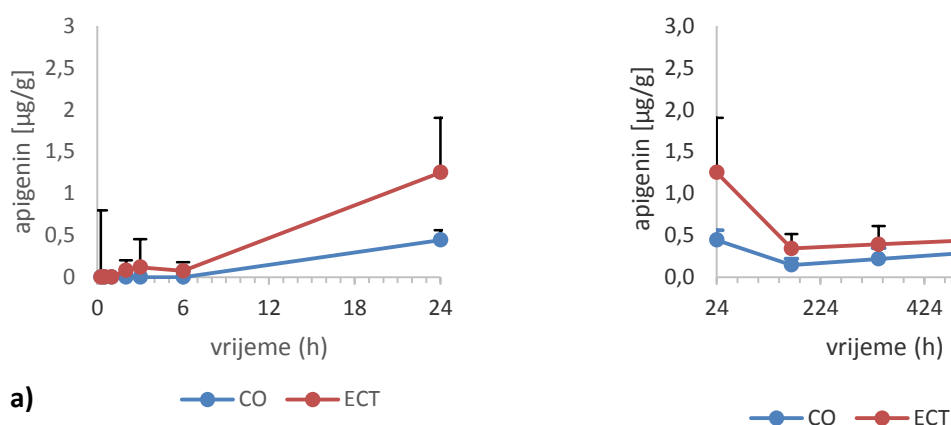
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan tj.m. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO –kontrolna skupina, ECT –ekstrakt cvijeta trnine, SD-srednja vrijednost, SV-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Tablica 12. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u tankom crijevu pokusnih životinja tijekom 28 dana intragastrične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine flavona detektirani u tankom crijevu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
Luteolin	168 $\pm$ 83	0,20 $\pm$ 0,10	89,5 $\pm$ 19,2	24 $\pm$ 3	0,64 $\pm$ 0,28*	171,8 $\pm$ 30,6*
Apigenin	24 $\pm$ 0	0,89 $\pm$ 0,14	188,3 $\pm$ 17,8	24 $\pm$ 3	2,50 $\pm$ 0,25*	523,9 $\pm$ 72,5*

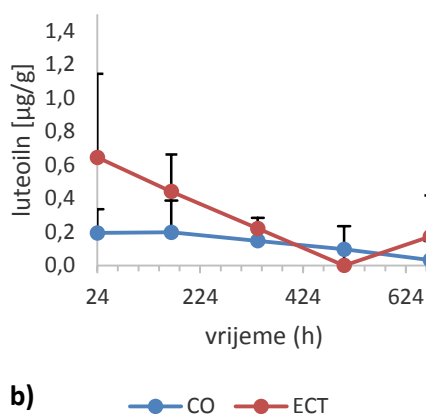
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO –kontrolna skupina, ECT –ekstrakt cvijeta trnine SD-srednja vrijednost, SV-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Farmakokinetika flavona u tankom crijevu miša C57BL/6 prikazana je na Slici 24. Iz grupe flavona detektirani su spojevi apigenin i luteolin. Relativno visoke koncentracije apigenina kod pokusnih skupina uočene su 1. i 28. dana, dok se u ostalom vremenskom periodu farmakokinetika apigenina kod pokusne i kontrolne skupine kretala u niskom rasponu koncentracija. Koncentracija luteolina, iako viša u odnosu na kontrolnu skupinu do 21. dana obrade, također se kretala u niskom rasponu koncentracija, te se postupno smanjivala sve do 28. dana obrade.



Slika 24. Farmakokinetika i koncentracije flavona: a) apigenina, b) luteolina u tankom crijevu C57BL/6 miša nakon akutne i subkronične intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 24. nastavak



UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u tankom crijevu pokusnih životinja nakon akutne i subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine prikazani su u Tablici 13 i 14.

Tablica 13. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u tankom crijevu pokusnih životinja tijekom 24 sata od intragastrične primjene (akutna doza) vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine flavan-3-ola detektirani u tankom crijevu; akutna doza (0.-24. h) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)
(+)-katehin	6±1,5	0,13±0,00	3,0±1,5	3±2,5	1,40±0,73*	4,9±2,8*
(-)-epikatehin	1±0,5	0,90±0,52	18,2±10,4	3±1,7	8,93±5,15*	34,3±22,1
(-)-epigalokatehin-3-galat	3±1,4	0,30±0,00	7,19±3,5	0,25±0,0	0,30±0,00	7,1±3,0

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg tj.m. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

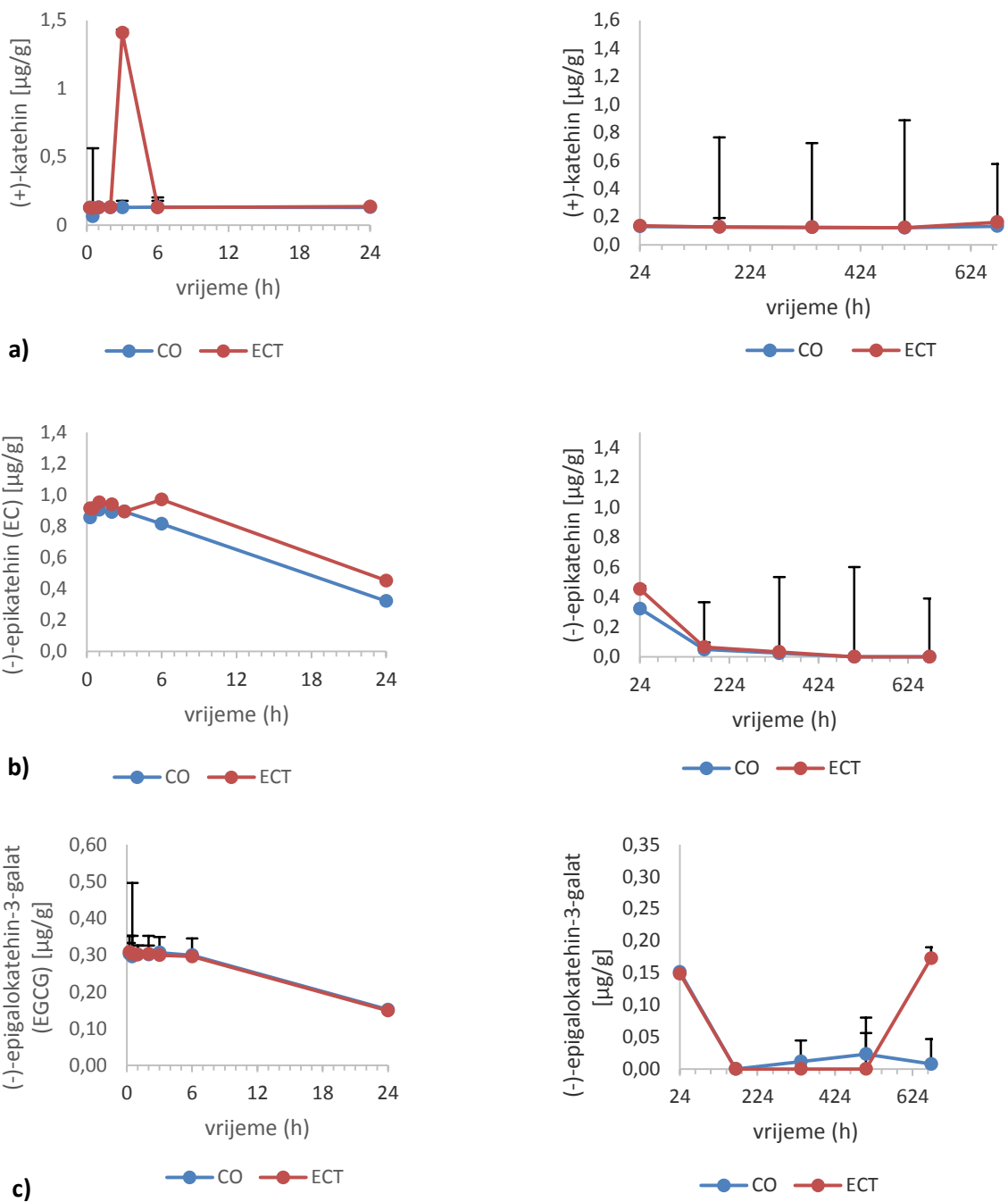
Tablica 14. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u tankom crijevu pokusnih životinja tijekom 28 dana intragastrične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine flavan-3-ola detektirani u tankom crijevu; subkornična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
(+)-katehin	672 $\pm$ 374	0,13 $\pm$ 0,00	83,5 $\pm$ 0,5	672 $\pm$ 0	0,16 $\pm$ 0,09	86,8 $\pm$ 1,5
(-)-epikatehin	168 $\pm$ 97	0,05 $\pm$ 0,04	9,4 $\pm$ 1,1	168 $\pm$ 0	0,06 $\pm$ 0,03	12,5 $\pm$ 0,0
(-)-epigalokatehin-3-galat	504 $\pm$ 291	0,02 $\pm$ 0,00	6,3 $\pm$ 0,8	672 $\pm$ 0	0,17 $\pm$ 0,02*	14,5 $\pm$ 3,9*

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Farmakokinetika detektiranih flavan-3-ola u tankom crijevu miša C57BL/6 prikazana je na Slici 25.

Za razliku od flavona, koncentracija spojeva iz skupine flavan-3-ola uglavnom se kretala u području niskih koncentracija kako kod pokusne skupine tako i kod kontrolne skupine. Najistaknutija koncentracija bila je za spoj (-)-epikatehin u prva 24 h nakon primjene ekstrakta, te za (+)-katehin (3 h neposredno nakon obrade). Epigalokatehin-3-galat je također najistaknutije koncentracije dosegao u prva 24 h, ali u nižim vrijednostima u odnosu na (-)-epikatehin i (+)-katehin.



Slika 25. Farmakokinetika i koncentracije flavan-3-ola: a) (+)-katehina, b) (-)-epikatehina i c) epigalokatehin-3-galata u tankom crijevu C57BL/6 miša nakon akutne i subkronične intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u tankom crijevu pokusnih životinja nakon akutne i subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine prikazani su u Tablici 15 i 16.

Tablica 15. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u tankom crijevu pokusnih životinja tijekom 24 sata od intragastrične primjene (akutna doza) vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine fenolnih kiselina detektirane u tankom crijevu; akutna doza (0.-24. h) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)
4- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	1±0,0	0,90±0,02	19,6±2,16	3±1,7	0,97±0,00	22,4±9,5
ferulinska kiselina	6±1,3	1,22±0,22	28,2±11,3	0,25±3,3	1,60±0,03	31,2±13,8

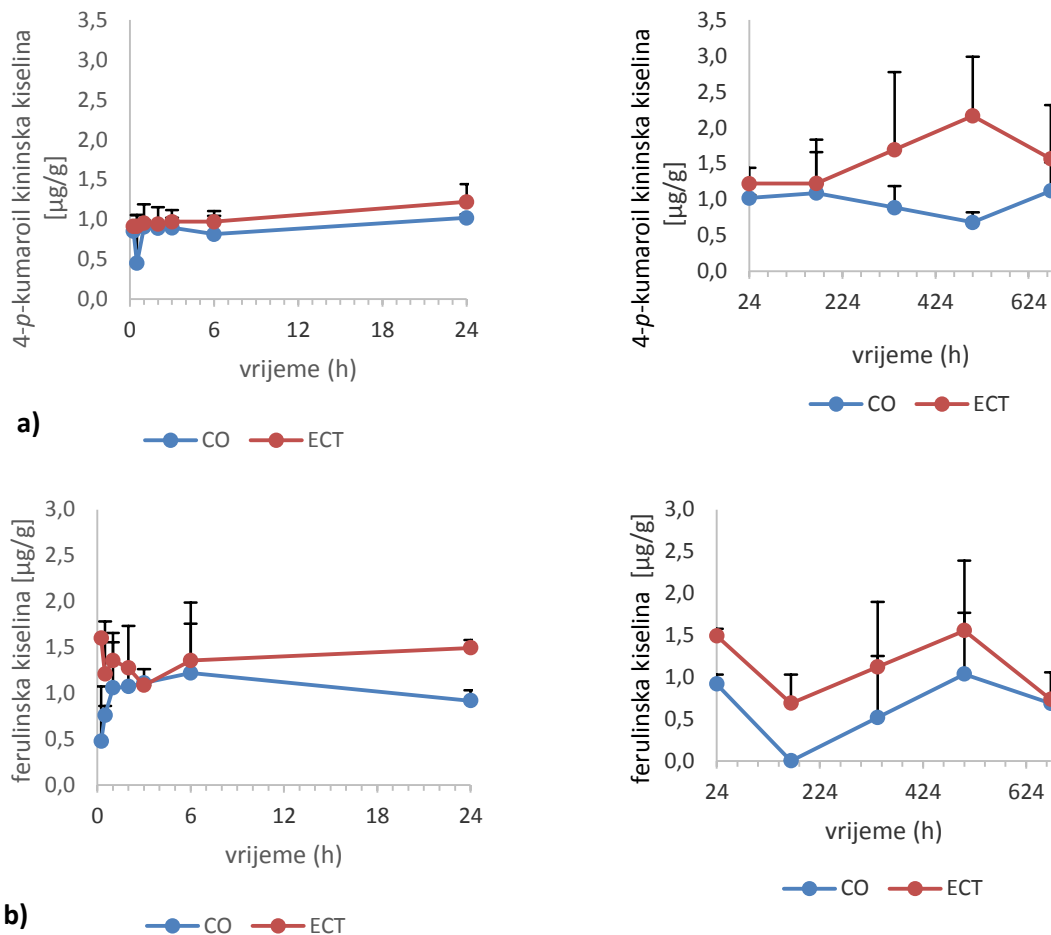
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg tj.m. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Tablica 16. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u tankom crijevu pokusnih životinja tijekom 28 dana intragastrične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine fenolnih kiselina detektirane u tankom crijevu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)
kafeinska kiselina	168±0	0,20±0,05	41,6±17,4	168±0	0,37±0,21*	111,8±13,9*
4- <i>O</i> -kafeoil kininska kiselina	672±374	1,64±0,10	896,5±83,2	168±34	1,81±1,17	1110,1±25,4
<i>p</i> -kumarinska kiselina	504±277	0,48±0,14	186,7±37,4	24±0	1,67±0,94*	444,9±6,3*
3- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	-	<LOD	-	168±14	0,20±0,02*	71,8±14,4*
4- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	24±0	1,22±0,05	627,7±4,2	504±97	2,16±1,27*	1095,0±27,8*
ferulinska kiselina	504±0	1,04±0,30	368,3±61,5	24±2	1,68±0,95*	740,9±9,7*
3- <i>O</i> -feruloil kininska kiselina	168±83	0,62±0,13	211,9±37,3	168±37	4,61±0,42*	768,4±6,3*
galna kiselina	24±0	1,28±0,67	215,1±96,7	168±0	2,21±1,27*	575,2±12,6*

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO –kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, <LOD-ispod granice detekcije, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

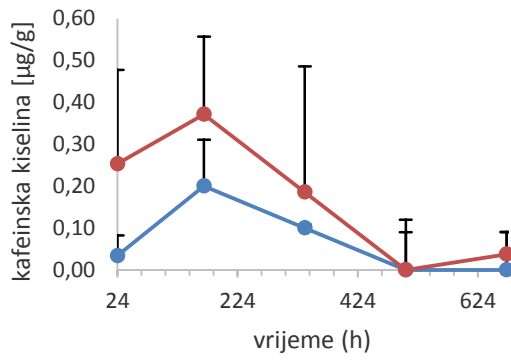
Farmakokinetika detektiranih fenolnih kiselina u tankom crijevu miša C57BL/6 prikazana je na Slici 26. Od fenolnih kiselina, više istaknutije koncentracije kod pokusne skupine u odnosu na kontrolnu skupinu gotovo tijekom cijelog trajanja obrade su uočene za ferulinsku, 4-*p*-kumaroil kininsku i galnu kiselinu, te 3-*O*-feruloil kininsku kiselinu, *p*-kumarinsku i 4-*O*-kafeoil kininsku kiselinu do 14. dana obrade. Osim navedenih fenolnih kiselina, detektirane su i kafeinska, te 3-*p*-kumaroil kininska kiselina u relativno niskim koncentracijama.



Slika 26. Farmakokinetika i koncentracije fenolnih kiselina: a) 4-*p*-kumaroil kininske, b) ferulinske, c) kafeinske, d) 4-*O*-kafeoil kininske, e) *p*-kumarinske, f) 3-*p*-kumaroil kininske, g) 3-*O*-feruloil kininske i h) galne kiseline u tankom crijevu C57BL/6 miša nakon akutne i subkronične intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

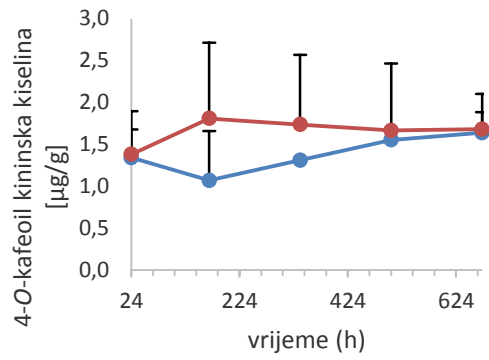


Slika 26. nastavak



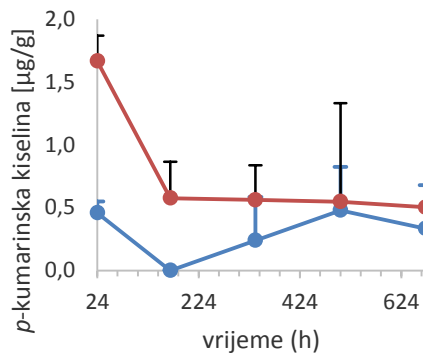
c)

CO ECT



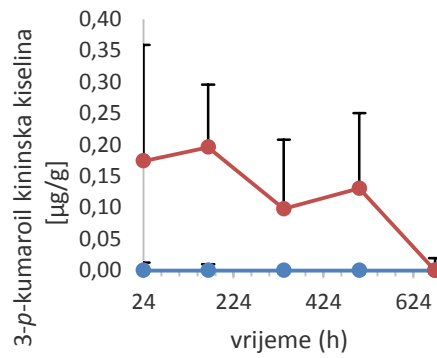
d)

CO ECT



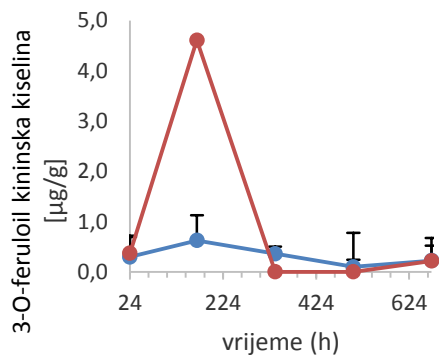
e)

CO ECT



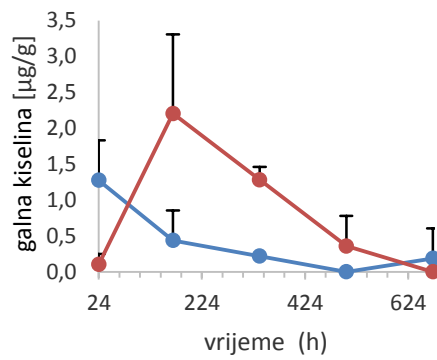
f)

CO ECT



g)

CO ECT



h)

CO ECT

Nakon bioakumulacije i apsorpcije u tankom crijevu, aglikoni i metaboliti polifenola putuju u jetru. Nakon akutne obrade u jetri je detektirano 18,75% ( $N=6/32$ ) polifenolnih spojeva, dok je nakon subkronične obrade detektrano 26 polifenolnih spojeva što čini 81,25% od ukupnog broja polifenolnih spojeva koje nalazimo u vodenom ekstraktu cvijeta trnine. Statistički značajno različit AUC i  $c_{max}$  u jetri, nakon akutne obrade utvrđen je za dva spoja, dok je nakon subkronične obrade kao i kod tankog crijeva, uočen za 16 polifenolnih spojeva kod skupine ECT što čini 40,62% od ukupnih spojeva pronađenih u ekstraktu cvijeta trnine i 50,0% od ukupno detektiranih spojeva u jetri.

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u jetri pokusnih životinja nakon akutne i subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine prikazani su u Tablici 17 i 18.

Tablica 17. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u jetri pokusnih životinja tijekom 24 sata od intragastrične primjene (akutna doza) vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Flavonoli detektirani u jetri; akutna doza (0.-24. h) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)
kvercetin-pentozid	1±0,0	0,14±0,00	3,1±1,3	0,5±1,4	0,14±0,00	3,3±1,4
kvercetin-3-rutinozid	-	<LOD	-	2±1,0	1,43±0,03*	33,5±1,4*

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg tj.m. Broj životinja po skupini ( $n=6$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SD$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine; <LOD-ispod granice detekcije, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Tablica 18. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u jetri pokusnih životinja tijekom 28 dana intragastrične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine

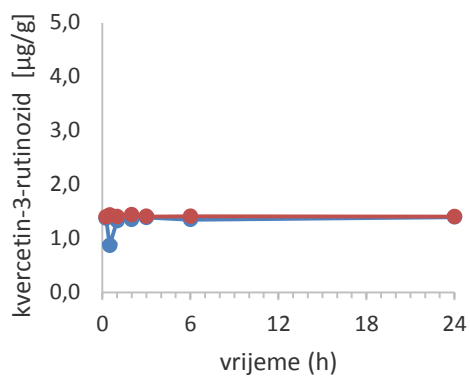
Flavonoli detektirani u jetri; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)
kvercetin-3-O-glukozid	24±0	0,14±0,09	70,6±0,8	336±277	0,40±0,03*	168,6±0,1*
kvercetin-3-O-rutinozid	336±83	1,55±0,32	715,1±78,9	336±83	2,57±0,03*	1113,1±0,6*
kvercetin-ramnozid	168±0	1,31±0,001	606,7±1,6	168±0	1,39±0,01	635,4±1,0
kvercetin-pentozil-heksozid	168±0	0,36±0,02	157,7±0,8	168±0	0,47±0,06	207,5±0,2
kvercetin-acetil-heksozid	24±3	0,55±0,00	302,8±2,5	24±3	0,64±0,00	419,2±0,2
kvercetin-pentozid	168±0	0,13±0,00	84,2±1,1	168±83	1,44±0,02*	670,0±1,6*

Tablica 18. nastavak

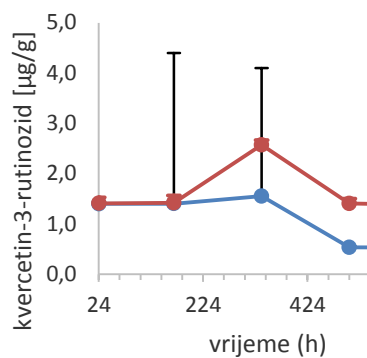
Flavonoli detektirani u jetri; subkronična doza (1.-28. dan)	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
kampferol-ramnozid-heksozid	168±83	0,70±0,02	330,5±1,5	168±0	0,80±0,00	374,2±0,6
kampferol-3-rutinozid	24±8	0,23±0,01	114,9±0,8	168±0	0,29±0,00*	140,8±0,1*
kampferol-3-glukozid	24±0	0,16±0,00	71,6±0,4	168±0	0,26±0,01	108,3±0,3*
kampferol-3-O-ramnozid	168±34	0,03±0,04	8,0±1,1	168±0	0,12±0,02*	26,2±0,5*
kampferol-acetil-heksozid	168±96	0,02±0,03	4,1±0,8	168±0	0,07±0,00*	13,4±0,0*
kampferol-pentozid	168±0	2,60±0,00	1243, 4±1,1	168±0	2,69±0,00	1382,3±1,0
izoramnetin-3-rutinozid	168±29	0,39±0,00	248,0±1,2	168±83	0,41±0,00	265,4±0,2

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Kratice: CO –kontrola, ECT –ekstrakt cvijeta trnine.

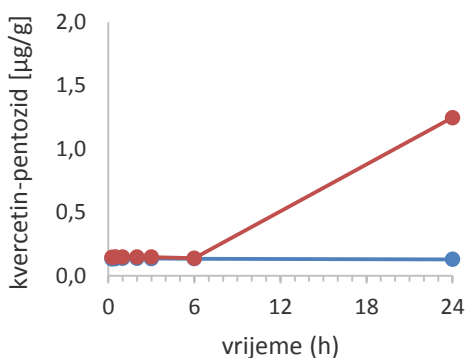
Farmakokinetika detektiranih metabolita kvercetina u jetri miša C57BL/6 prikazana je na Slici 27. Od kvercetinskih spojeva, subkroničnom obradom, u jetri je ukupno detektirano šest metabolita kvercetina. Vremenska biodinamika kvercetin-acetil-heksozida, kvercetin-pentozil-heksozida i kvercetin-ramnozida bila je slična između pokusne i kontrolne skupine, a koncentracija im se kretala od niskih do umjerenih koncentracija tijekom svih 28. dana obrade. Najveće koncentracije kao i razlike u koncentraciji između pokusne i kontrolne skupine uočene su za spojeve kvercetin-pentozid (između 6. sata i 14. dana obrade), te kvercetin-3-rutinozid i kvercetin-3-O-glukozida (između 7. i 21. dana obrade).



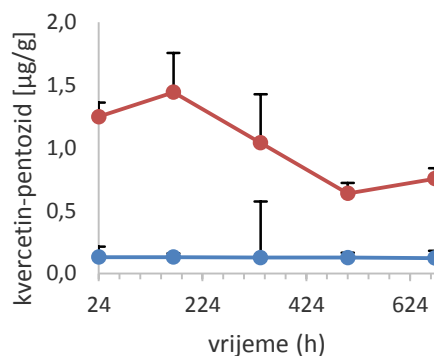
a) —●— CO —●— ECT



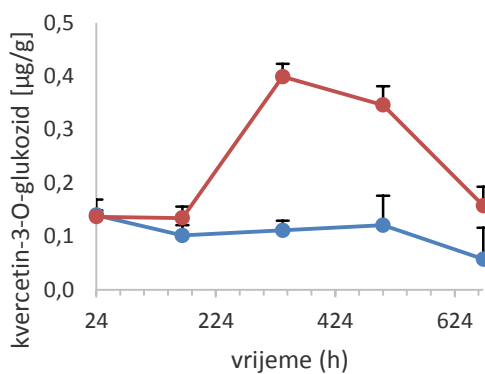
—●— CO —●— ECT



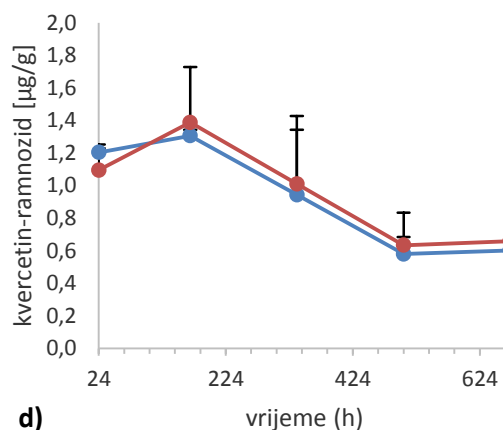
b) —●— CO —●— ECT



—●— CO —●— ECT



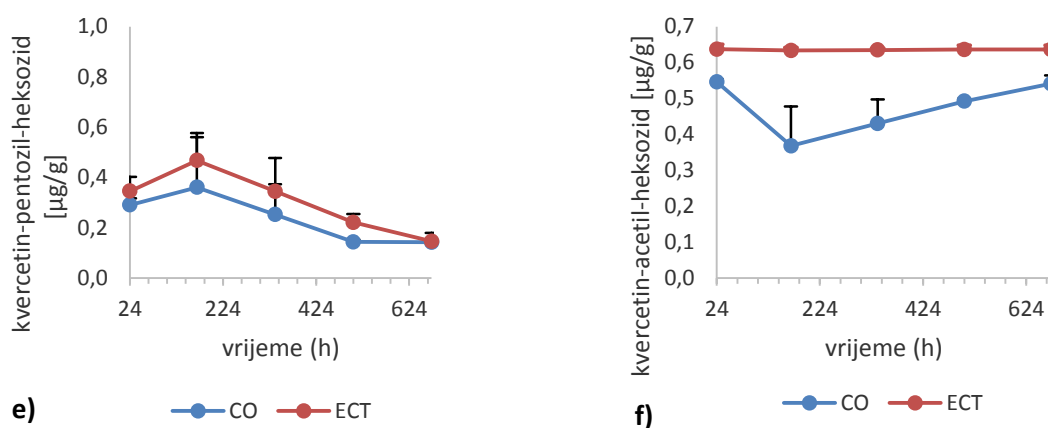
c) —●— CO —●— ECT



d) —●— CO —●— ECT

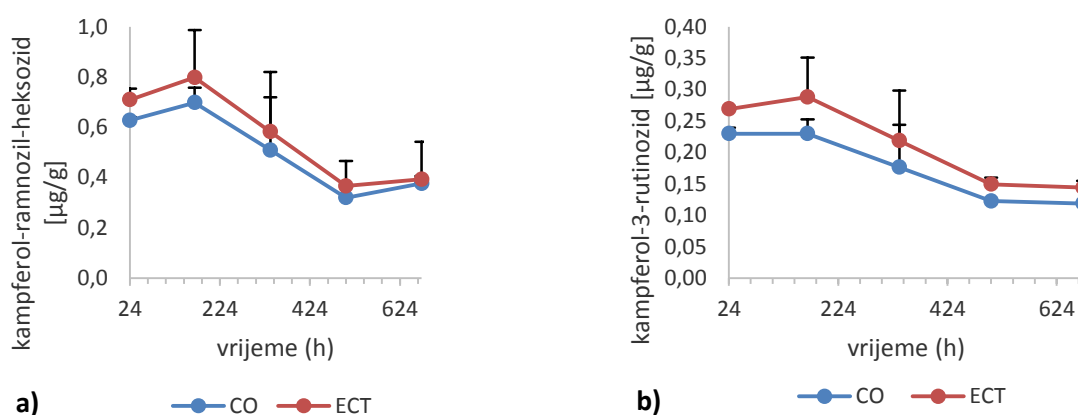
Slika 27. Farmakokinetika i koncentracije kvercetina: a) kvercetin-3-rutinozida, b) kvercetin-pentozida, c) kvercetin-3-O-glukozyda, d) kvercetin-ramnozyda, e) kvercetin-pentozil-heksozyda i f) kvercetin-acetil-heksozyda u jetri C57BL/6 miša nakon akutne i subkronične intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 27. nastavak



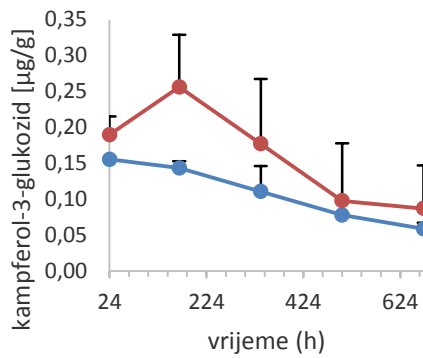
Farmakokinetika detektiranih spojeva kampferola u jetri miša C57BL/6 prikazana je na slici 28.

Od kampferolnih spojeva, detektirani su sljedeći spojevi kampferola: kampferol-pentozid, kampferol-pentozid, kampferol-3-rutinozid, kampferol-ramnozi-heksozid, kampferol-3-glukozid, kampferol-ramnozid i kampferol-acetil-heksozid. Od svih navedenih spojeva, najveća koncentracija je uočena za spoj kampferol-pentozid i to između 1. i 7. dana obrade nakon čega mu se koncentracija smanjuje. Bioapsorpcija svih ostalih metabolita kretala se u vrlo niskom koncentracijskom rasponu kako kod pokusne, tako i kod kontrolne skupine životinja. Slična vremenska biodinamika uočena je i za spoj izoramnetin-3-rutinozid.

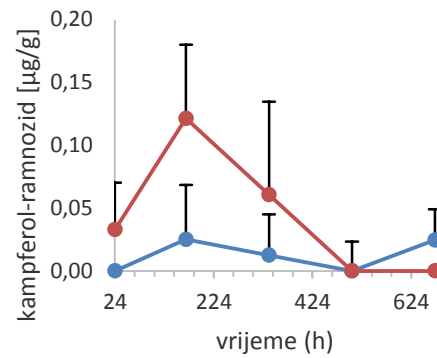


Slika 28. Farmakokinetika i koncentracije kampferola: a) kampferol-ramnozil-heksozida, b) kampferol-3-rutinozida, c) kampferol-3-glukozida, d) kampferol-ramnozida, e) kampferol-acetil-heksozida, f) kampferol-pentozida i g) izoramnetin-3-rutinozida u jetri C57BL/6 miša nakon akutne i subkronične intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$ . Kratice: CO – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

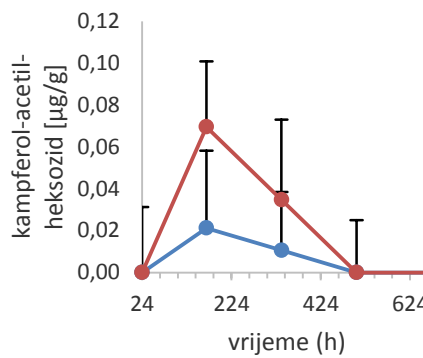
Slika 28. nastavak



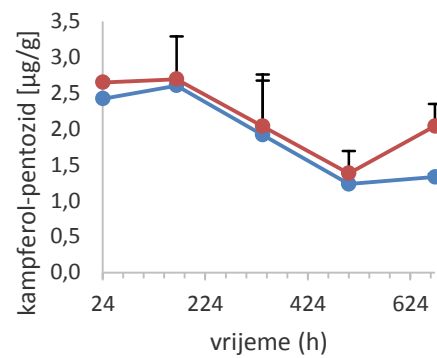
c) —●— CO —●— ECT



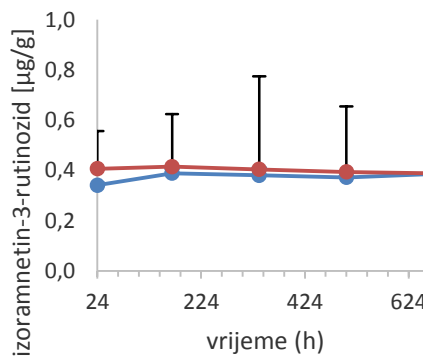
d) —●— CO —●— ECT



e) —●— CO —●— ECT



f) —●— CO —●— ECT



g) —●— CO —●— ECT

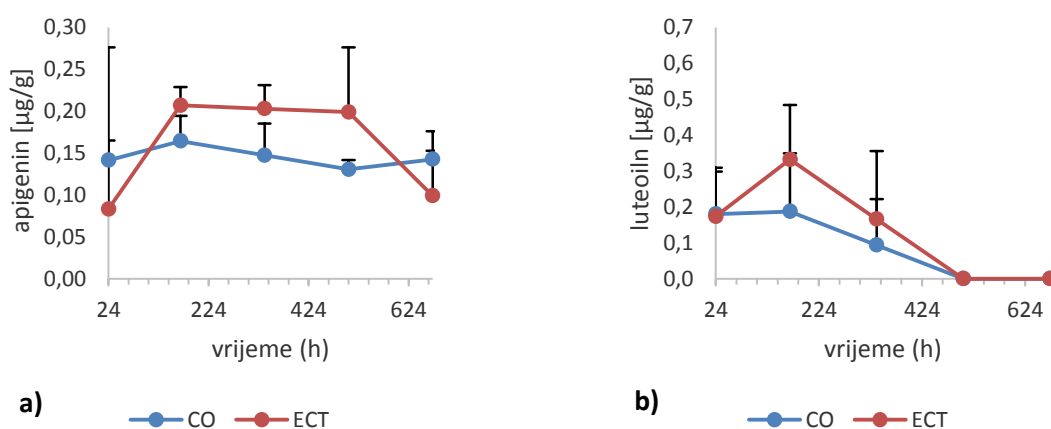
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u jetri pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine prikazani su u Tablici 19.

Tablica 19. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u jetri pokusnih životinja tijekom 28. dana intragastrične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine flavona detektirani u jetri; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
Luteolin	168±83	0,19±0,01	51,3±3,3	168±0	0,33±0,02*	78,7±1,0*
Apigenin	24±8	0,28±0,01	107,2±0,9	168±27	0,20±0,03	121,1±0,5

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $\text{SV}\pm\text{SD}$ . Kratice: CO –kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Farmakokinetika flavona u jetri miša C57BL/6 prikazana je na slici 29. Koncentracija luteolina i apigenina također se tijekom cijelog trajanja obrade kretala u vrlo niskom rasponu koncentracija. Najveća bioapsorpcija luteolina utvrđena je između 1. i 14. dana obrade, a apigenina između 1. i 21. dana nakon čega mu se koncentracija do 28. dana obrade smanjuje.



Slika 29. Farmakokinetika i koncentracije flavona: a) apigenina, b) luteolina u jetri C57BL/6 miša nakon subkronične intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao  $\text{SV}\pm\text{SD}$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u jetri pokusnih životinja nakon akutne i subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine prikazani su u Tablici 20 i 21.

Tablica 20. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u jetri pokusnih životinja tijekom 24 sata od intragastrične primjene (akutna doza) vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine flavan-3-ola detektirani u jetri; akutna doza (0.-24. h) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)
(+)-katehin	0,5±0,2	0,13±0,00	3,0±1,3	3,0±1,7	0,13±0,00	3,2±1,41
(-)-epigalokatehin-3-galat	24±13,7	0,30±0,00	7,2±3,1	0,25±0,14	0,30±0,00	7,2±3,1

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg tj.m. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

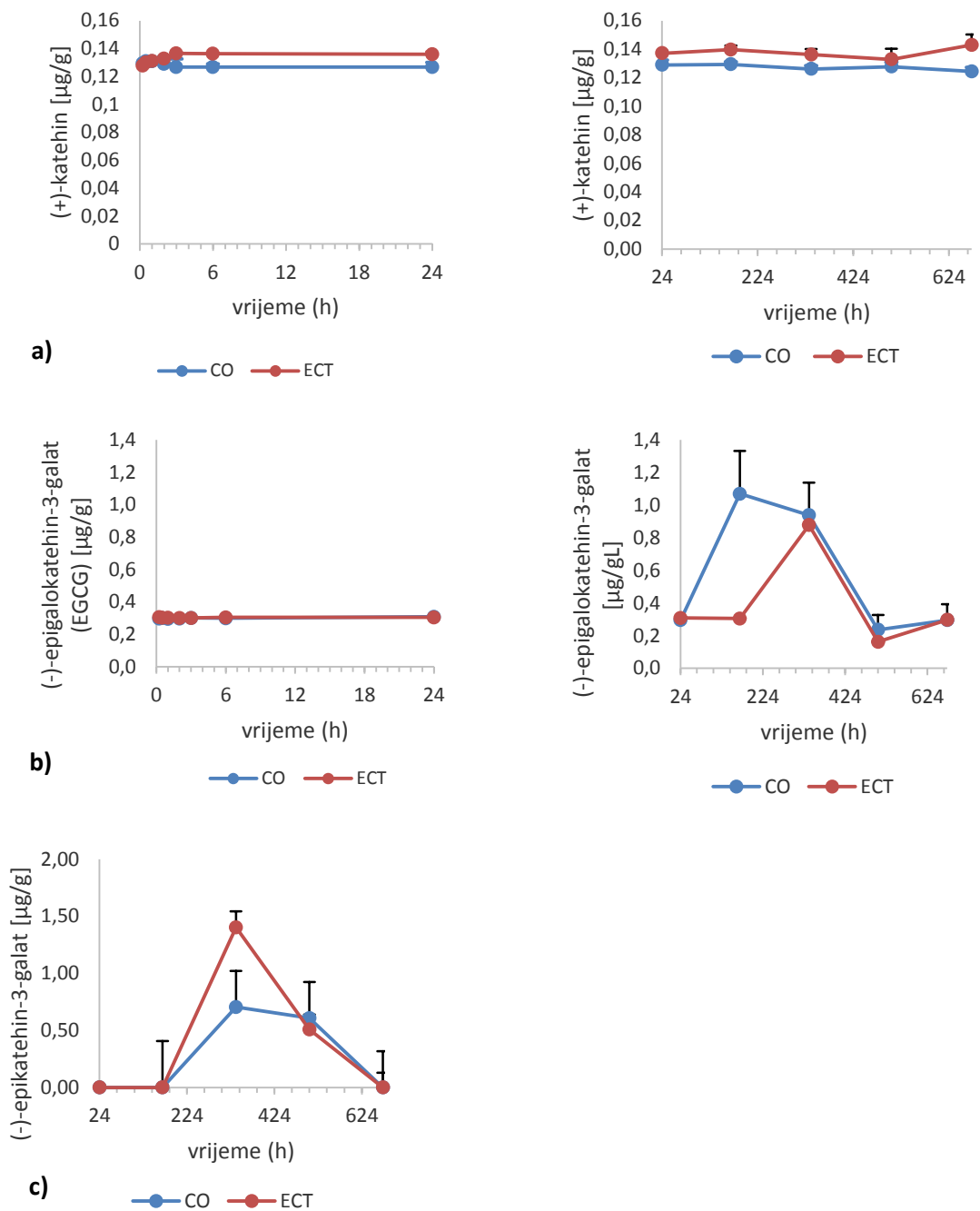
Tablica 21. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u jetri pokusnih životinja tijekom 28 dana intragastrične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine flavan-3-ola detektirani u jetri; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)
(+)-katehin	168±37	0,13±0,00	84,1±0,1	672±290	0,14±0,00	90,5±0,0
(-)-epikatehin-3-galat	336±193	0,70±0,00	169,2±2,4	336±0	1,40±0,00*	265,9±0,0*
(-)-epigalokatehin-3-galat	168±193	1,07±0,25	400,0±61,5	336±0	0,88±0,00	256,6±0,0*

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO –kontrolna skupina, ECT –ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, standardna devijacija.

Farmakokinetika detektiranih flavan-3-ola u jetri miša C57BL/6 prikazana je na Slici 30. U jetri, bioapsorpcija spojeva iz skupine flavan-3-ola slična je bioapsorpciji spojeva iz skupine flavonola. Najveća koncentracija uočena je za (-)-epikatehin-3-galat koji najveću vrijednost postiže između 7. i 21. dana obrade, te (-)-epigalokatehin-3-galat koji najveću vrijednost postiže između 7. i 14. dana. Koncentracija (+)-katehina kretala se vrlo niskom rasponu koncentracija i u pokusnoj i kontrolnoj skupini tijekom cijelog trajanja obrade.





Slika 30. Farmakokinetika i koncentracije flavan-3-ola: a) (+)-katehina, b) (-)-epigalokatehin-3-galata i c) (-)-epikatehin-3-galata u jetri C57BL/6 miša nakon akutne i subkronične intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u jetri pokusnih životinja nakon akutne i subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine prikazani su u Tablici 22 i 23.

Tablica 22. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u jetri pokusnih životinja tijekom 24 sata od intragastrične primjene (akutna doza) vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine fenolnih kiselina detektirane u jetri; akutna doza (0.-24.. h) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)
4- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	3±0,5	0,83±0,00	14,1±5,8	2±0,8	0,95±0,02	27,1±9,4*
ferulinska kiselina	1±0,0	1,31±0,15	26,4±11,3	1±0,0	1,66±0,00	32,2±14,0

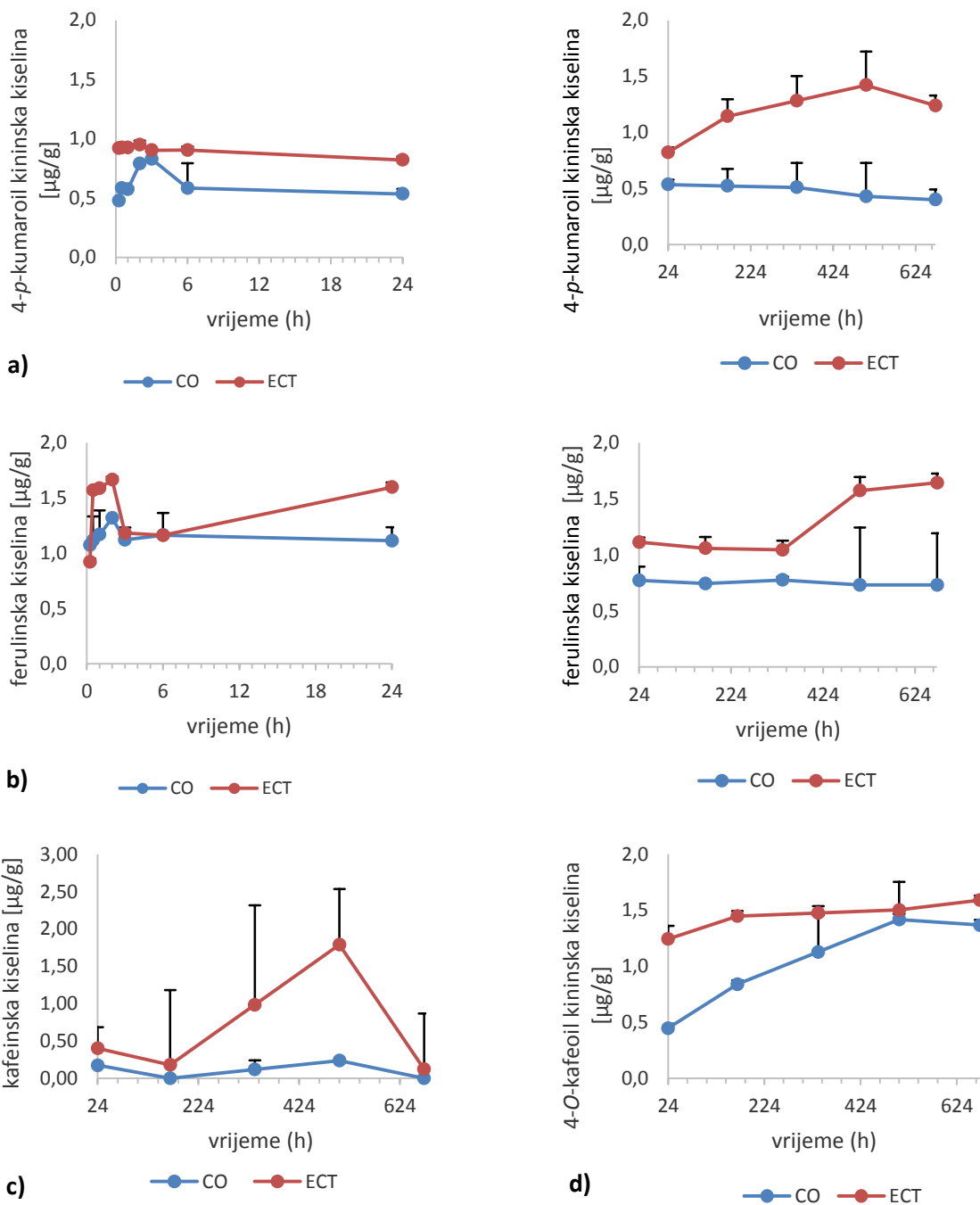
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg tj.m. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Tablica 23. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u jetri pokusnih životinja tijekom 28 dana intragastrične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine fenolnih kiselina detektirane u jetri; subkronična doza (1.-28. dan)	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)
kafeinska kiselina	504±0	0,24±0,01	54,5±0,2	504±277	1,79±0,15*	479,4±39,1*
4- <i>O</i> -kafeoil kininska kiselina	504±96	1,42±0,01	710,6±0,5	672±0	1,59±0,00	963,9±1,7
<i>p</i> -kumarinska kiselina	-	<LOD	-	168±83	0,17±0,03*	38,4±0,0*
3- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	24±8	0,04±0,02	8,3±0,7	168±0	0,26±0,00*	68,5±0,1*
4- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	24±1	0,54±0,01	317,5±2,8	504±193	1,42±0,00*	798,1±0,2*
ferulinska kiselina	336±83	0,77±0,02	494,6±0,4	672±290	1,64±0,02	835,8±3,6
3- <i>O</i> -feruloil kininska kiselina	504±290	0,21±0,06	34,9±9,0	24±2	0,45±0,09*	81,0±4,6*
galna kiselina	672±0	0,58±0,04	76,9±8,8	672±387	1,31±0,19*	110,1±16,2

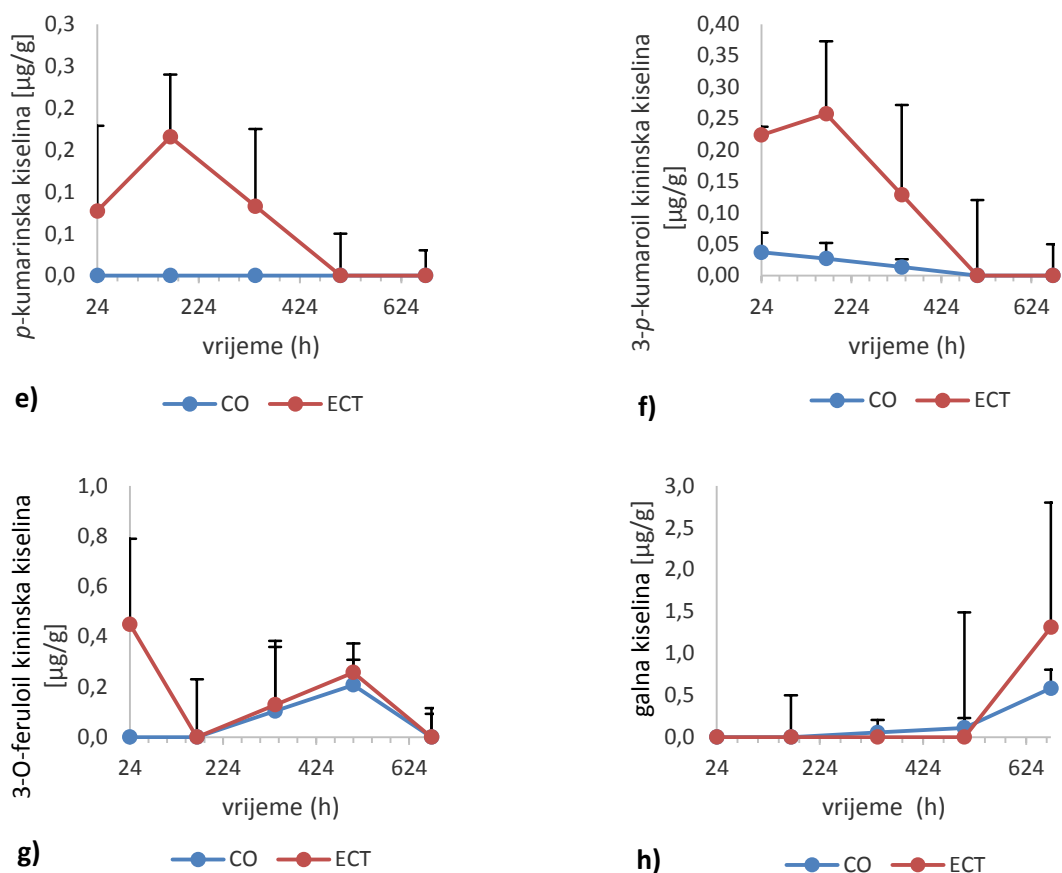
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Farmakokinetika detektiranih fenolnih kiselina u jetri miša C57BL/6 prikazana je na Slici 31. Među fenolnim kiselinama, najveće koncentracije uočene su za 4-*p*-kumaroil kininsku, ferulinsku, 4-*O*-kafeoil kininsku i kafeinsku kiselinu gotovo tijekom cijelog trajanja obrade, a koncentracija im se kretala u umjerenom rasponu koncentracija. Bioapsorpcija *p*-kumarinske i 3-*O*-feruloil kininske uočena je u vrlo niskim koncentracijama kako kod kontrolne tako i pokusne skupine životinja. Bioapsorpcija galne kiseline se do 21. dana obrade također kretala u vrlo niskom rasponu koncentracija nakon čega joj koncentracija raste do umjerenog visokih koncentracija.



Slika 31. Farmakokinetika i koncentracije fenolnih kiselina: a) 4-*p*-kumaroil kininske, b) ferulinske, c) kafeinske, d) 4-*O*-kafeoil kininske, e) *p*-kumarinske, f) 3-*p*-kumaroil kininske, g) 3-*O*-feruloil kininske i h) galne kiseline u jetri C57BL/6 miša nakon akutne i subkronične intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 31. nastavak



U mozgu pokusnih životinja, nakon akutne obrade je ukupno detektirano 43,75% ( $N=14/32$ ) polifenolnih spojeva, dok je nakon subkronične obrade detektirano 68,75% ( $N=22/32$ ) polifenolnih spojeva od ukupnog broja polifenolnih spojeva koje nalazimo u čistom ekstraktu cvijeta trnine.

Nakon akutne obrade, statistički značajno različiti i veći AUC i  $c_{\text{max}}$  u mozgu, kod skupine ECT u odnosu na kontrolnu skupinu uočeni su za 8 spojeva, dok je nakon subkronične obrade statistički značajno različit AUC i  $c_{\text{max}}$  kod skupine ECT u usporedbi s kontrolnom skupinom uočen za jedanaest spojeva što čini 21,87% od ukupnih spojeva pronađenih u ekstraktu cvijeta trnine i 31,8% od ukupno detektiranih spojeva u mozgu.

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u mozgu pokusnih životinja nakon akutne i subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine prikazani su u Tablici 24 i 25.

Tablica 24. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u mozgu pokusnih životinja tijekom 24 sata od intragastrične primjene (akutna doza) vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Flavonoli detektirani u mozgu; akutna doza (0.-24. h) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)
kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	-	<LOD	-	3±1,5	1,17±0,98*	0,5±0,1*
kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	24±12,09	1,42±0,00	33,6±14,8	24±0,0	1,47±0,00	34,7±0,0
kvercetin-ramnozid	-	<LOD	-	3±0,0	0,27±0,04*	0,1±0,0*
kvercetin-pentozil-heksozid	24±12,0	1,40±0,00	33,2±14,7	24±0,0	1,46±0,00	34,5±0,0
kampferol-3-rutinozid	-	<LOD	-	3±1,7	2,93±1,49*	1,4±0,2*
kampferol-3- <i>O</i> -ramnozid	0,25±0,0	1,53±0,00	0,1±0,0	3±1,5	0,34±0,8	0,1±0,0

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg tj.m. Broj životinja po skupini (n=6).\*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

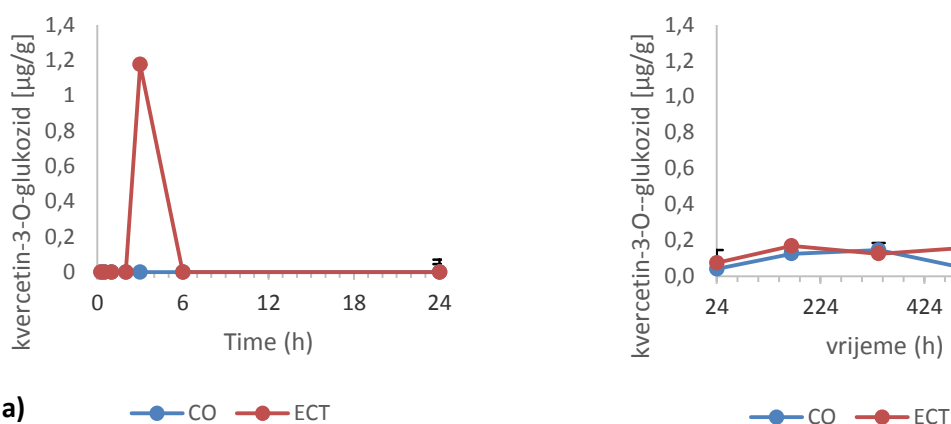
Tablica 25. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u mozgu pokusnih životinja tijekom 28 dana intragastrične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Flavonoli detektirani u mozgu; subkronična doza (1.-28. dan)	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)
kvercetin-ramnozid	504±83	0,68±0,02	425,9±4,0	672±0	2,92±0,01*	1136,4±0,58*
kvercetin-pentozil-heksozid	24±8	0,32±0,03	158,0±78,6	168±83	1,96±0,04*	979,0±8,31*
kvercetin-pentozid	24±8	1,51±0,22	692,0±146,8	24±0	2,09±0,26	830,0±28,8
kvercetin-acetil-heksozid	504±97	0,63±0,00	373,0±15,8	24±0	0,63±0,01	382,0±17,02
kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid	24±3	1,28±0,15	394,0±55,08	336±0	2,84±0,04*	1306,0±74,0*
kvercetin-3-glukozid	336±0	0,14±0,01	62,0±6,8	672±0	0,24±0,03*	107,0±5,5*
kampferol-ramnozid-heksozid	24±8	0,65±0,04	294,6±15,7	336±0	0,73±0,01	416,7±5,5
kampferol-pentozid	168±83	2,58±0,04	1295,6±22,8	168±0	2,64±0,05	1326,7±17,6
kampferol-3-rutinozid	24±0	0,06±0,01	33,0±5,3	672±0	0,28±0,00*	147,0±1,3*
kampferol-3-glukozid	168±0	0,24±0,06	108,2±11,6	168±0	0,19±0,00	89,6±0,5
izoramnetin-3-rutinozid	672±0	0,39±0,06	258,0±1,57	168±0	0,43±0,02	265,7±3,5

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6).\*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

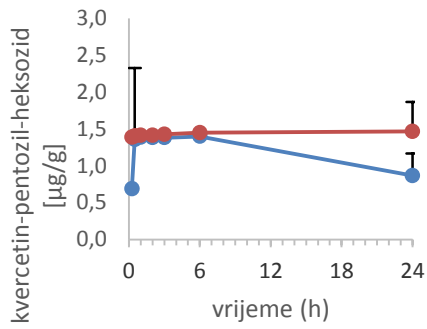
Farmakokinetika detektiranih metabolita kvercetina u mozgu miša C57BL/6 prikazana je na Slici 32. Od kvercetinskih spojeva u mozgu pokusnih životinja, najveće koncentracije postignute su za spojeve kvercetin-3-*O*-rutinozid i kvercetin-ramnozid. Kvercetin-rutinozid doseže umjerene koncentracije neposredno 15 minuta nakon primjene, a relativno visoke koncentracije utvrđene su između 7. i 14. dana obrade. Za spoj kvercetin-ramnozid uočeno je nešto drugačija biodinamika. U prvih 24 sata nakon obrade, kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine, koncentracije kvercetin-ramnozida su niske, međutim od 14. do 28. dana doseže relativno visoke koncentracije (~3 µg/g tkiva mozga) za razliku od kontrolne skupine kod koje je uočen pad njegove koncentracije.

Umjerene koncentracije detektirane su za spojeve kvercetin-pentozil-heksozid i kvercetin-3-*O*-glukozid. Bioapsorpcija kvercetin-pentozil-heksozida slična je bioapsorpciji kvercetin-3-rutinozida (0.-24. h), dok kvercetin-3-glukozid ima sličnu biodinamiku kao kvercetin-ramnozid. Umjerene koncentracije između 1. i 7. dana obrade uočene su i za spoj kvercetin-pentozid, nakon čega se njegova koncentracija smanjuje prema niskom koncentracijskom rasponu. Biodinamika kvercetin-acetil-heksozida nije se značajno mijenjala kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine i kontrolne skupine, te se kretala u niskim koncentracijama tijekom cijelog trajanja obrade.

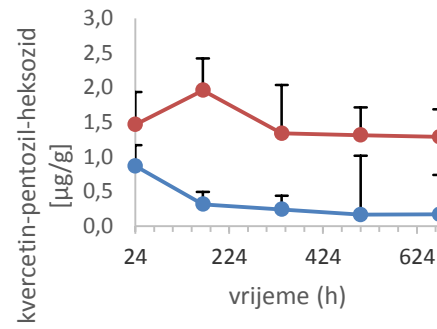


Slika 32. Farmakokinetika i koncentracije kvercetina: a) kvercetin-3-*O*-glukozida, b) kvercetin-pentozil-heksozida, c) kvercetin-ramnozida, d) kvercetin-3-*O*-rutinozida, e) kvercetin-acetil-heksozida, f) kvercetin-pentozida u mozgu C57BL/6 miša nakon akutne i subkronične intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

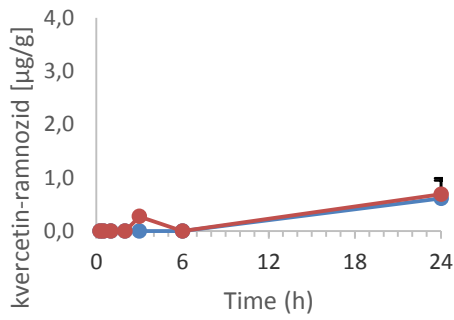
Slika 32. nastavak



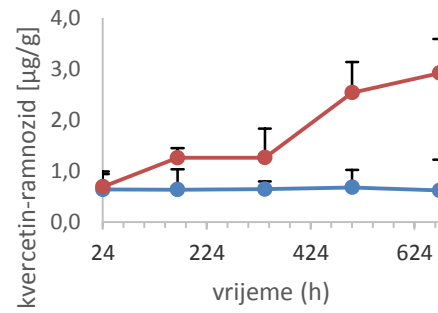
b) CO ECT



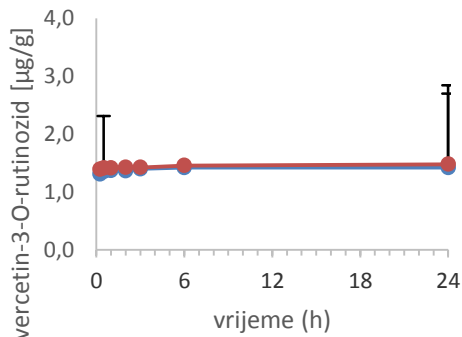
CO ECT



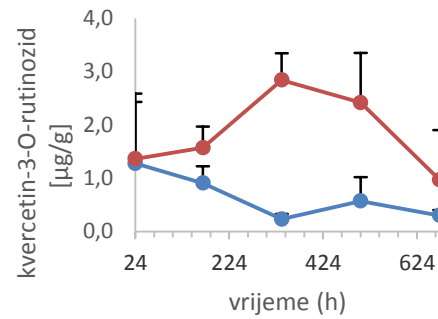
c) CO ECT



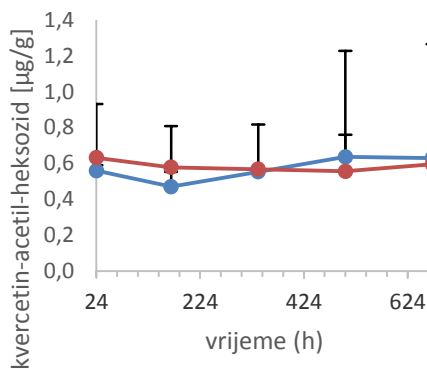
CO ECT



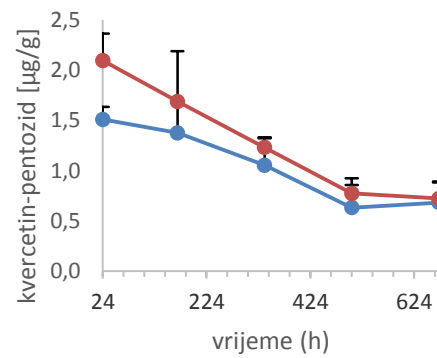
d) CO ECT



CO ECT

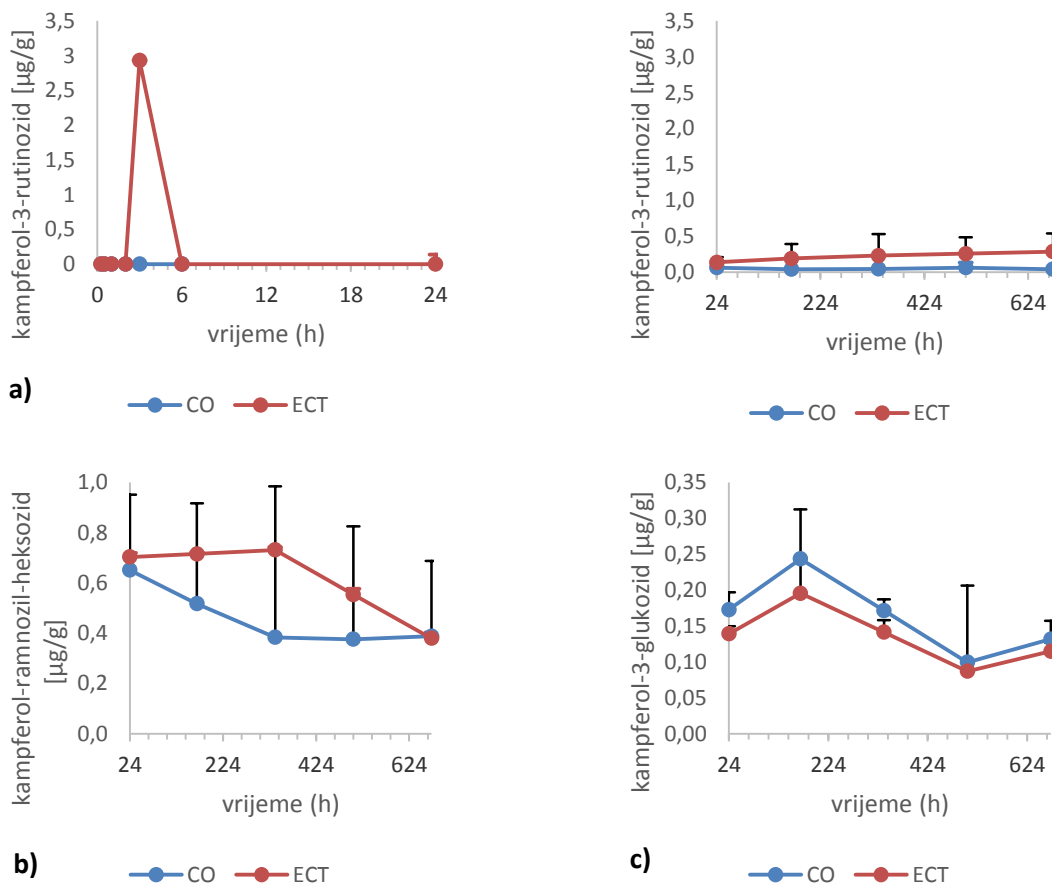


e) CO ECT



f) CO ECT

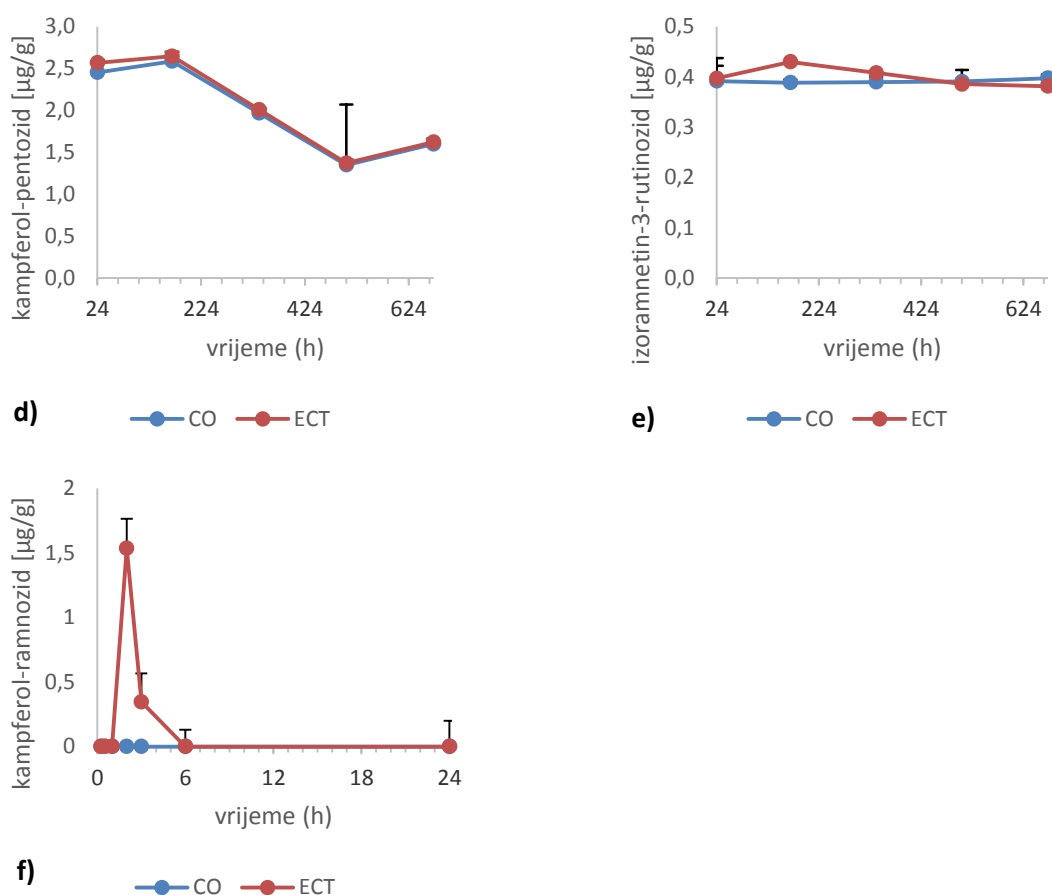
Farmakokinetika detektiranih spojeva kampferola u mozgu miša C57BL/6 prikazana je na Slici 33. Među kampferolnim spojevima, kampferol pentozid jedini je čija se koncentracija kretala unutar relativno visokog raspona koncentracija, dok su umjerene koncentracije uočene za spoj kampferol-ramnozid-heksozid. Vrijednosti kampferol-ramnozida, kampferol-3-glukozida i kampferol-3-O-rutinozida kretale su se unutar vrlo niskog raspona koncentracija tijekom cijelog trajanja obrade. Svi spojevi, izuzev kampferol-3-O-rutinozida imali su slične bioapsorbirane koncentracije kao i kontrolne skupine životinja.



Slika 33. Farmakokinetika i koncentracije kampferola: a) kampferol-3-rutinozida, b) kampferol-ramnozid-heksozida, c) kampferol-3-glukozida, d) kampferol-pentozida, e) izoramnetin-3-rutinozida i f) kampferol-ramnozida u mozgu C57BL/6 miša nakon akutne i subkronične intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standradna devijacija.



Slika 33. nastavak



UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri metabolita flavona u mozgu pokusnih životinja nakon akutne i subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine prikazani su u Tablici 26 i 27.

Tablica 26. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u mozgu pokusnih životinja tijekom 24 sata od intragastrične primjene (akutna doza) vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine flavona detektirani u mozgu; akutna doza (0.-24. h)	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)
Luteolin	-	<LOD	-	3±1,7	2,54±1,32*	1,2±0,2*
Apigenin	6±3,0	0,04±0,04	0,0±0,0	3±2,0	0,18±0,09*	0,3±0,1*

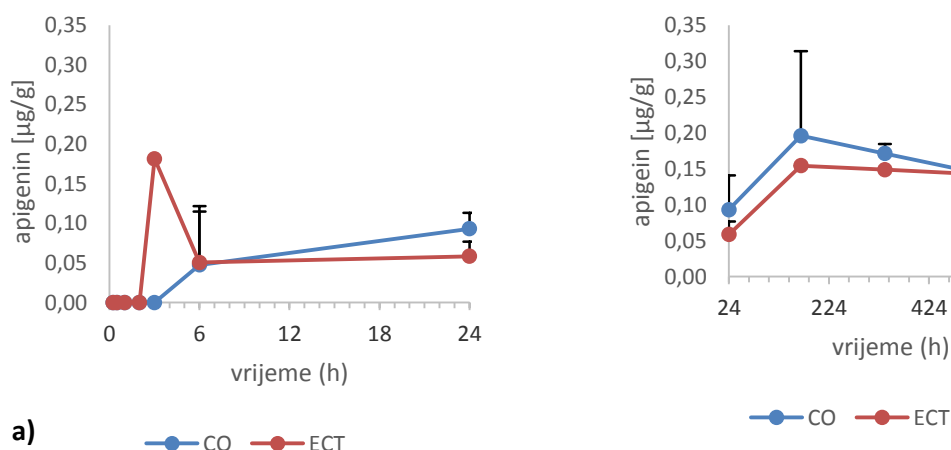
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg tj.m. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ) Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine, <LOD-ispod granice detekcije, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Tablica 27. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u mozgu pokusnih životinja tijekom 28 dana intragastrične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine flavona detektirani u mozgu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)
Luteolin	504±83	0,33±0,03	27,9±3,4	168±0	0,37±0,00	109,8±0,0*
Apigenin	672±83	0,19±0,07	116±21,3	168±0	0,15±0,00	83,8±4,3

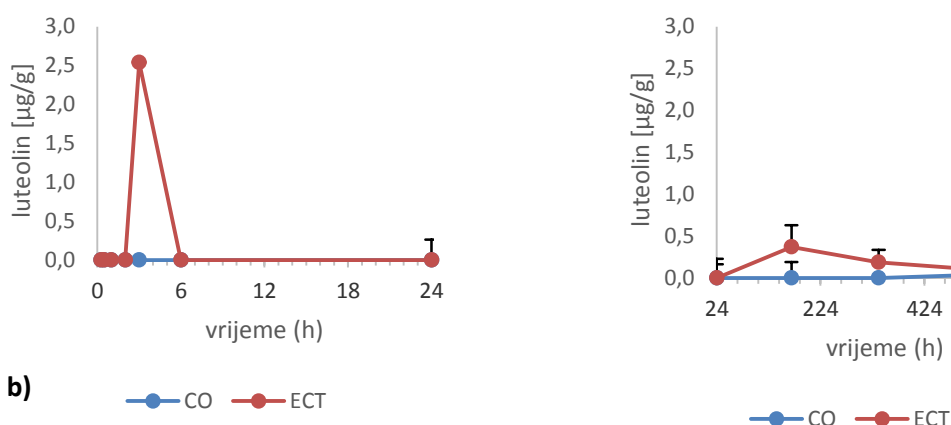
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO –kontrola, ECT –ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Farmakokinetika flavona u mozgu miša C57BL/6 prikazana je na Slici 34. Iz skupine flavona, relativno visoka koncentracija u pokusnoj skupini za razliku od kontrolne skupine, uočena je za spoj luteolin (između 2. i 6. sata), nakon čega se njegova koncentracija sve do 28. dana obrade kreće u vrlo niskom koncentracijskom rasponu. Slična biodinamika uočena je i za spoj apigenin, ali u znatno nižim koncentracijama.



Slika 34. Farmakokinetika i koncentracije flavona: a) apigenina, b) luteolina u mozgu C57BL/6 miša nakon akutne i subkronične intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO –kontrola; ECT –ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 34. nastavak



UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u mozgu pokusnih životinja nakon akutne i subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine prikazani su Tablici 28 i 29.

Tablica 28. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u mozgu pokusnih životinja tijekom 24 sata od intragastrične primjene (akutna doza) vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine flavan-3-ola detektirani u mozgu; akutna doza (0.-24. h) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)
(+)-katehin	24±13,5	0,12±0,00	3,0±1,3	6±1,2	0,13±0,00	3,2±0,0
(-)-epikatehin	-	<LOD	-	3±1,7	0,08±0,04*	0,0±0,1*
(-)-epikatehin-3-galat	-	<LOD	-	3±1,7	1,07±0,67*	0,5±0,3*
(-)-epigalokatehin-3-galat	24±11,7	0,31±0,00	7,0±3,1	24±0,0	0,32±0,00	7,5±0,0

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg tj.m. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

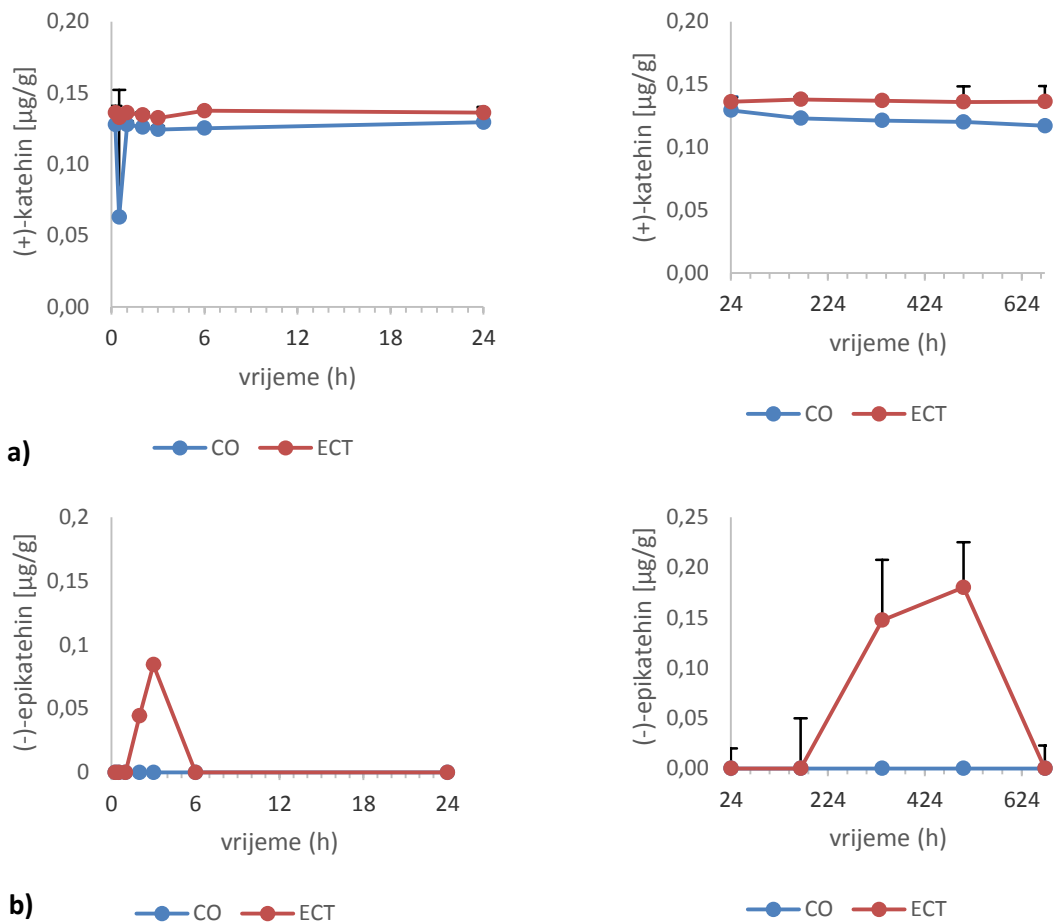
Tablica 29. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u mozgu pokusnih životinja tijekom 28 dana intragastrične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine flavan-3-ola detektirani u mozgu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)
(+)-katehin	24±374	0,12±0,05	80,4±1,17	168±37	0,13±0,00	90,3±1,17
(-)-epikatehin	-	<LOD	-	504±0	0,18±0,00*	39,9±0,0*
(-)-epikatehin-3-galat	168±0	1,89±0,00	346,2±0,0	168±0	2,23±0,00	461,6±0,0
(-)-epigalokatehin-3-galat	336±0	0,35±0,00	207,7±0,0	168±0	2,13±0,00	567,6±0,0*

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ).

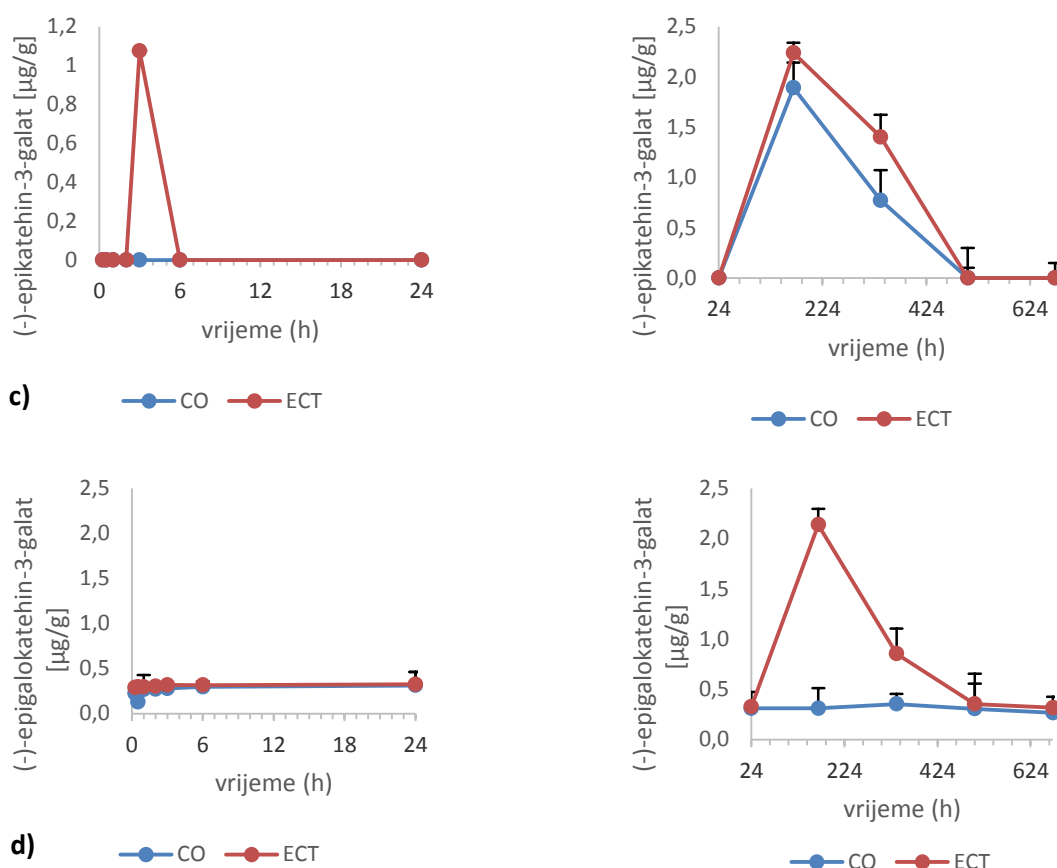
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg tj.m. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Farmakokinetika flavan-3-ola u mozgu miša C57BL/6 prikazana je na Slici 35. Za razliku od većine spojeva iz skupine flavonola, koncentracija flavan-3-ola u mozgu pokusnih životinja se kretala u umjerenom i niskom koncentracijskom rasponu. Flavan-3-oli, (-)-epikatehin-3-galat i (-)-epigalokatehin-3-galat bili su najistaknutiji katehinski spojevi u umjerenom opsegu koncentracija, dok su se vrijednosti (-)-epikatehina i (-)-katehina kretale u niskom koncentracijskom rasponu. (-)-epigalokatehin-3-galat i (-)-epkatehin imali su najistaknutije koncentracije između 1. i 14. dana obrade, dok je (-)-epikatehin iako niže koncentracije dostigao najviše vrijednosti između 7. i 14. dana obrade. Kod svih katehinskih spojeva, izuzev (-)-epikatehina i (-)-epigalokatehin-3-galata uočena je slična biodinamika kao i koncentracije između pokusne i kontrolne skupine životinja.



Slika 35. Farmakokinetika i koncentracije flavan-3-ola: a) (+)-katehina, b) (-)-epikatehina, c) epikatehin-3-galata i d) (-)-epigalokatehin-3-galata u mozgu C57BL/6 miša nakon akutne i subkronične intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 35. nastavak



UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u mozgu pokusnih životinja nakon akutne i subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine prikazani su Tablici 30 i 31.

Tablica 30. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u mozgu pokusnih životinja tijekom 24 sata od intragastrične primjene (akutna doza) vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine fenolnih kiselina detektirane u mozgu; akutna doza (0.-24. h) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)
4- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	2±0,8	0,93±0,01	17,0±7,1	0,5±0,0	0,99±0,00	22,8±0,2
klorogenska kiselina	-	<LOD	-	3±0,0	1,07±0,00*	0,5±0,0*

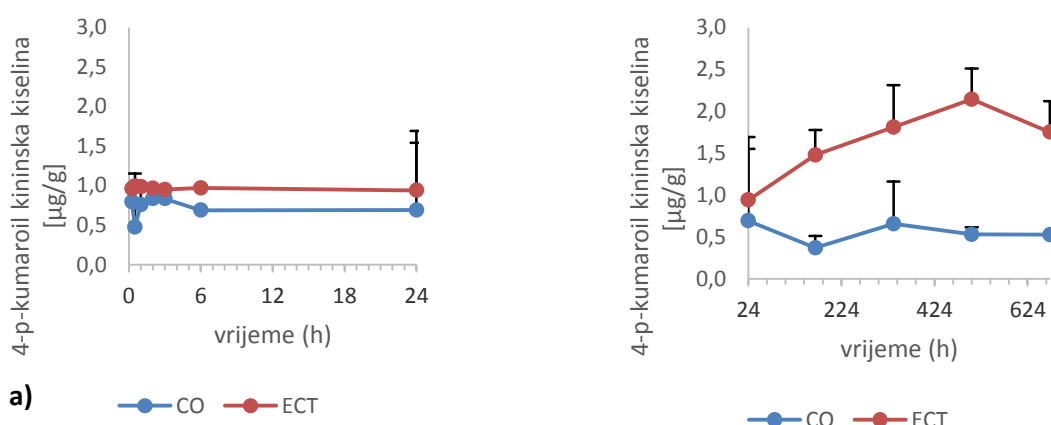
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg tj.m. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO –kontrolna skupina, ECT –ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Tablica 31. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u mozgu pokusnih životinja tijekom 28 dana intragastrične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine fenolnih kiselina detektirane u mozgu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
4- <i>O</i> -kafeoil kininska kiselina	672 $\pm$ 0	1,56 $\pm$ 0,04	746,0 $\pm$ 126,4	168 $\pm$ 0	2,01 $\pm$ 0,115	1072 $\pm$ 43,3
4- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	24 $\pm$ 3	0,69 $\pm$ 0,25	356,0 $\pm$ 153,67	504 $\pm$ 0	2,14 $\pm$ 0,05*	1166,0 $\pm$ 47,9*
ferulinska kiselina	168 $\pm$ 0	1,52 $\pm$ 0,00	856,4 $\pm$ 0,0	504 $\pm$ 0	1,64 $\pm$ 0,00	929,6 $\pm$ 0,0
3- <i>O</i> -feruloil kininska kiselina	168 $\pm$ 19	0,48 $\pm$ 0,05	202,0 $\pm$ 114,9	168 $\pm$ 0	0,79 $\pm$ 0,00*	232,0 $\pm$ 53,7
galna kiselina	24 $\pm$ 0	1,87 $\pm$ 0,47	185,8 $\pm$ 143,8	24 $\pm$ 0	2,50 $\pm$ 0,47	685,6 $\pm$ 26,7*

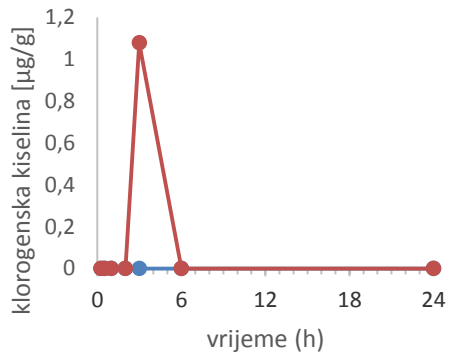
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO –kontrola, ECT –ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Farmakokinetika fenolnih kiselina u mozgu miša C57BL/6 prikazana je na Slici 36. Vremenska biodinamika uočena je i za fenolne kiseline između pokusne i kontrolne skupine. Razlike su utvrđene su za 4-*p*-kumaroil kininsku i galnu kiselinu čije su koncentracije bile više u odnosu na kontrolnu skupinu životinja. Osim navedenih kiselina, klorogenska kiselina bila je više koncentracije u prvih 6 sati akutne obrade.

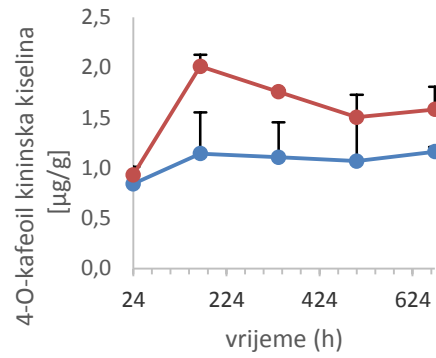


Slika 36. Farmakokinetika i koncentracije fenolnih kiselina: a) 4-*p*-kumaroil kininske, b) 3-*O*-kafeoil kininske, c) 4-*O*-kafeoil kininske, d) ferulinske, e) 3-*O*-feruloil kininske i f) galne kiseline u mozgu C57BL/6 miša nakon akutne i subkronične intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

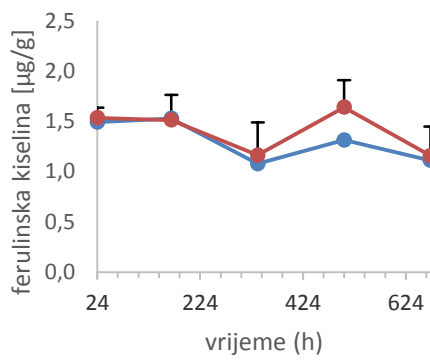
Slika 36. nastavak



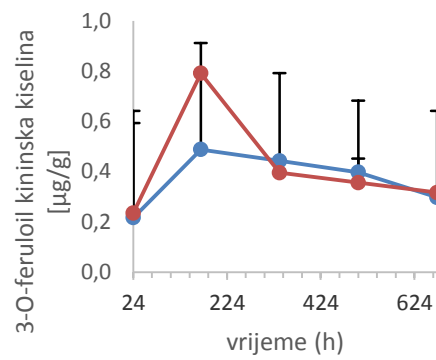
b) —●— CO —●— ECT



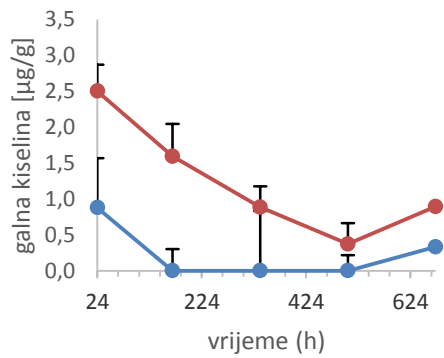
c) —●— CO —●— ECT



d) —●— CO —●— ECT



e) —●— CO —●— ECT



f) —●— CO —●— ECT

Nakon reakcija konjugacije (u tankom crijevu i jetri) metaboliti polifenola jednim dijelom budu apsorbirani u plazmu, te se biodistribuiraju u određena tkiva i organe, a zatim izlučuju putem bubrega u urin.

Nakon akutne obrade, u bubrezima pokusnih životinja je ukupno detektirano 25% ( $N=8/32$ ) polifenolnih spojeva, dok je nakon subkronične obrade detektirano 37,5% ( $N=12/32$ ) polifenolnih spojeva od ukupnog broja polifenolnih spojeva koje nalazimo u čistom ekstraktu cvijeta trnine.

Kod akutne obrade, statistički značajno različiti AUC i  $c_{max}$  u bubrezima, kod skupine ECT u odnosu na kontrolnu skupinu uočeni su za četiri spoja, dok je nakon subkronične obrade statistički značajno različit AUC i  $c_{max}$  kod skupine ECT u usporedbi s kontrolnom skupinom uočen za osam spojeva što čini 25% od ukupnih spojeva pronađenih u ekstraktu cvijeta trnine i 66,6% od ukupno detektiranih spojeva u bubrezima.

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u bubrezima pokusnih životinja nakon akutne i subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine prikazani su Tablici 32 i 33.

Tablica 32. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u bubrezima pokusnih životinja tijekom 24 sata intragastrične primjene (akutna doza) vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Metaboliti flavonola detektirani u bubrezima; akutna doza (0.-24. h) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)
kvercetin-3-rutinozid (rutin)	0,5±0,1	1,40±0,43	32,0±13,8	0,5±0,1	1,42±0,70	33,5±6,8
kvercetin-pentozil-heksozid	0,5±0,1	0,13±0,06	3,2±2,5	2±0,0	0,27±0,02*	3,3±1,2

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg tj.m. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO –kontrolna skupina, ECT –ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

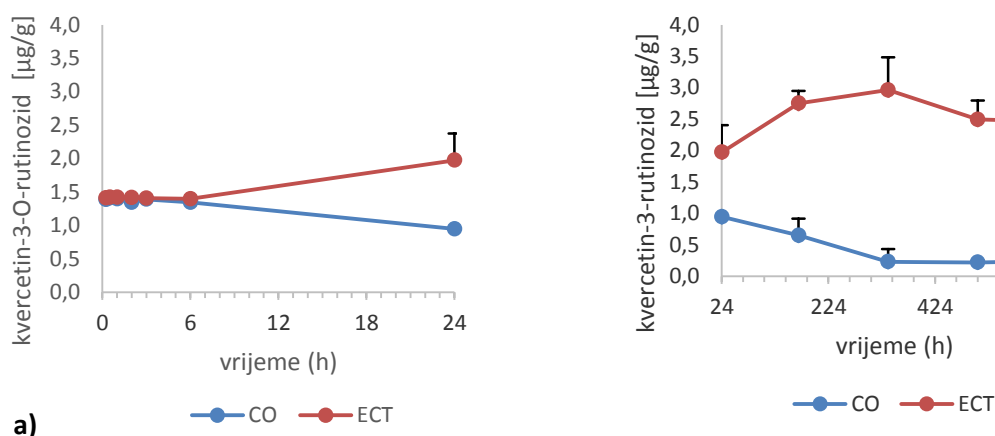


Tablica 33. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u bubrezima pokusnih životinja tijekom 28 dana intragastrične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Flavonoli detektirani u bubrezima; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)
kvercetin-ramnozid	24±0	1,35±0,02	609,0±12,7	24±0	1,46±0,00	699,5±1,0
kvercetin-pentozil-heksozid	24±0	0,13±0,00	86,8±1,2	24±8	0,41±0,00*	193,2±1,1*
kvercetin-3-O-rutinozid	168±19	0,65±0,35	240,1±100,8	336±0	2,96±0,02*	1764,0±6,7*
kvercetin-3-glukozid	168±83	0,15±0,00	85,1±1,0	24±0	0,20±0,00	121,0±0,6
kampferol-pentozid	24±0	2,77±0,02	1317,0±14,7	24±0	2,94±0,03	1381,1±12,5

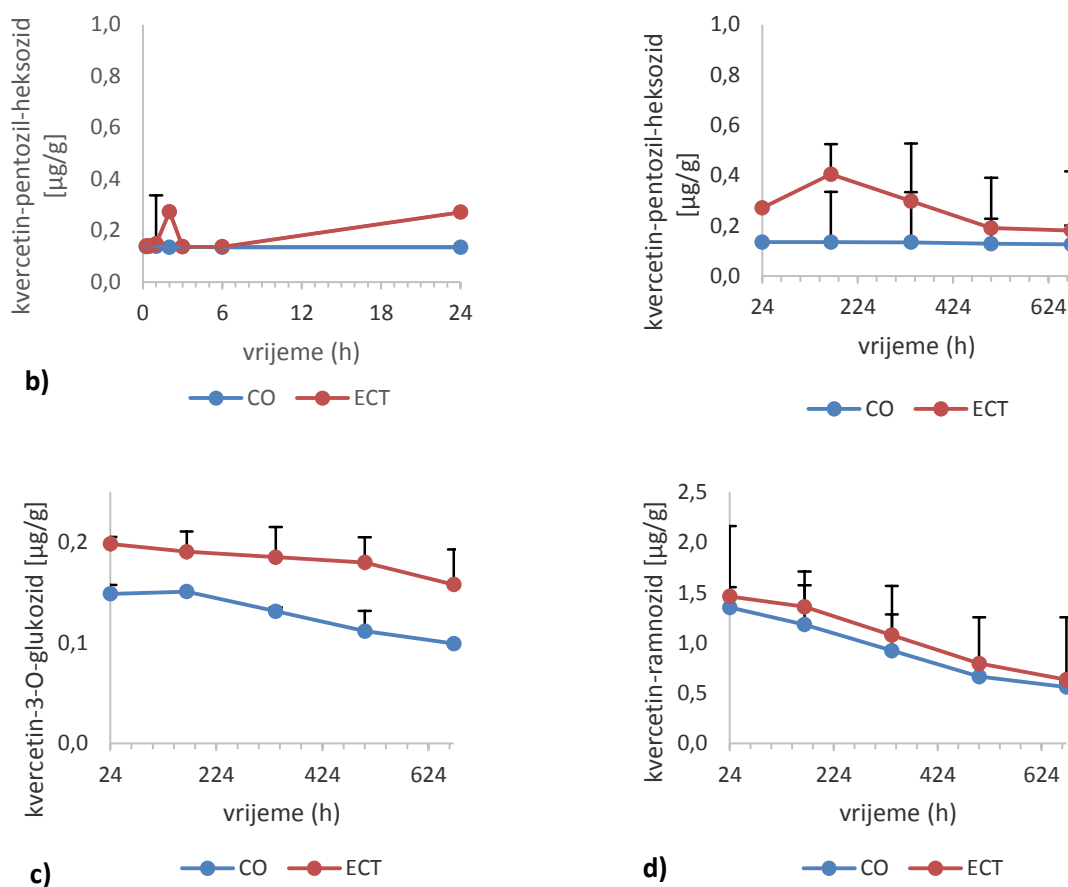
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO –kontrolna skupina, ECT –ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Farmakokinetika detektiranih metabolita kvercetina u bubrezima miša C57BL/6 prikazana je na slici 37. Među kvercetinским spojevima u bubrezima uočena je slična vremenska biodinamika kao i koncentracije koje su bile u vrlo niskom rasponu kako kod pokusne, tako i kontrolne skupine životinja za spojeve: kvercetin-3-O-glukozid, kvercetin-ramnozid, kvercetin-pentozil-heksozid. Istaknutiji kvercetinški spoj u skupini obrađenoj ekstraktom cvijeta trnine bio je kvercetin-3-O-rutinozid čija koncentracija od 1. do 28. dana obrade doseže relativno visoke koncentracije u odnosu na kontrolnu skupinu.

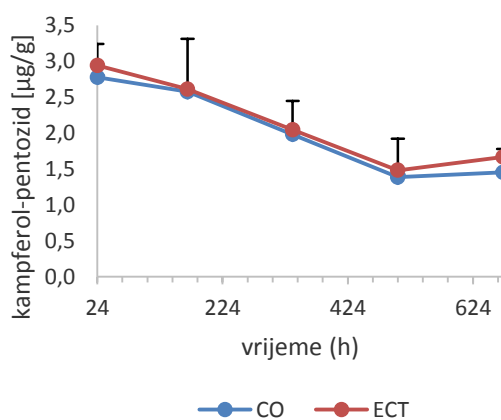


Slika 37. Farmakokinetika i koncentracije kvercetina: a) kvercetin-3-rutnozida, b) kvrecetin-pentozil-heksozida, c) kvrecetin-3-O-glukozida i d) kvercetin-ramnozida u bubrezima C57BL/6 miša nakon akutne i subkronične intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO –kontrola, ECT –ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 37. nastavak



Farmakokinetika detektiranih metabolita kampferola u bubrezima miša C57BL/6 prikazana je na Slici 38. Od kampferolnih spojeva je detektiran jedino kampferol-pentozid čija se relativno visoka koncentracija nakon 1. dana obrade smanjuje prema rasponu umjerenih koncentracija sve do 28. dana. Vremenska biodinamika kampferol-pentozida je slična između pokusne i kontrolne skupine životinja.



Slika 38. Farmakokinetika i koncentracije kampferol-pentozida u bubrezima C57BL/6 miša nakon subkronične intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u bubrezima pokusnih životinja nakon akutne i subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine prikazani su Tablici 34 i 35.

Tablica 34. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u bubrezima pokusnih životinja tijekom 24 sata intragastrične primjene (akutna doza) vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine flavona detektirani u bubrezima; akutna doza (0.-24. h) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC (h· $\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC (h· $\mu\text{g/g}$ )
Luteolin	-	<LOD	-	2±1,3	0,10±0,01*	0,1±0,0*
Apigenin	0,5±1,3	0,15±0,12	0,6±0,1	1±0,3	0,16±0,02	0,7±0,2

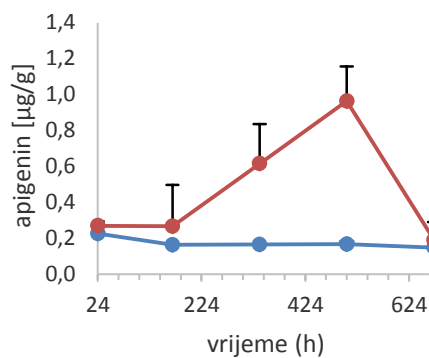
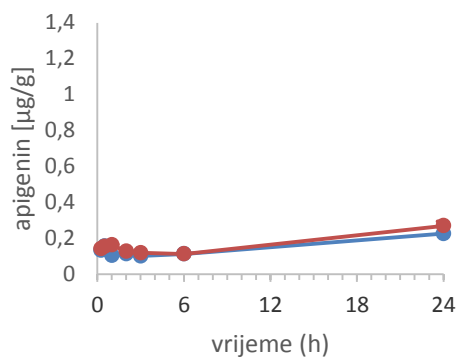
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg tj.m. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Kratice: CO –kontrolna skupina, ECT –ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, <LOD-ispod granice detekcije.

Tablica 35. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u bubrezima pokusnih životinja tijekom 28 dana intragastrične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine flavona detektirani u bubrezima; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC (h· $\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC (h· $\mu\text{g/g}$ )
Luteolin	672±0	0,13±0,15	11,3±3,5	24±0	0,52±0,19*	131,2±13,7*
Apigenin	24±0	0,45±0,01	128,2±1,0	504±0	0,96±0,02*	349,2±2,6*

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6).\*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Kratice: CO –kontrola, ECT –ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standadna devijacija.

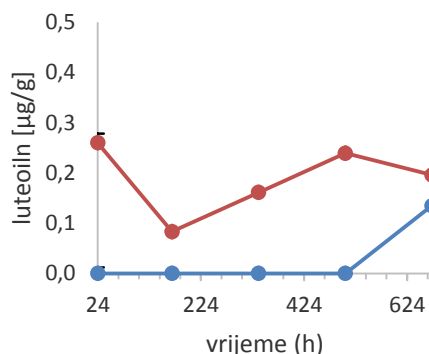
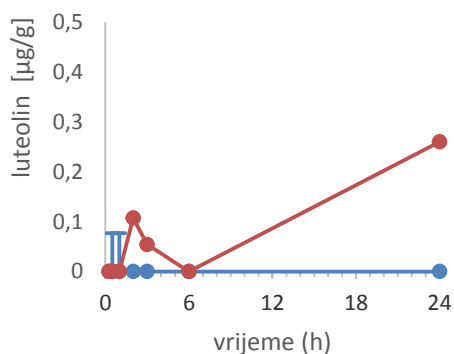
Farmakokinetika flavona u bubrezima miša C57BL/6 prikazana je na Slici 39. Za spojeve iz skupine flavona, apigenin i luteolin, uočena je slična biodinamika. Najveći porast koncentracije uočen u pokusnoj skupini životinja za spoj apigenin između 14. i 28. dana obrade.



a)

—●— CO —●— ECT

—●— CO —●— ECT



b)

—●— CO —●— ECT

—●— CO —●— ECT

Slika 39. Farmakokinetika i koncentracije flavona: a) apigenina, b) luteolina u bubrezima C57BL/6 miša nakon akutne i subkronične intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u bubrezima pokusnih životinja nakon akutne i subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine prikazani su Tablici 36 i 37.

Tablica 36. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u bubrezima pokusnih životinja tijekom 24 sata od intragastrične primjene (akutna doza) vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine flavan-3-ola detektirani u bubrezima; akutna doza (0.-24. h) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)
(+)-katehin	2±1,2	0,12±0,01	3,0±1,0	0,5±0,3	0,13±0,07	3,0±1,3
(-)-epigalokatehin-3-galat	1±0,85	0,30±0,15	7,1±3,8	3±1,7	8,96±5,15*	33,9±21,6*

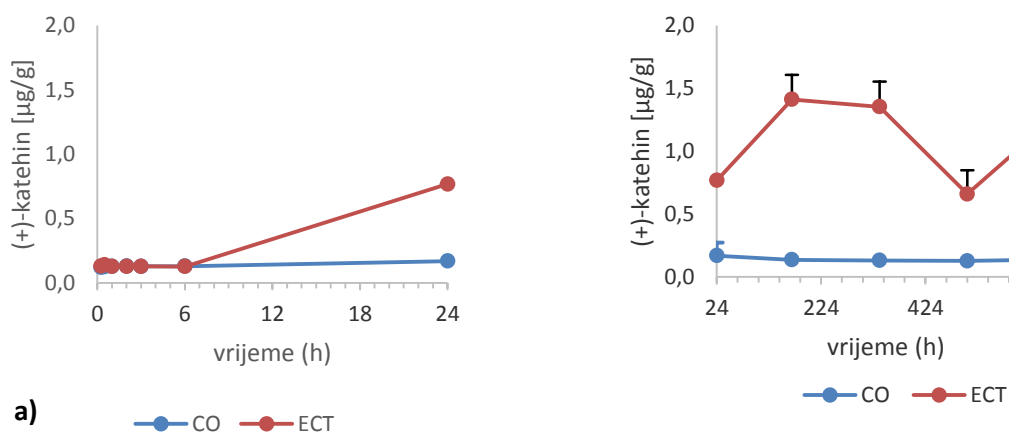
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg tj.m. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO –kontrola, ECT –ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Tablica 37. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u bubrezima pokusnih životinja tijekom 28 dana intragastrične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine flavan-3-ola detektirani u bubrezima; subkronična doza (1.-28.dan) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)
(+)-katehin	24±0	0,21±0,00	92,9±0,0	168±0	1,41±0,01*	776,2±1,4*
(-)-epikatehin	24±0	0,03±0,00	0,3±0,0	168±0	1,55±0,00*	848,4±0,4*
(-)-epigalokatehin-3-galat	24±0	0,83±0,00	514,9±0,0	24±0	0,91±0,00	589,1±0,0

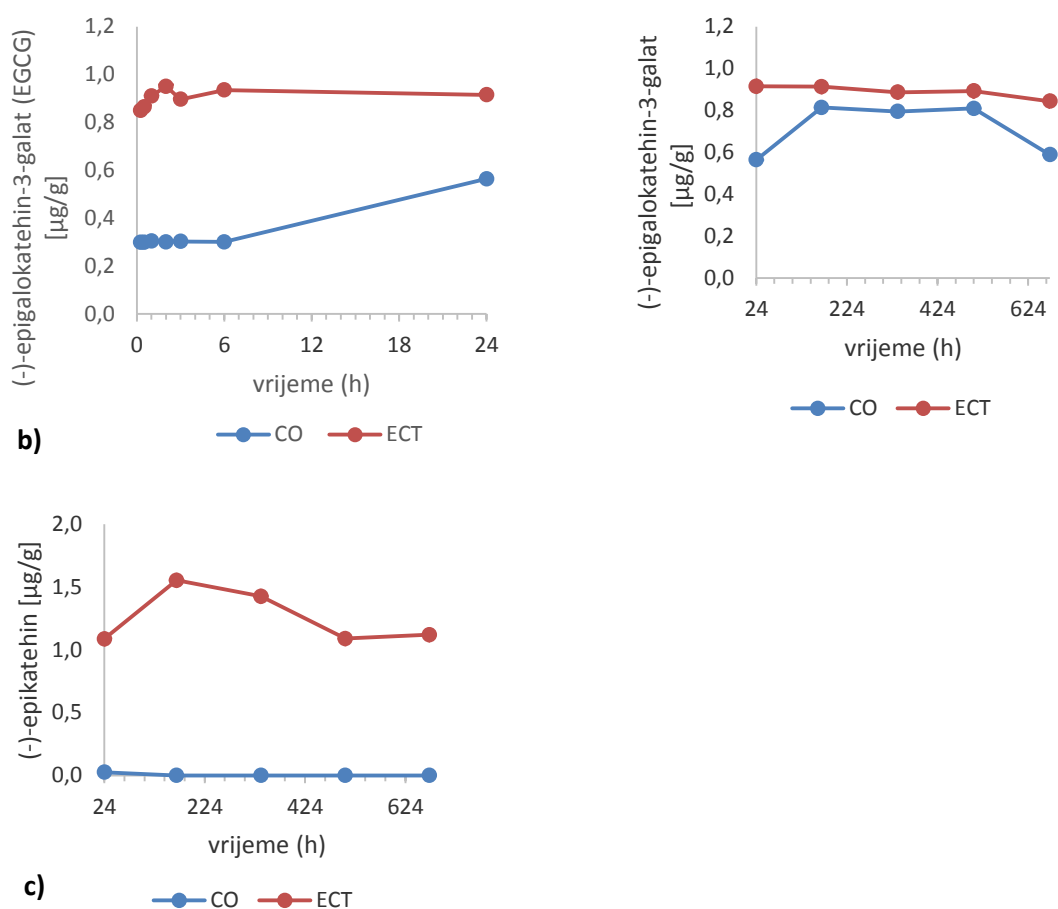
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SD$ . Kratice: CO –kontrola, ECT –ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Prema slici 40, od flavan-3-ola, (-)-epigalokatehin-3-galat i (-)-epikatehin bili su najistaknutiji katehinski spojevi pokusnih skupina čija se koncentracija za razliku od vrlo niske koncentracije u kontrolnoj skupini kretala u umjerenom koncentracijskom rasponu. Osim navedena dva spoja detektiran je i (+)-katehin čija je biodinamika u pokusnoj skupini slična biodinamici kontrolne skupine, nakon čega mu koncentracija u prvih 6 h u pokusnoj skupini doseže neravnomjerno povećanje za razliku od kontrolne skupine životinja.



Slika 40. Farmakokinetika i koncentracije flavan-3-ola: a) (+)-katehina, b) (-)-epigalokatehin-3-galata i c) (-)-epikatehina u bubrezima C57BL/6 miša nakon akutne i subkronične intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SD$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 40. nastavak



UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u bubrezima pokusnih životinja nakon akutne i subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine prikazani su Tablici 38 i 39.

Tablica 38. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u bubrezima pokusnih životinja tijekom 24 sata od intragastrične primjene (akutna doza) vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine fenolnih kiselina detektirane u bubrezima; akutna doza (0.-24. h) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)
4- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	0,5±0,1	0,30±0,17	7,1±0,21	2±1,2	0,95±0,61*	22,0±9,9*
ferulinska kiselina	1±0,2	1,28±0,38	25,5±10,5	1±0,0	1,74±0,90	27,3±14,3

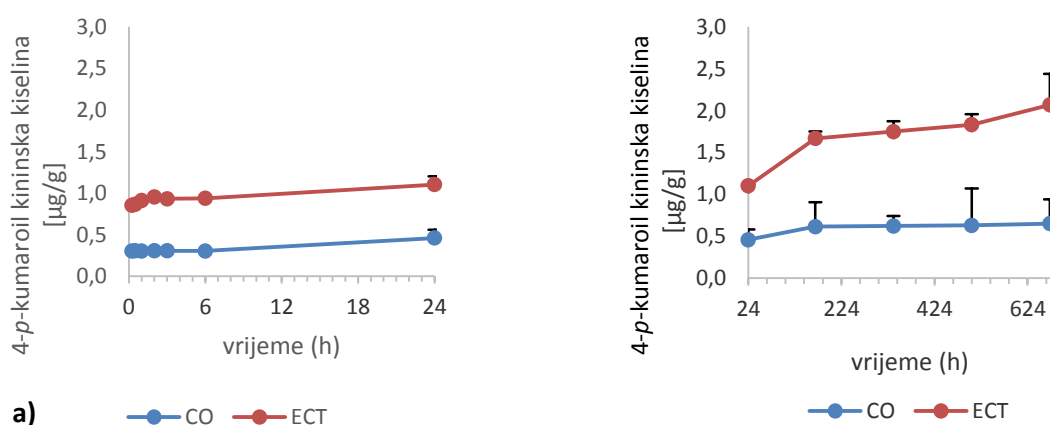
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg tj.m. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO –kontrolna skupina, ECT –ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Tablica 39. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u bubrezima pokusnih životinja tijekom 28 dana intragastrične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine

Spojevi iz skupine fenolnih kiselina detektirane u bubrezima; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina					
	Kontrolna skupina (CO)			Skupina obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT)		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)
4- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	672±291	0,65±0,003	412,3±11,1	672±0	2,07±0,04*	1143,1±2,6*
ferulinska kiselina	504±277	0,84±0,56	261,6±212,79	504±0	5,45±0,00*	1354,5±0,3*

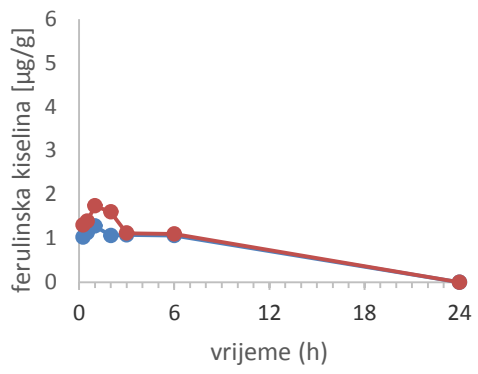
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO –kontrolna skupina, ECT –ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Farmakokinetika detektiranih fenolnih kiselina u bubrezima miša C57BL/6 prikazana je na slici 41. Od fenolnih kiselina, u bubregu su detektirane 4-*p*-kumaroil kininska i ferulinska kiselina. U prvih 24 h neposredno nakon obrade uočena je slična vremenska dinamika bioapsorpcije za obje fenolne kiseline u niskom koncentracijskom rasponu, kako kod skupine životinja obrađene ekstraktom cvijeta trnine tako i kod kontrolne skupine. Od 1. do 28. dana obrade uočen je porast koncentracije ferulinske kiseline u umjerenom rasponu koncentracija, dok koncentracija kod kontrolne skupine ostaje ista kako i prva 24 h. Istaknutija razlika u koncentraciji između pokusne i kontrolne skupine uočena je za ferulinsku kiselinu i to u pokusnoj skupini koja između 14. i 21. dana doseže relativno visoke koncentracije nakon čega joj se koncentracija do 28. dana smanjuje.

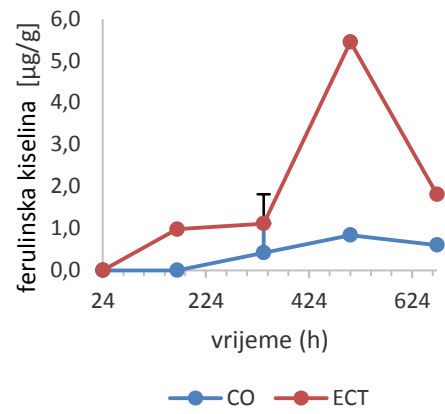


Slika 41. Farmakokinetika i koncentracije fenolnih kiselina: a) 4-*p*-kumaroil kininske, b) ferulinske kiseline u bubrezima C57BL/6 miša nakon akutne i subkronične intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO –kontrola; ECT –ekstrakt cvijeta trnine, SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 41. nastavak



b) —●— CO —●— ECT



—●— CO —●— ECT



### **4.3. UTJECAJ RAZLIČITIH VRSTA PREHRANE NA BIORASPOLOŽIVOST POLIFENOLA TRNINE**

#### **4.3.1. UPLC analiza selektivne bioraspodjele apsorbiranih polifenolnih spojeva iz ekstrakta cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima u tankom crijevu, jetri, mozgu i bubregu C57BL/6 miša**

Nakon subkroničnog doziranja ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke (1.-28. dana), u tankom crijevu je ukupno detektirano 25 polifenolnih spojeva što čini 78,12% od ukupnog broja polifenolnih spojeva koje nalazimo u vodenom ekstraktu cvijeta trnine. Statistički značajno različit AUC i  $c_{max}$  u tankom crijevu nakon subkronične obrade, uočen je za 12 polifenolnih spojeva kod skupine ECT+P u odnosu na skupinu ECT što čini 37,5% od ukupnih spojeva pronađenih u ekstraktu cvijeta trnine i 48% od ukupno detektiranih spojeva u tankom crijevu.

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u tankom crijevu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke prikazani su u Tablici 40.

Tablica 40. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u tankom crijevu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima tijekom 28 dana

Flavonoli detektirani u tankom crijevu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			P			ECT+P		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)
izoramnetin-3-rutinozid	24±2	0,39±0,01	252,9±1,5	24±0	0,43±0,25	273,2±4,5	504±0	0,41±0,00	263,9±0,0	24±0	0,41±0,00	263,1±0,0
kvercetin-3-glukozid	168±0	0,17±0,00	63,9±10,2	504±19	0,56±0,05*	151,0±125,5*	168±0	0,55±0,00	115,1±1,1	336±0	0,38±0,00	88,9±0,5
kvercetin-3-rutinozid (rutin)	168±0	0,78±0,00	270,3±4,3	24±3	1,73±0,21*	952,0±120,8*	24±8	1,36±0,00	546,2±1,0	24±2	1,40±0,03	909,1±114,6
kvercetin-acetil-heksozid	672±291	0,52±0,01	219,2±23,8	672±0	0,67±0,39	429,9±0,9*	504±0	0,54±0,00	305±0,	168±0	0,56±0,00	352,4±0,0
kvercetin-pentozid	168±83	1,37±0,07	654,5±19,2	24±0	1,94±1,03	814,6±8,0	504±0	0,14±0,00	93,5±1,1	336±0	0,14±0,00 <sup>▲</sup>	93,6±5,2 <sup>▲</sup>
kvercetin-pentozil-heksozid	24±8	0,34±0,01	152,3±13,9	24±0	0,45±0,04	179,9±10,2	672±0	0,30±0,00	126,7±0,5	336±0	0,35±0,04	153,5±125,4
kvercetin-ramnozid	336±83	0,96±0,10	387,7±11,8	24±8	1,68±0,95*	723,7±17,3*	672±0	1,68±0,00	235,2±1,2	672±97	1,52±0,70	213,2±131,2 <sup>▲</sup>
kampferol-3-glukozid	168±83	0,16±0,00	93,5±2,1	168±0	0,30±0,17*	146,1±3,8*	672±0	0,22±0,00	89,0±0,0	336±0	0,16±0,00	87,6±0,0
kampferol-3-rutinozid	168±0	0,24±0,00	116,3±3,2	168±83	0,28±0,16	132,1±1,2	-	<LOD	-	-	<LOD <sup>▲</sup>	-
kampferol-pentozid	168±0	2,75±0,00	1344,3±6,0	24±0	5,29±2,91*	1559,4±74,7	672±0	2,55±0,00	1282,6±0,0	168±0	2,10±0,00 <sup>▲</sup>	1071,4±0,0
kampferol-3-O-ramnozid	168±0	0,00±0,00	0,0±0,0	672±0	0,06±0,00	9,9±0,0*	-	<LOD	-	24±0	0,25±0,00 <sup>▲</sup>	0,0±0,0 <sup>▲</sup>
kampferol-ramnozil-heksozid	24±8	0,69±0,02	334,8±4,9	24±0	0,84±0,49	384,6±3,5	672±0	0,68±0,00	300,1±0,0	336±0	0,54±0,00	286,7±0,0
kampferol-acetil-heksozid	504±0	0,04±0,01	13,3±4,7	672±37	0,06±0,05	7,6±2,7	24±0	0,04±0,00	16,3±0,0	672±0	0,06±0,00	24,7±0,0 <sup>▲</sup>
kampferol-pentozil-heksozid	168±83	0,51±0,01	260,6±13,9	24±0	0,85±0,45*	329,4±10,2	672±0	0,51±0,00	242,4±0,0	336±0	0,55±0,00	266,2±0,0

<sup>a</sup> Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i proteinima sirutke u dozi od 700 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SD$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

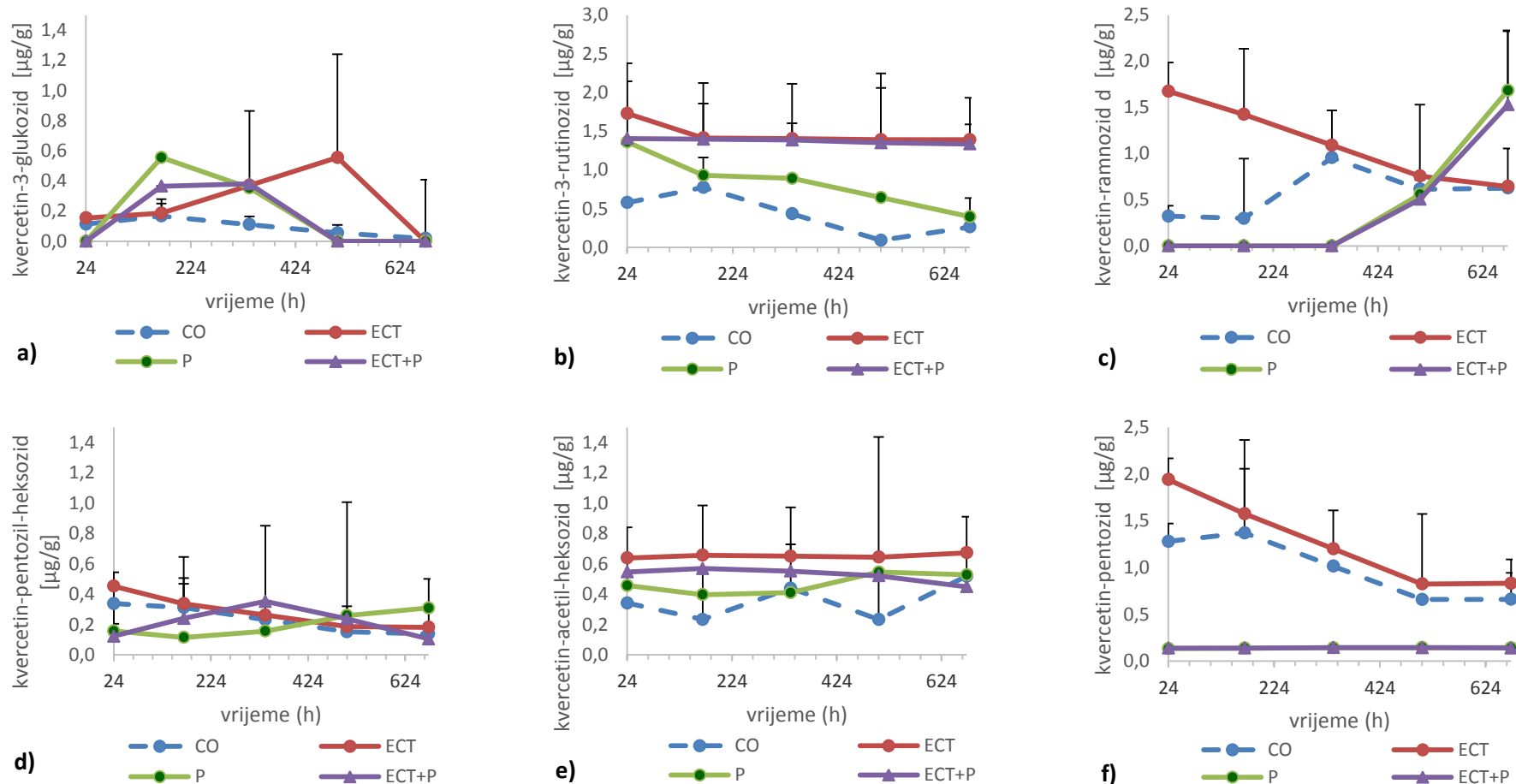
Farmakokinetika detektiranih spojeva kvercetina u tankom crijevu miša C57BL/6 prikazana je na Slici 42. Od kvercetinskih spojeva, u tankom crijevu kod skupine obrađene s ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima (ECT+P) najveća koncentracija tijekom cijelog trajanja obrade kao i kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine (ECT) uočena je za spoj kvercetin-3-rutinozid. Za spoj kvercetin-ramnozid kod skupine ECT+P do 14. dana obrade je koncentracija jednaka nuli, nakon čega do 28. obrade dostiže relativno visoke koncentracije, dok se u istom vremenskom periodu kod skupine ECT koncentracija kvercetin-ramnozida smanjuje.

Najveća razlika u koncentraciji između skupina ECT i ECT+P utvrđena je za spoj kvercetin-pentozid koji se kod skupine ECT+P tijekom cijelog trajanja obrade kretao u vrlo niskim koncentracijama. Biodinamika kvercetin-acetil-heksozida i kvercetin-3-glukozida je slična kod skupina ECT i ECT+P, a njihove se koncentracije kreću u relativno niskom koncentracijskom području. Koncentracija kvercetin-pentozil-heksozida u skupini ECT+P za razliku od skupine ECT do 14. dana raste nakon čega se njegova koncentracija kao i u skupini ECT smanjuje prema vrlo niskim vrijednostima koncentracija.

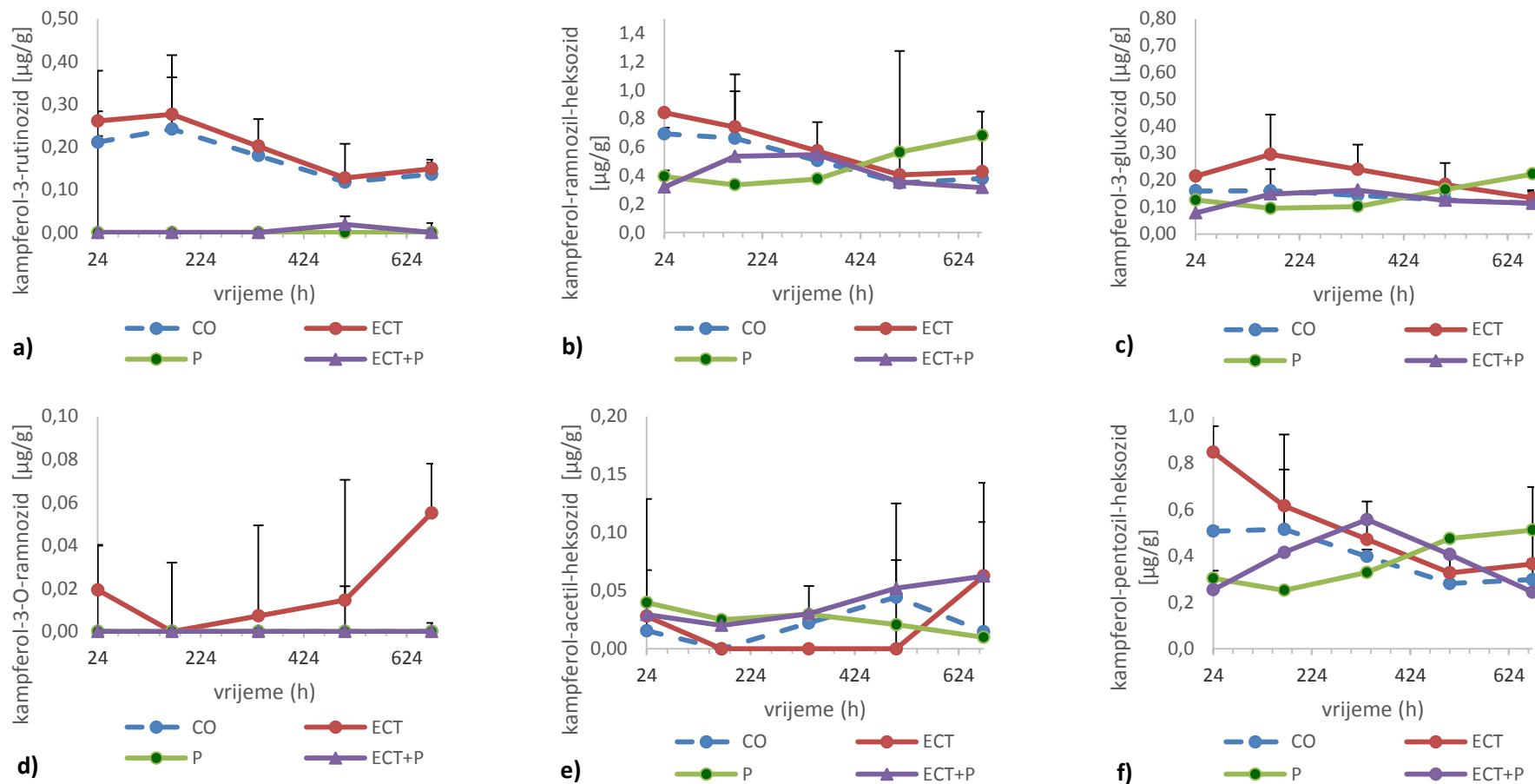
Farmakokinetika detektiranih spojeva kampferola u tankom crijevu miša C57BL/6 prikazana je na Slici 43.

Među kampferolnim spojevima, iako manja u odnosu na skupinu ECT, relativno visoka koncentracija utvrđena je za spoj kampferol-pentozid kod skupine ECT+P, do 14. dana obrade, nakon čega se njegova koncentracija smanjuje. Slična biodinamika u znatno nižim umjerenijim koncentracijama uočena je i za spoj kampferol-ramnozil-heksozid, te kampferol-3-glukozid.

Za spojeve kampferol-3-*O*-ramnozid, kampferol-acetil-heksozid, kampferol-pentozil-heksozid utvrđena je slična biodinamika u vrlo niskim koncentracijama kako u skupini obrađenoj ekstraktom cvijeta trnine, tako i u skupini obrađenoj ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima. Gotovo jednaka biodinamika kretanja koncentracija utvrđena je i za spoj izoramnetin-3-rutinozid, ali u višim koncentracijama u odnosu na navedena tri prethodna metabolita kampferola. Najveća razlika u koncentraciji, utvrđena je za spoj kampferol-3-rutinozid, gdje se kod skupine ECT koncentracija kampferol-3-rutinozida kretala u većim koncentracijama u odnosu na skupinu ECT+P tijekom cijelog trajanja obrade.

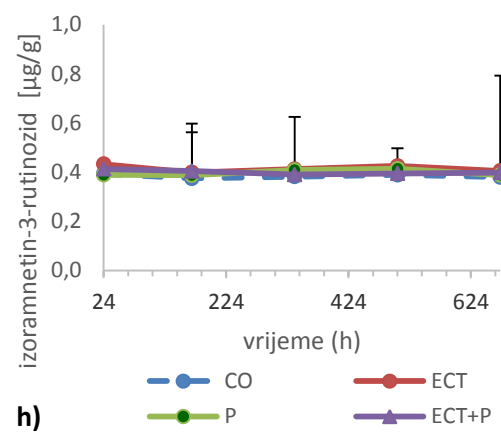
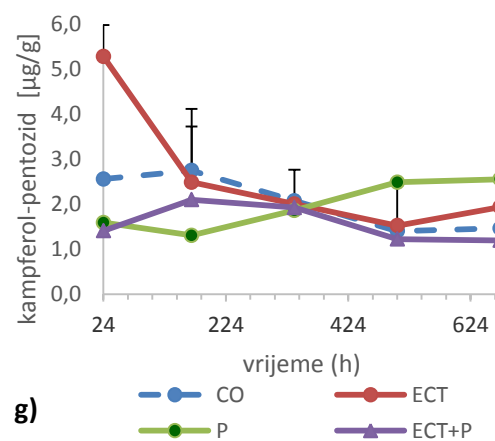


Slika 42. Farmakokinetika i koncentracije spojeva kvercetina: a) kvercetin-3-glukozida, b) kvercetin-3-rutinozida, c) kvercetin-ramnozida, d) kvercetin-pentozil-heksozida, e) kvercetin-acetil-heksozida, f) kvercetin-pentozida u tankom crijevu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i proteina sirutke (700 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.



Slika 43. Farmakokinetika i koncentracije kampferola: a) kampferol-3-rutinozida, b) kampferol-ramnozil-heksozida, c) kampferol-3-glukozida, d) kampferol-3-O-ramnozida, e) kampferol-acetil-heksozida, f) kampferol-pentozil-heksozida, g) kampferol-pentozida i h) izoramnetin-3-rutinozida u tankom crijevu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i proteina sirutke (700 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 43. nastavak



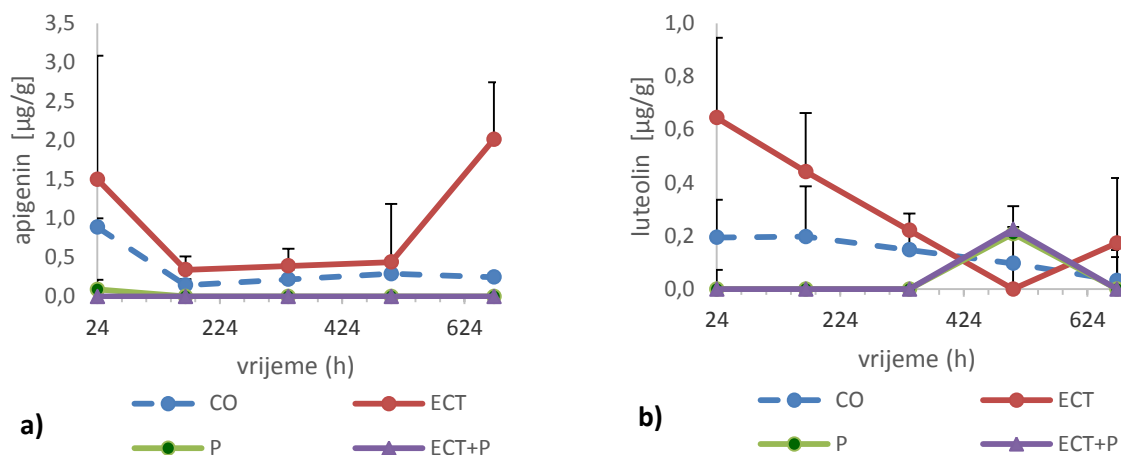
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona unutar tankog crijeva pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke prikazani su u Tablici 41.

Tablica 41. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u tankom crijevu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavona detektirani u tankom crijevu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			P			ECT+P		
	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)
Apigenin	24±0	0,89±0,14	188,3±17,8	24±3	2,50±0,25*	523,9±72,5*	24±14	0,08±0,01	1,1±0,74	-	<LOD <sup>▲</sup>	-
Luteolin	168±83	0,20±0,10	89,5±19,2	24±3	0,64±0,28*	171,8±30,6*	504±0	0,20±0,00	17,5±0,2	504±388	0,22±0,02 <sup>▲</sup>	18,8±2,0 <sup>▲</sup>

<sup>a</sup> Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i proteinima sirutke u dozi od 700 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Analizirajući farmakokinetiku apigenina i luteolina između skupina ECT+P i ECT, uočeno je da koncentracija apigenina u skupini ECT+P kroz cijeli tretman iznosi nula, dok luteolin najveću vrijednost koja se kretala u vrlo niskom koncentracijskom rasponu u skupini ECT+P doseže nakon 21. dana obrade u odnosu na skupinu ECT (Slika 44).



Slika 44. Farmakokinetika i koncentracije flavona: a) apigenina, b) luteolina u ovisnosti o vremenu u tankom crijevu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i proteina sirutke (700 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u tankom crijeva pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke prikazani su u Tablici 42.

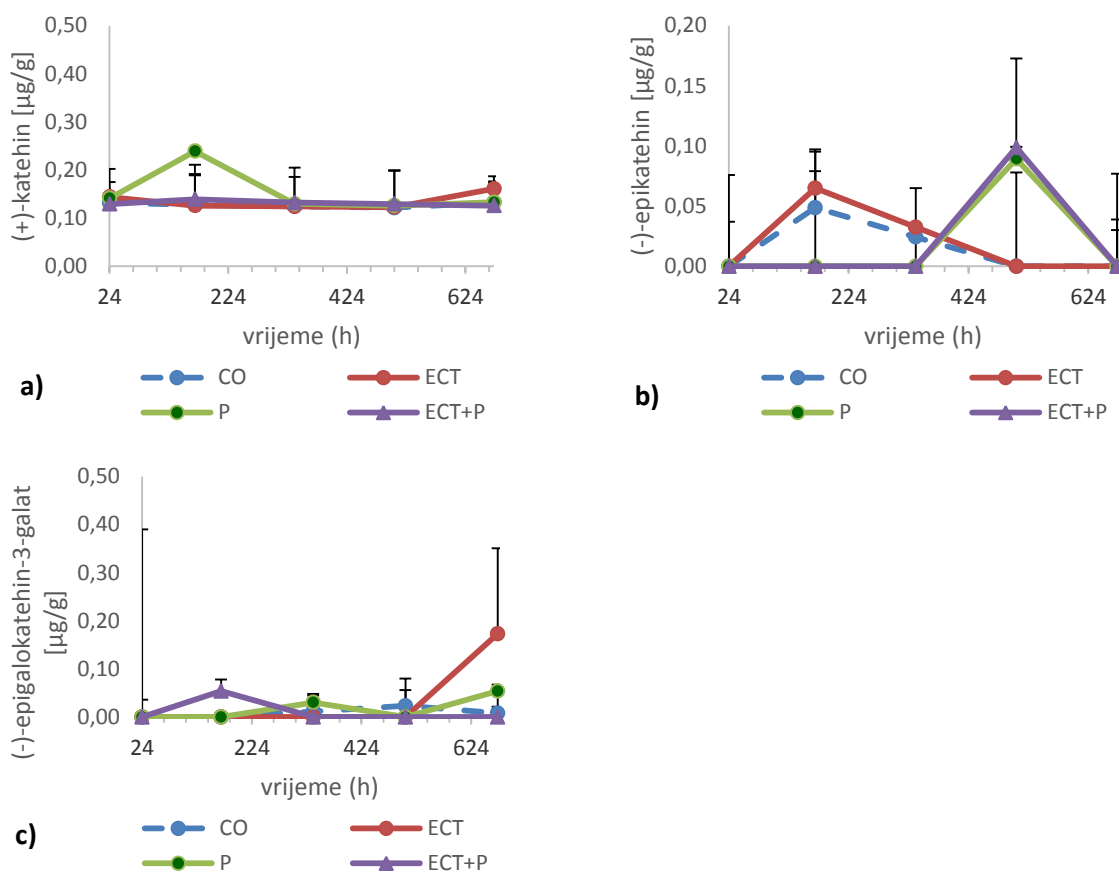


Tablica 42. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u tankom crijevu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavan-3-ola detektirani u tankom crijevu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			P			ECT+P		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
(+)-katehin	672 $\pm$ 374	0,13 $\pm$ 0,00	83,5 $\pm$ 0,5	672 $\pm$ 0	0,16 $\pm$ 0,09	86,8 $\pm$ 1,5	168 $\pm$ 0	0,23 $\pm$ 0,00	102,3 $\pm$ 0,2	168 $\pm$ 83	0,13 $\pm$ 0,00	87,2 $\pm$ 11,2
(-)-epikatehin	168 $\pm$ 97	0,05 $\pm$ 0,04	9,4 $\pm$ 1,1	168 $\pm$ 0	0,06 $\pm$ 0,03	12,5 $\pm$ 0,0	504 $\pm$ 0	0,08 $\pm$ 0,00	7,5 $\pm$ 0,2	504 $\pm$ 83	0,09 $\pm$ 0,03	8,3 $\pm$ 1,5
(-)-epigalokatehin-3-galat	504 $\pm$ 291	0,02 $\pm$ 0,00	6,3 $\pm$ 0,8	672 $\pm$ 0	0,17 $\pm$ 0,02*	14,5 $\pm$ 13,9*	672 $\pm$ 0	0,05 $\pm$ 0,00	9,6 $\pm$ 0,1	168 $\pm$ 0	0,05 $\pm$ 0,01 <sup>▲</sup>	3,9 $\pm$ 1,3 <sup>▲</sup>

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i proteinima sirutke u dozi od 700 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SD$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Vrijednosti koncentracija katehinske skupine molekula se kretala u vrlo niskom rasponu koncentracija, kako kod skupine ECT, tako i u skupini ECT+P. Za spoj (+)-katehin utvrđena je slična dinamika kretanja koncentracija kod obje skupine, dok spoj (-)-epigalokatehin-3-galat kod skupine ECT+P bilježi blagi porast koncentracije od 1. do 14. dana obrade, a (-)-epikatehin od 21. do 28. dana obrade nakon čega im se koncentracija smanjuje do nule (Slika 45).



Slika 45. Farmakokinetika i koncentracije flavan-3-ola: a) (+)-katehina, b) (-)-epikatehina i c) (-)-epigalokatehin-3-galata u tankom crijevu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i proteina sirutke (700 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u tankom crijevu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke prikazani su u Tablici 43.

Tablica 43. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u tankom crijevu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima tijekom 28 dana

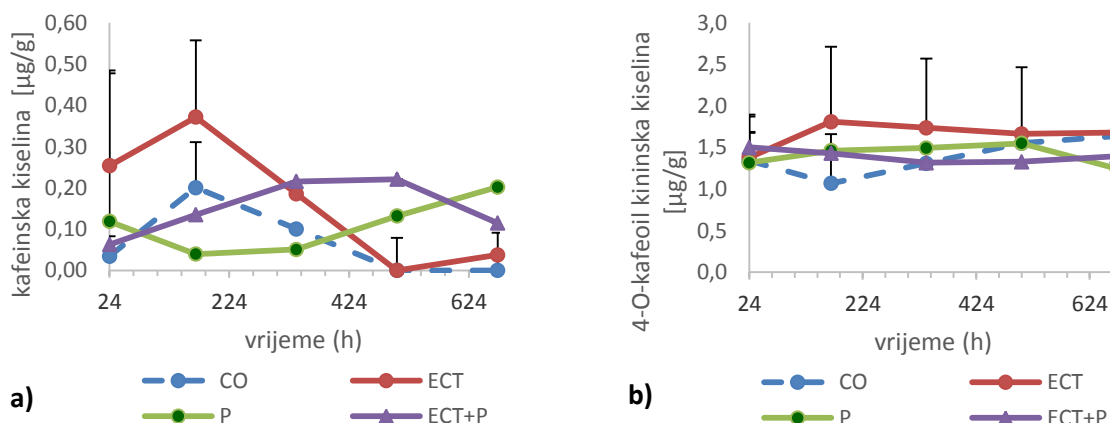
Spojevi iz skupine fenolnih kiselina detektiranih u tankom crijevu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			P			ECT+P		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)
3- <i>O</i> -feruloil kininska kiselina	168±83	0,62±0,13	211,9±37,3	168±37	4,61±0,42*	768,4±6,3*	672±0	0,44±0,00	155,6±0,0	336±0	1,40±0,00 <sup>▲</sup>	471,7±0
3- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	24±8	0,00±0,05	0,0±16,2	168±14	0,20±0,02	71,8±14,4*	24±0	0,05±0,00	22,4±0,0	336±0	0,28±0,00	81,5±0,0
4- <i>O</i> -kafeoil kininska kiselina	672±374	1,64±0,10	896,5±83,2	168±34	1,81±1,17	1110,1±25,4	504±0	1,54±0,00	953,5±0,0	24±0	1,50±0,00	910,6±0,0
4- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	24±0	1,22±0,05	627,7±4,2	504±97	2,16±1,27*	1095,0±27,8*	168±0	0,95±0,00	623,6±4,0	168±0	0,93±0,00 <sup>▲</sup>	570±160,7 <sup>▲</sup>
kafeinska kiselina	168±0	0,20±0,05	41,6±17,4	168±0	0,37±0,21*	111,8±13,9*	672±0	0,20±0,00	62,7±0,0	504±0	0,22±0,00	108,2±0,0
ferulinska kiselina	504±0	1,04±0,30	368,3±61,5	24±2	1,68±0,95*	740,9±9,7*	504±0	1,57±0,00	823,5±1,2	672±374	1,54±0,22	847,4±113,8
galna kiselina	24±0	1,28±0,67	215,1±96,7	168±0	2,21±1,27*	575,2±12,6*	672±0	0,63±0,00	183,6±0,0	336±0	0,42±0,00 <sup>▲</sup>	191,6±0,0 <sup>▲</sup>
<i>p</i> -kumarinska kiselina	504±277	0,48±0,14	186,7±37,4	24±0	1,67±0,94*	444,9±6,3*	24±0	0,57±0,00	302±0,0	504±0	1,22±0,00	567,6±0,0

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i proteinima sirutke u dozi od 700 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Farmakokinetika detektiranih fenolnih kiselina u tankom crijevu miša C57BL/6 prikazana je na Slici 46.

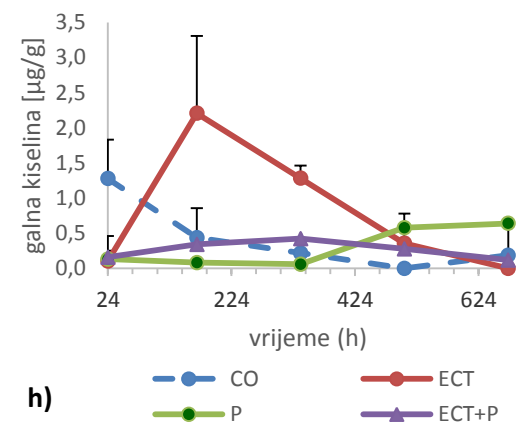
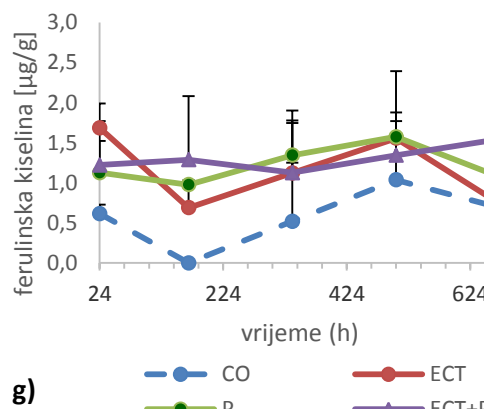
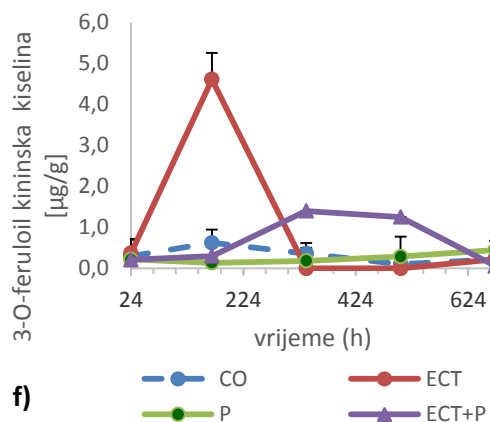
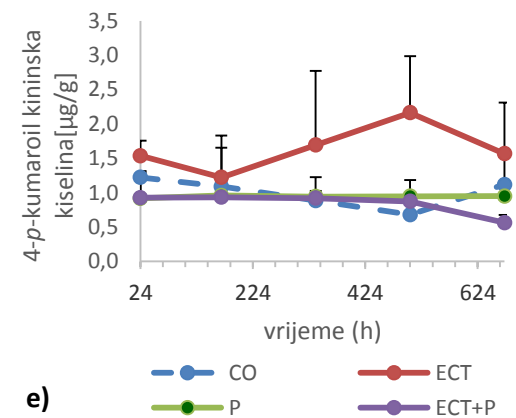
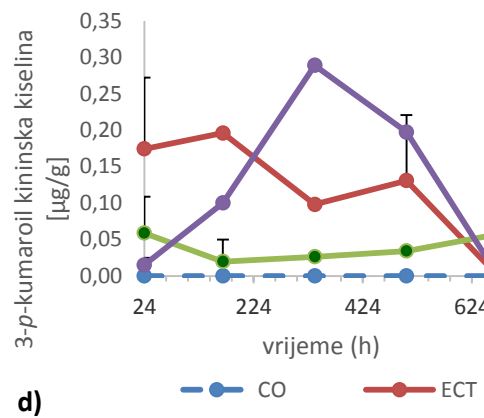
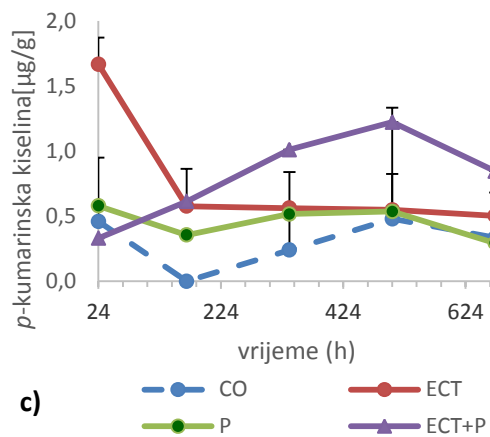
Između skupinu ECT i ECT+P, za kafeinsku i 3-*p*-kumaroil kininsku kiselinu utvrđena je slična biodinamika kroz svih 28. dana obrade. Slična biodinamika, iako veće koncentracije u odnosu na prethodne dvije kiseline, a manje u odnosu na skupinu ECT, utvrđena je kod skupine ECT+P za 4-kafeoil kininsku, 4-*p*-kumaroil kininsku i galnu kiselinu.

Nešto drugačija biodinamika uočena je za *p*-kumarinsku i 3-*O*-feruloil kininsku kiselinu. Koncentracija *p*-kumarinske kiseline u skupini ECT+P doseže svoj maksimum većih koncentracija u odnosu na skupinu ECT tek između 14. i 21. dana obrade, za razliku od skupine ECT čija se najveća koncentracija uočena 1. dana smanjuje, te zadržava približno jednaku vrijednost koncentracija sve do 28. dana obrade. Slične vrijednosti biodinamike u skupinu ECT+P utvrđene su i za ferulinsku kiselinu. Kod 3-*O*-feruloil kininska kiseline istaknutije koncentracije u skupini ECT+P uočene su nakon 14. i 21 dana obrade za razliku od skupine ECT koja relativno visoke vrijednosti postiže između 1. i 7. dana obrade.



Slika 46. Farmakokinetika i koncentracije fenolnih kiselina: a) kafeinske, b) 4-*O*-kafeoil kininske, c) *p*-kumarinske, d) 3-*p*-kumaroil kininske, e) 4-*p*-kumaroil kininske, f) 3-*O*-feruloil kininske, g) ferulinske i h) galne kiseline u tankom crijevu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i proteina sirutke (700 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija.

Slika 46. nastavak



Nakon subkroničnog doziranja ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke, u jetri je ukupno detektrano 26 polifenolnih spojeva što čini 81,25% od ukupnog broja polifenolnih spojeva koje nalazimo u vodenom ekstraktu cvijeta trnine. Statistički značajno različit AUC i  $c_{\max}$  u jetri, uočen je za 10 polifenolnih spojeva kod skupine ECT+P u odnosu na skupinu ECT što čini 31,25% od ukupnih spojeva pronađenih u ekstraktu cvijeta trnine i 38,46% od ukupno detektiranih spojeva u jetri.

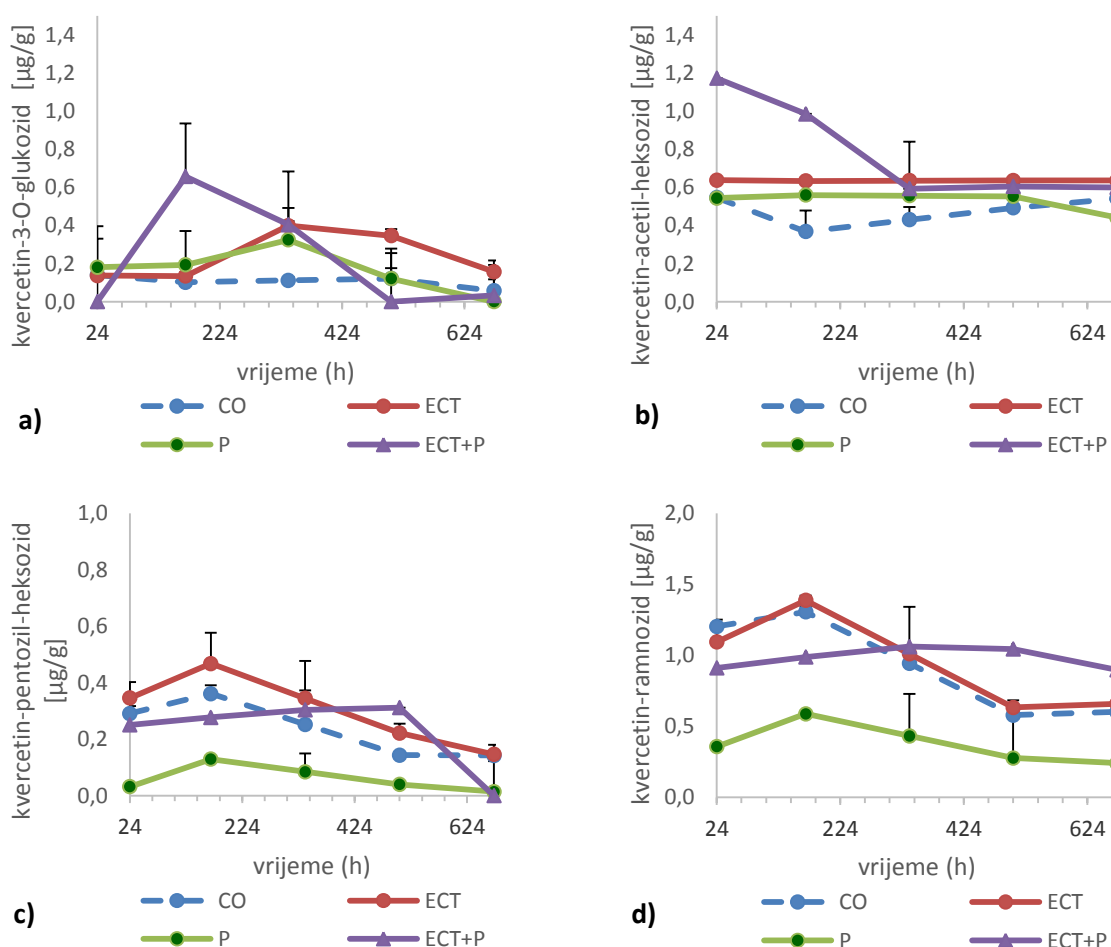
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u jetri pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke prikazani su u Tablici 44.

Tablica 44. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u jetri kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima tijekom 28 dana

Flavonoli detektirani u jetri; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			P			ECT+P		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)
izoramnetin-3-rutinozid	168±29	0,39±0,00	248,0±1,2	168±83	0,41±0,00	265,4±0,2	672±356	0,43±0,00	268,7±0,0	504±0	0,40±0,02	266,9±0,0
kvercertin-3-O-glukozid	24±0	0,14±0,09	70,6±0,8	24±0	0,14±0,09	70,6±0,8	336±0	0,32±0,35	107,2±0,0	168±0	0,65±0,02	171,4±0,0
kvercetin-3-O-rutinozid (rutin)	336±83	1,55±0,32	715,1±78,9	336±83	2,57±0,03*	1113,1±0,6*	168±0	1,51±0,04	777,9±6,6	168±0	1,79±0,04	845,1±24,8
kvercetin-acetil-heksozid	24±3	0,55±0,00	302,8±2,5	24±3	0,64±0,00	419,2±0,2	168±0	0,55±0,00	355,7±0,0	24±0	1,17±0,04	500,5±0,0
kvercetin-pentozid	168±0	0,13±0,00	84,2±1,1	168±83	1,44±0,02*	670,0±1,6*	168±0	0,14±0,00	94,5±0,0	336±37,2	0,14±0,11 <sup>▲</sup>	92,7±0,7 <sup>▲</sup>
kvercetin-pentozil-heksozid	168±0	0,36±0,02	157,7±0,8	168±0	0,47±0,06	207,5±0,2	168±0	0,12±0,00	43,6±0,0	504±0	0,31±0,02	141,5±0,0
kvercetin-ramnozid	168±0	1,31±0,01	606,7±1,6	168±0	1,39±0,01	635,4±1,0	168±0	0,58±0,00	259,3±0,0	336±0	1,06±0,08	659,3±0,2
kampferol-3-glukozid	24±0	0,16±0,00	71,6±0,4	168±0	0,26±0,01	108,3±0,3	24±0	0,06±0,00	17,6±0,0	336±0	0,15±0,1	71,6±0,2
kampferol-3-rutinozid	24±8	0,23±0,01	114,9±0,8	168±0	0,29±0,00*	140,8±0,1*	672±0	0,04±0,00	3,7±2,9	336±29	0,06±0,01 <sup>▲</sup>	25,4±6,9 <sup>▲</sup>
kampferol-pentozid	168±0	2,60±0,00	1243,4±1,1	168±0	2,69±0,00	1382,3±1,0	168±0	2,58±0,00	1230,1±0,0	336±0	2,67±0,14	1416,4±0,0
kampferol-3-O-ramnozid	168±34	0,03±0,00	8,0±1,1	168±0	0,12±0,02*	26,2±0,5*	-	<LOD	-	336±0	0,03±0,00 <sup>▲</sup>	11,8±2,4 <sup>▲</sup>
kampferol-ramnozil-heksozid	168±83	0,70±0,02	330,5±1,5	168±0	0,80±0,00	374,2±0,59	168±0	0,26±0,01	134,9±0,5	336±290	0,62±0,04	392,8±0,8
kampferol-acetil-heksozid	168±96	0,02±0,00	4,1±0,8	168±0	0,07±0,00*	13,4±0,0*	504±0	0,13±0,00	44,8±0,0	24±0	0,05±0,00	22±0,2

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i proteinima sirutke u dozi od 700 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SD$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

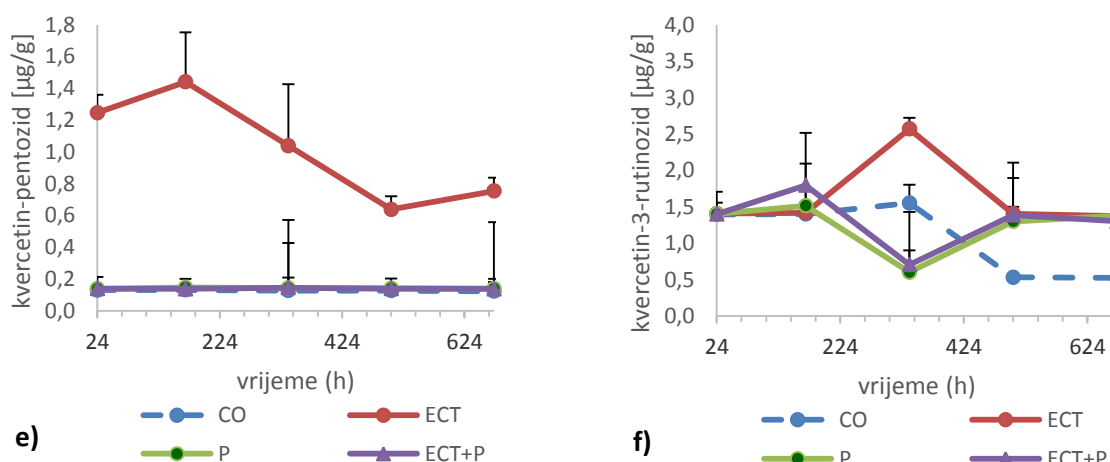
Farmakokinetika detektiranih spojeva kvercetina u miša C57BL/6 prikazana je na Slici 46. Bioapsorpcija kvercetinskih spojeva u jetri kod skupine ECT+P je u pravilu bila niža u odnosu na skupinu ECT. Najveća koncentracija uočena su za spojeve kvercetin-3-rutinozid (između 1. i 7. dana obrade), te kvercetin-ramnozid i kvercetin-acetil-heksozid (između 1. i 14. dana obrade i zadržavaju istu koncentraciju do 28 dana). Biodinamika kvercetin-3-*O*-glukozida, kvercetin-pentozil-heksozida, izuzev kvercetin-pentozida u skupini ECT+P bila je slična kao i u skupini ECT, ali različitim koncentracija u početnim danima obrade.



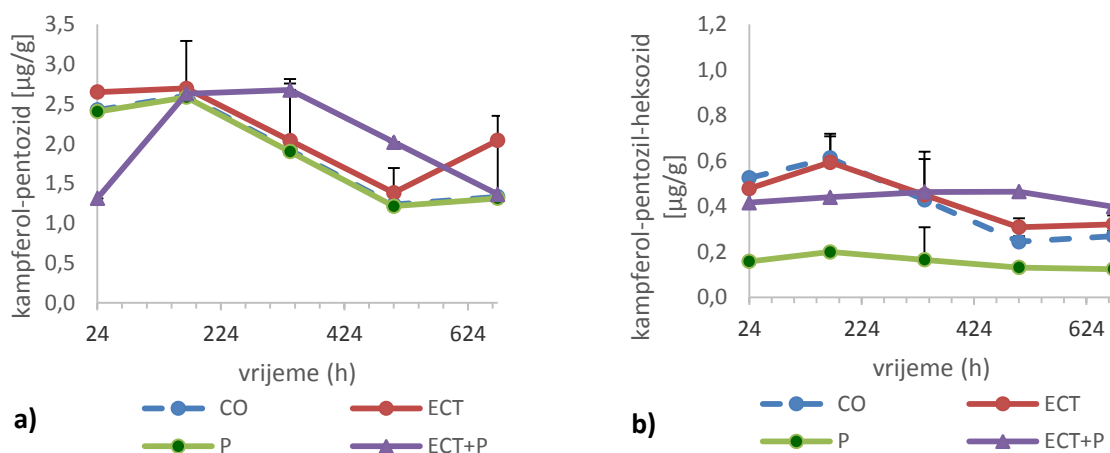
Slika 47. Farmakokinetika i koncentracije kvercetina: a) kvercetin-3-*O*-glukozida, b) kvercetin-acetil-heksozida, c) kvercetin-pentozil-heksozida, d) kvercetin-ramnozida, e) kvercetin-pentozida i f) kvercetin-3-rutinozida u jetri C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i proteina sirutke (700 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.



Slika 47. nastavak

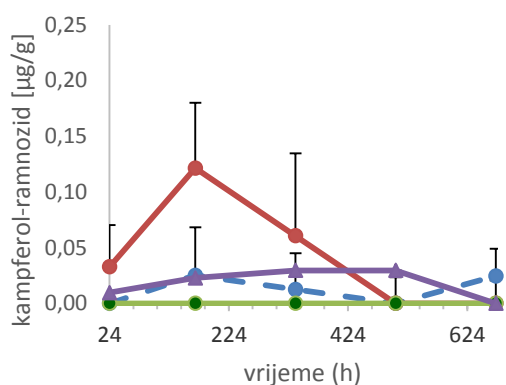


Farmakokinetika detektiranih spojeva kampferola u miša C57BL/6 prikazana je na slici 48. Od kampferolnih spojeva, najveća vrijednost apsorpcije u skupini ECT+P utvrđena je za spoj kampferol-pentozid (između 7. i 14. dana obrade). Biodinamika ostalih spojeva kampferola u skupini ECT+P je bila ravnomjernije biodinamike u odnosu na ECT, a vrijednosti koncentracija kretale su se u niskom i vrlo niskom rasponu koncentracija.

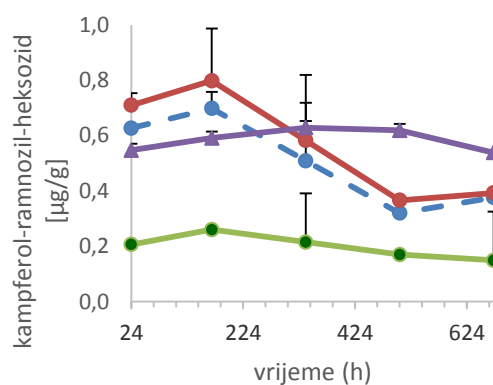


Slika 48. Farmakokinetika i koncentracije kampferola: a) kampferol-pentozida, b) kampferol-pentozil-heksozida, c) kampferol-ramnozida, d) kampferol-ramnozil-heksozida, e) kampferol-3-glukozida, f) kampferol-3-rutinozida, g) kampferol-acetil-heksozida i h) izoramnetin-3-rutinozida u jetri C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i proteina sirutke (700 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

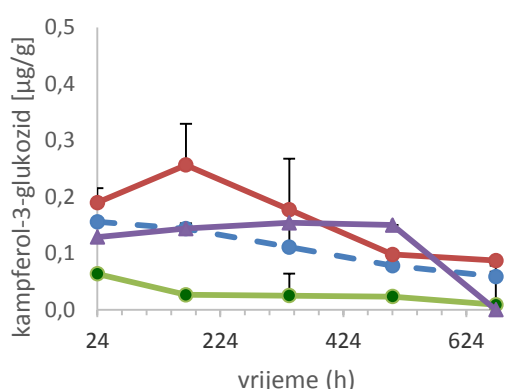
Slika 48. nastavak



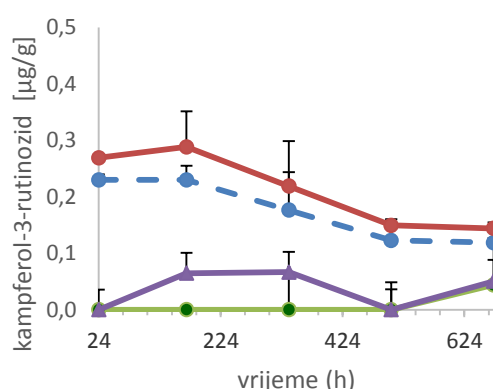
c)   
 CO (blue dashed line, circle)    ECT (red solid line, circle)   
 P (green solid line, circle)    ECT+P (purple solid line, triangle)



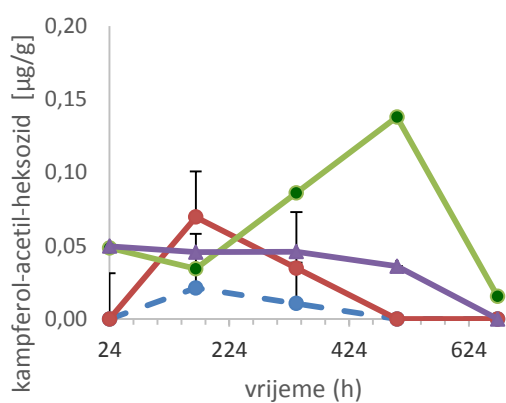
d)   
 CO (blue dashed line, circle)    ECT (red solid line, circle)   
 P (green solid line, circle)    ECT+P (purple solid line, triangle)



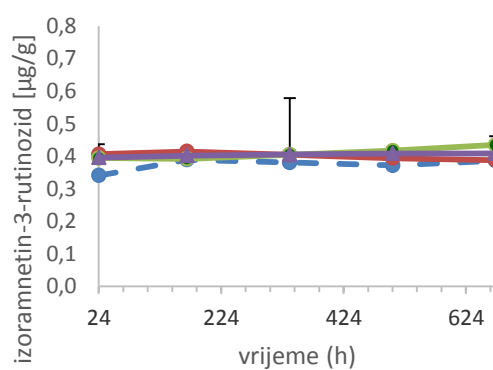
e)   
 CO (blue dashed line, circle)    ECT (red solid line, circle)   
 P (green solid line, circle)    ECT+P (purple solid line, triangle)



f)   
 CO (blue dashed line, circle)    ECT (red solid line, circle)   
 P (green solid line, circle)    ECT+P (purple solid line, triangle)



g)   
 CO (blue dashed line, circle)    ECT (red solid line, circle)   
 P (green solid line, circle)    ECT+P (purple solid line, triangle)



h)   
 CO (blue dashed line, circle)    ECT (red solid line, circle)   
 P (green solid line, circle)    ECT+P (purple solid line, triangle)

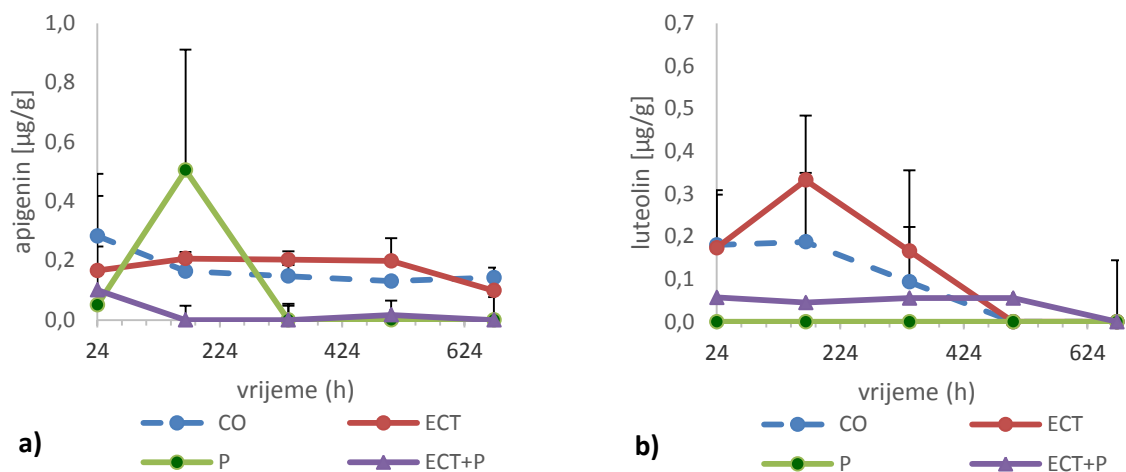
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u jetri pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke prikazani su u Tablici 45.

Tablica 45. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u jetri kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavona detektirani u jetri; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			P			ECT+P		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC (h· $\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC (h· $\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC (h· $\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC (h· $\mu\text{g/g}$ )
Apigenin	24±8	0,28±0,01	107,2±0,9	168±27	0,20±0,03	121,1±0,5	168±0	0,50±0,00	40,6	24±0	0,10±0,03 <sup>▲</sup>	9,9±0,1 <sup>▲</sup>
Luteolin	168±83	0,19±0,01	51,3±3,3	168±83	0,19±0,01	51,3±3,3	-	<LOD	-	24±0	0,05±0,01 <sup>▲</sup>	25,8±0,1 <sup>▲</sup>

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i proteinima sirutke u dozi od 700 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Farmakokinetika detektiranih spojeva flavona u miša C57BL/6 prikazana je na slici 49. Biodinamika luteolina i apigenina u skupini ECT+P je bila slična, a vrijednosti apsorbiranih koncentracija kretale su se u vrlo niskom rasponu koncentracija tijekom svih 28. dana obrade (Slika 49).



Slika 49. Farmakokinetika i koncentracije flavona: a) apigenina, b) luteolina u jetri C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i proteina sirutke (700 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

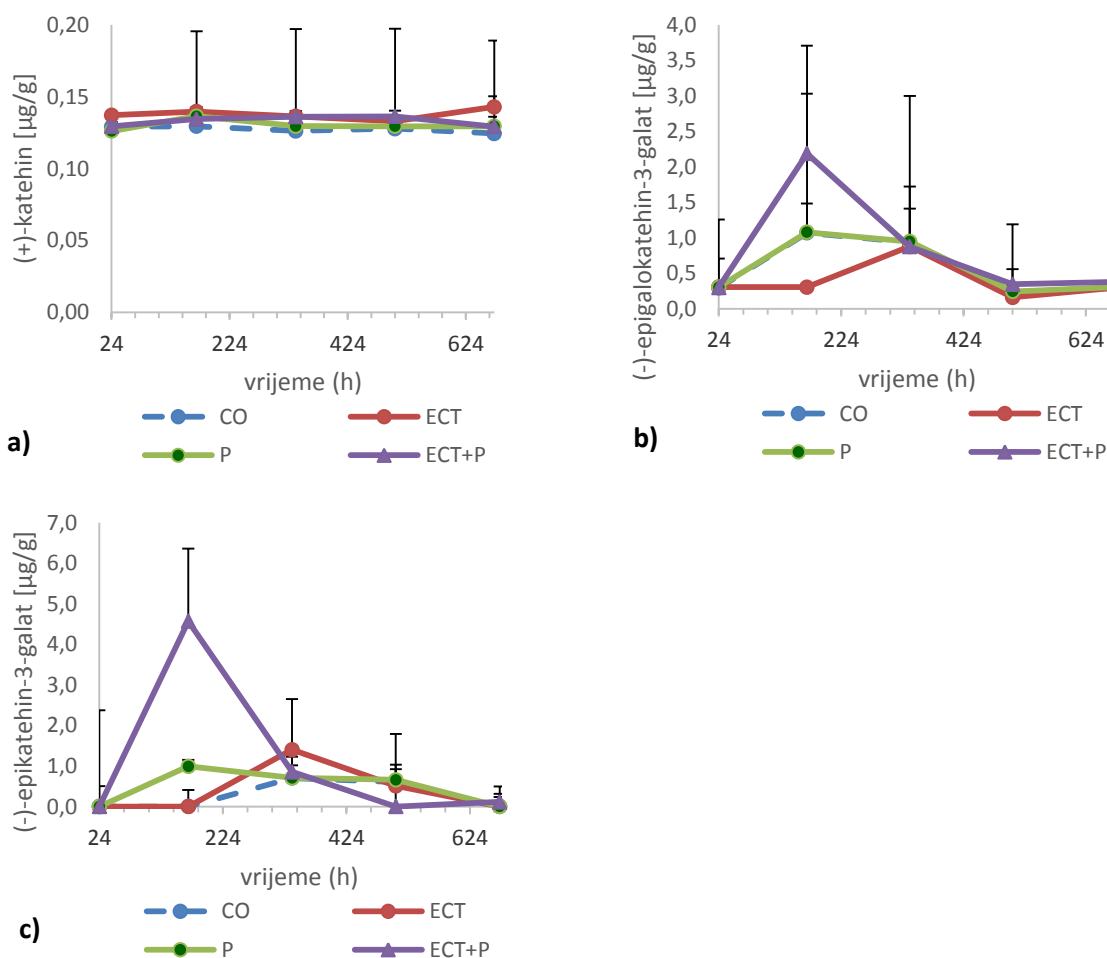
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola unutar jetre pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke prikazani su u Tablici 46.

Tablica 46. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u jetri kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavan-3-ola detektirani u jetri; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			P			ECT+P		
	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)
(+)-katehin	168±37	0,13±0,00	84,1±0,1	672±290	0,14±0,00	90,5±0,0	168±118	0,13±0,00	86,3±0,9	504±256	0,13±0,00	88,4±16,5
(-)-epikatehin-3-galat	336±193	0,70±0,00	169,2±2,4	336±0	1,40±0,00*	265,9±0,0*	168±0	0,99±0,00	328,3±0,0	168±0	4,56±0,26 <sup>▲</sup>	783,4±328,0 <sup>▲</sup>
(-)-epigalokatehin-3-galat	168±193	1,07±0,25	400,0±61,5	336±0	0,88±0,00	256,6±0,0	168±33	1,07±0,00	406,8±0,1	168±0	2,18±0,12 <sup>▲</sup>	580±0,1 <sup>▲</sup>

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i proteinima sirutke u dozi od 700 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Farmakokinetika detektiranih spojeva flavan-3-ola u miša C57BL/6 prikazana je na Slici 50. Za razliku od spojeva iz skupine flavonola, koncentracija detektiranih spojeva iz skupine flavan-3-ola bilježi znatno veće vrijednosti apsorbiranih koncentracija (Slika 50). Relativno visoke koncentracije u skupini ECT+P u odnosu na skupinu ECT postignute su između 1. i 14. dana obrade za spojeve (-)-epigalokatehin-3-galat i epikatehin-3-galat. Vrijednosti bioapsorbiranih koncentracija (+)-katehina bile su tijekom svih 28. dana u vrlo niskom rasponu koncentracija.



Slika 50. Farmakokinetika i koncentracije flavan-3-ola: a) (+)-katehina b) (-)-epigalokatehin-3-galata i c) (-)-epikatehin-3-galata u jetri C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i proteina sirutke (700 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

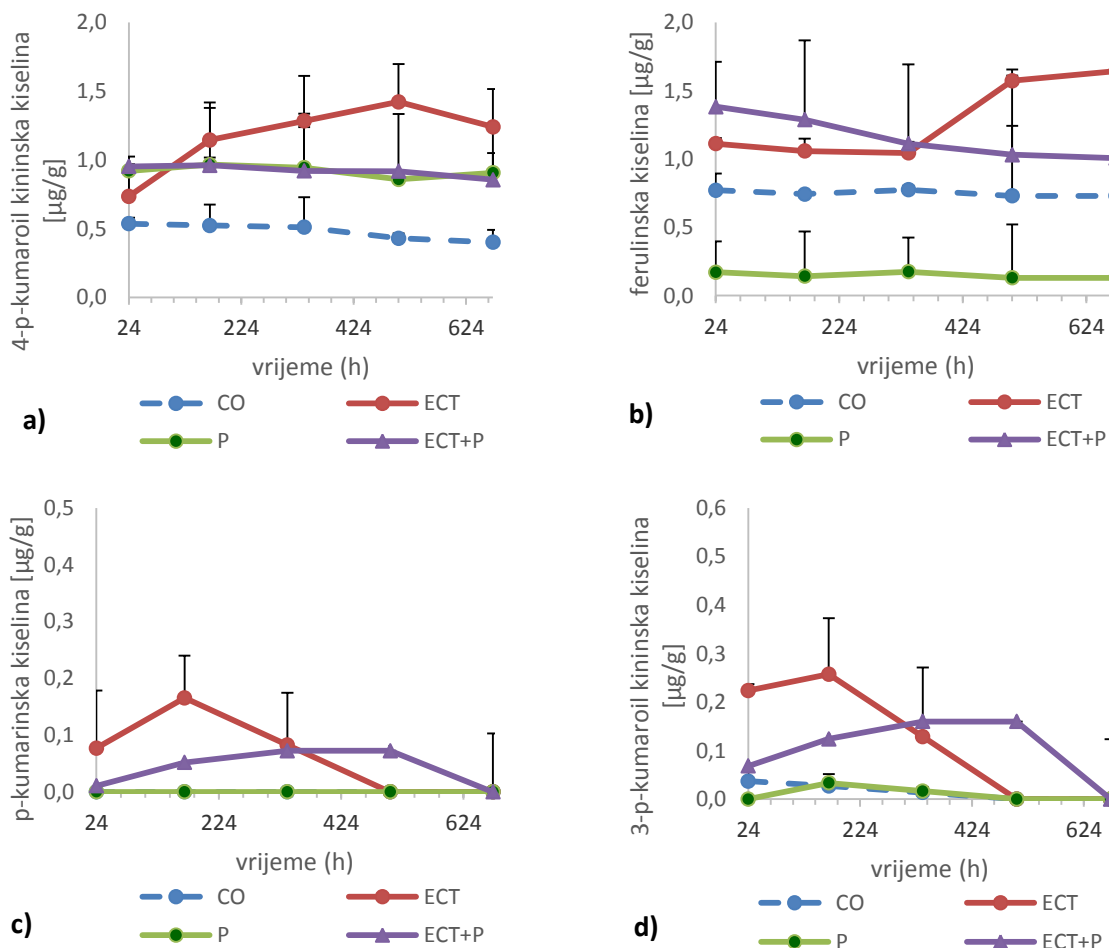
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina unutar jetre pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke prikazani su u Tablici 47.

Tablica 47. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u jetri kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine fenolnih kiselina detektiranih u jetri; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			P			ECT+P		
	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)
3- <i>O</i> -feruloil kininska kiselina	504±290	0,21±0,03	34,9±9,0	24±2	0,45±0,09*	81,0±4,6*	24±0	0,45±0,00	134,8±5,1	24±0	0,42±0,04	116,1±21,9
3- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	24±8	0,04±0,00	8,3±0,7	168±0	0,26±0,00*	68,5±0,1*	168±0	0,03±0,03	6,5±0,1	336±0	0,16±0,01	65,4±8,3
4- <i>O</i> -kafeoil kininska kiselina	504±96	1,42±0,01	710,6±0,5	672±0	1,59±0,00	963,9±1,7	504±0	1,61±0,00	1005,8±0,0	672±0	1,43±0,08	890,8±0,1
4- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	24±1	0,54±0,14	317,5±2,8	24±1	0,54±0,01	317,5±2,8	168±0	0,96±0,00	606,2±5,5	168±0	0,96±0,06	610,1±0,8
ferulinska kiselina	336±83	0,77±0,02	494,6±0,4	672±290	1,64±0,02	835,8±3,6	336±48	0,17±0,00	98,4±0,1	24±8	1,38±0,09	760,9±0,1
galna kiselina	672±0	0,58±0,14	76,9±8,8	672±387	1,31±0,19*	110,1±16,2	24±0	0,20±0,00	2,5±0,0	336±0	1,11±0,00	506,0±0,0 <sup>▲</sup>
kafeinska kiselina	504±0	0,24±0,01	54,5±0,2	504±277	1,79±0,15*	479,4±39,1*	168±0	0,05±0,00	10,6±0	504±0	0,17±0,01 <sup>▲</sup>	78,8,0±0,0 <sup>▲</sup>
<i>p</i> -kumarinska kiselina	24±0	0,00±0,00	0,0±0,0	168±83	0,17±0,03	38,4±0,0*	-	<LOD	-	336±0	0,07±0,00 <sup>▲</sup>	27,3±0,3

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i proteinima sirutke u dozi od 700 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SD$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

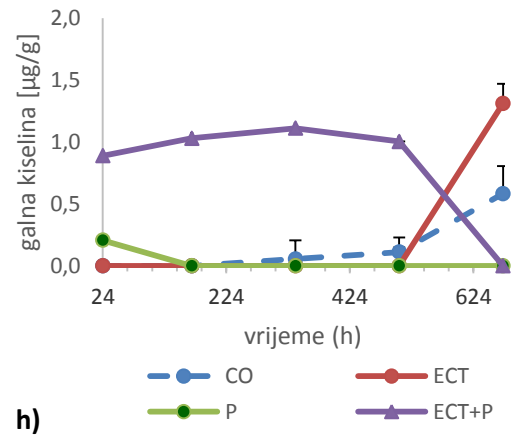
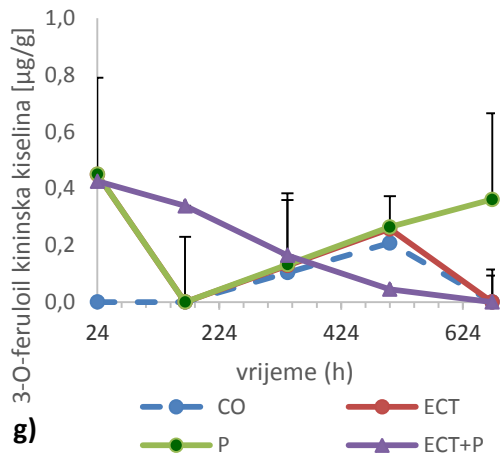
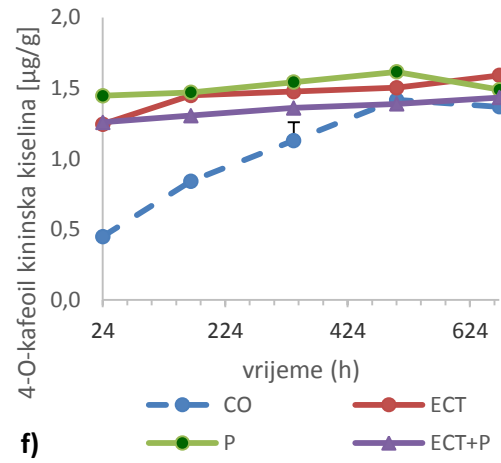
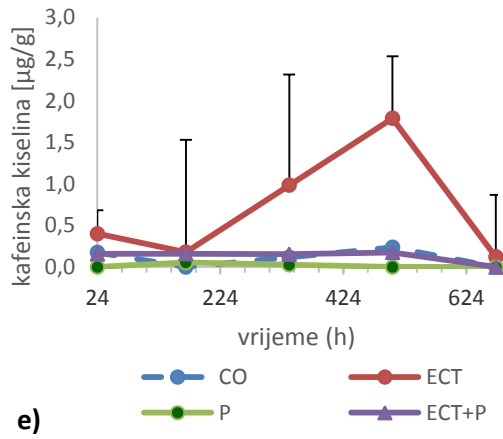
Farmakokinetika detektiranih fenolnih kiselina u jetri miša C57BL/6 prikazana je na Slici 51. Od fenolnih kiselina, najistaknutije koncentracije u skupini ECT+P, iako nešto niže vrijednosti u odnosu na skupinu ECT, izuzev galne kiseline uočene su za 4-*p*-kumaroil kininsku, ferulinsku, 4-*O*-kafeoil kininsku kiselinu. Biodinamika ostalih kiselina bila je slična i kretala se u niskom i vrlo niskom rasponu koncentracija..



Slika 51. Farmakokinetika i koncentracije fenolnih kiselina: a) 4-*p*-kumaroil kininske, b) ferulinske, c) *p*-kumarinske, d) 3-*p*-kumaroil kininske, e) kafeinske, f) 4-*O*-kafeoil kininske, g) 3-*O*-feruloil kininske i h) galne kiseline u jetri C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i proteina sirutke (700 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija.



Slika 51. nastavak



Nakon subkroničnog doziranja ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke, u mozgu je ukupno detektirano 62,5% ( $N=20/32$ ) polifenolnih spojeva od ukupnog broja polifenolnih spojeva koje nalazimo u čistom ekstraktu cvijeta trnine. Statistički značajno različit AUC i  $c_{\max}$  kod skupine ECT+P u usporedbi sa skupinom ECT uočen za 12 spojeva što čini 37,5% od ukupnih spojeva pronađenih u ekstraktu cvijeta trnine i 60,0% od ukupno detektiranih spojeva u mozgu.

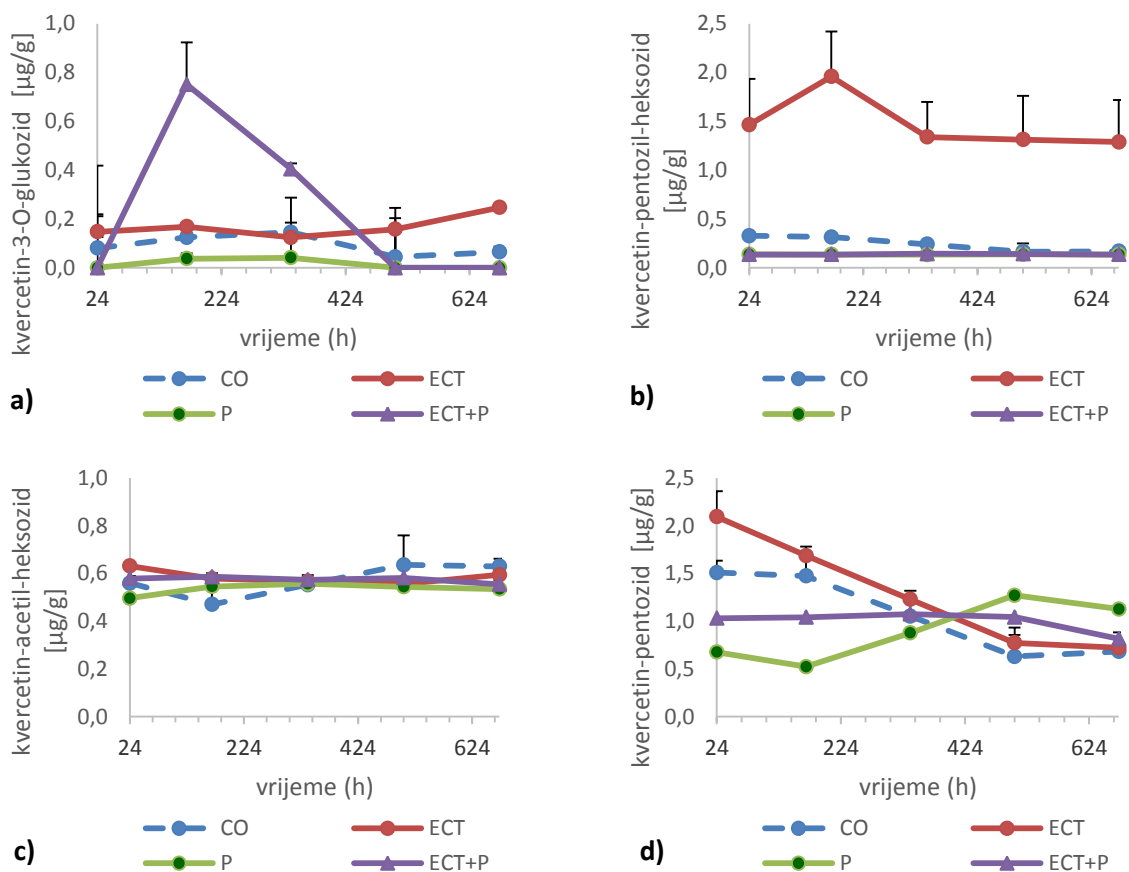
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavanola u mozgu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke prikazani su u Tablici 48.

Tablica 48. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u mozgu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima tijekom 28 dana

Flavonoli detektirani u mozgu; subkronična doza (1.-28. dan)	Skupina											
	CO			ECT			P			ECT+P		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)
izoramnetin-3-rutinozid	672±0	0,39±0,06	258,0±1,57	168±0	0,43±0,02	265,7±3,5	24±0	0,45±0,00	285,4±0,0	168±0	0,41±0,00	265,9±0,0
kvercetin-3-glukozid	336±0	0,14±0,01	62,0±6,8	672±0	0,24±0,03*	107,0±5,5*	336±97	0,04±0,21	9,3±7,2	168±0	0,75±0,17 <sup>▲</sup>	148,3±19,6
kvercetin-3-O-rutinoside (rutin)	24±3	1,28±0,15	394,0±55,08	336±0	2,84±0,04*	1306,0±74,0*	168±8	1,44±0,02	747,7±28,7	168±0	1,94±0,20	881,3±48,7
kvercetin-acetil-heksozid	504±97	0,63±0,00	373,0±15,8	24±0	0,63±0,01	382,0±17,02	336±0	0,55±0,00	356,6±0,0	168±0	0,58±0,00	380,7±0,0
kvercetin-pentozid	24±8	1,51±0,22	692,0±146,8	24±0	2,09±0,26	830,0±28,8	504±0	1,27±0,00	593,2±0,0	336±0	1,07±0,00 <sup>▲</sup>	672,9±0,0
kvercetin-pentozil-heksozid	24±8	0,32±0,03	158,0±78,6	168±83	1,96±0,04*	979,0±8,31*	24±0	0,13±0,00	90,1±0,0	336±0	0,14±0,00 <sup>▲</sup>	92,5±0,0 <sup>▲</sup>
kvercetin-ramnozid	504±83	0,68±0,02	425,9±4,0	672±0	2,92±0,01*	1136,4±0,58*	672±374	0,18±0,02	23,0±8,2	672±97	2,12±0,92	267,4±155,6 <sup>▲</sup>
kampferol-3-glukozid	168±0	0,24±0,06	108,2±11,6	168±0	0,19±0,00	89,6±0,5	504±0	0,14±0,00	68,8±0,0	504±0	0,13±0,00	77,2±0,0
kampferol-3-rutinozid	24±0	0,06±0,01	33,0±5,3	672±0	0,28±0,00*	147,0±1,3*	168±97	0,03±0,02	2,5±0,6	672±0	0,04±0,00 <sup>▲</sup>	3,7±0,0 <sup>▲</sup>
kampferol-pentozid	168±83	2,58±0,04	1295,6±22,8	168±0	2,64±0,05	1326,7±17,6	504±0	2,12±0,00	1051,0±0,0	504±0	1,89±0,00	1164,7±0,0
kampferol-ramnozil-heksozid	24±8	0,65±0,04	294,6±15,7	336±0	0,73±0,01	416,7±5,5	168±0	0,03±0,00	2,2±0,0	-	<LOD <sup>▲</sup>	-

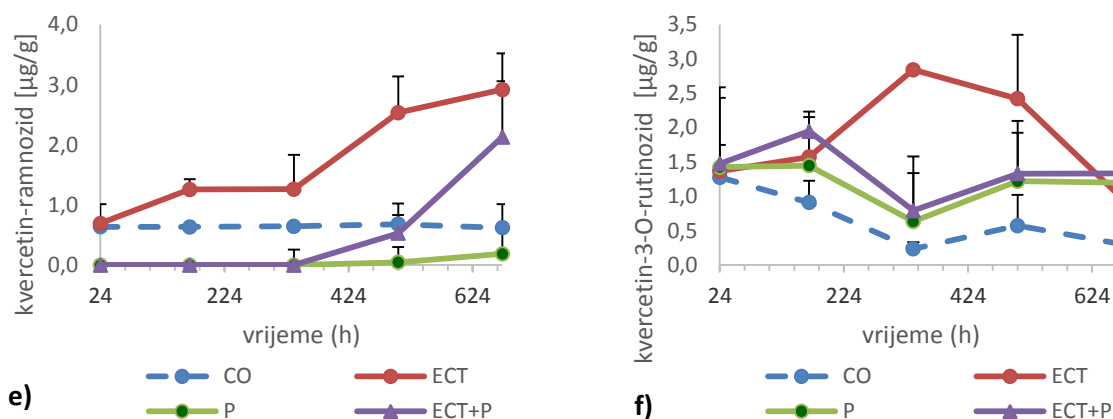
<sup>a</sup> Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i proteinima sirutke u dozi od 700 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Farmakokinetika detektiranih spojeva kvercetina u mozgu miša C57BL/6 prikazana je na slici 51. Među kvercetinским spojevima u mozgu, istaknutije koncentracije uočene su u skupini ECT+P za spojeve kvercetin-ramnozid (između 21. i 28. dana obrade), te kvercetin-pentozid i kvercetin-3-rutinozid čije su se vrijednosti apsorbiranih koncentracija kretale u umjerenom koncentracijskom rasponu i nižih vrijednosti u odnosu na skupinu ECT tijekom svih 28. dana obrade.

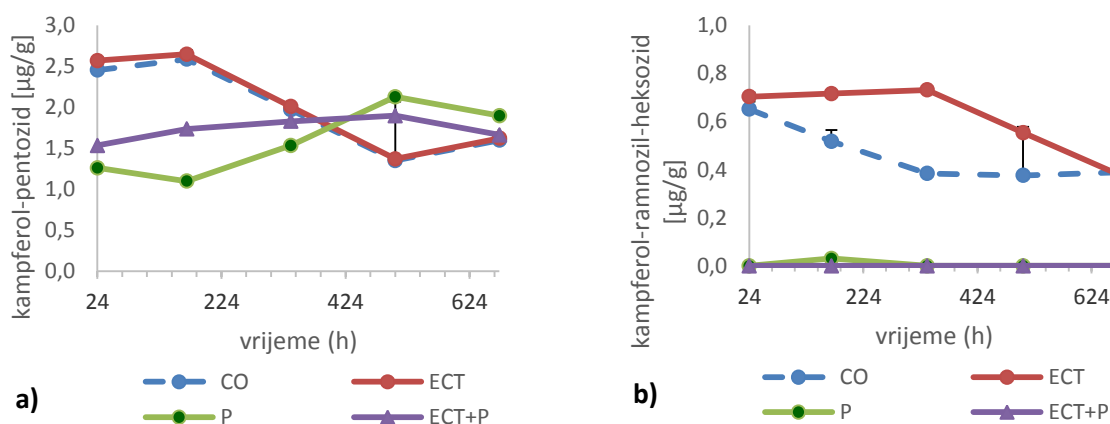


Slika 52. Farmakokinetika i koncentracije kvercetina: a) kvercetin-3-O-glukozida, b) kvercetin-pentozil-heksozida, c) kvercetin-acetil-heksozida, d) kvercetin-pentozida, e) kvercetin-ramnozida i f) kvercetin-3-rutinozida u mozgu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i proteina sirutke (700 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 52. nastavak

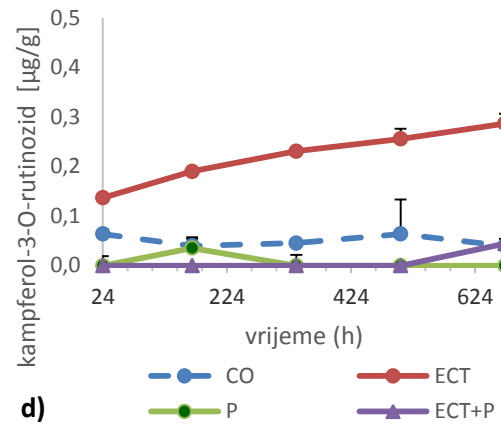
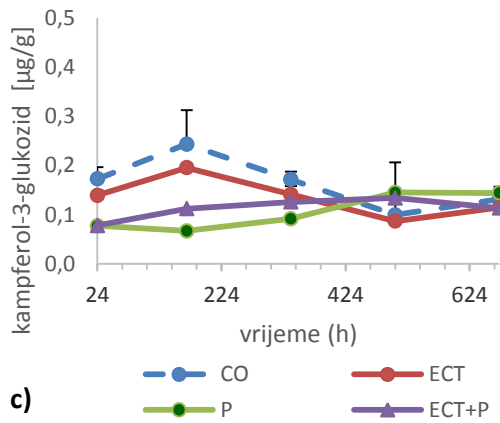


Od detektiranih spojeva kampferola, najveća koncentracija uočena je u skupini ECT+P za spoj kampferol-pentozid čije su se vrijednosti kretala unutar umjerenog raspona koncentracija tijekom svih 28 dana obrade. Biodinamika i vrijednosti koncentracija ostalih spojeva kampferola u mozgu pokusnih životinja bila je slična i kretala se unutar vrlo niskih raspona koncentracija, ali i niskih vrijednosti u odnosu na ECT skupinu (Slika 53).



Slika 53. Farmakokinetika i koncentracije kampferola: a) kampferol-pentozida, b) kampferol-ramnozil-heksozida, c) kampferol-3-glukozida i d) kampferol-3-O-rutinozida u mozgu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i proteina sirutke (700 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 53. nastavak



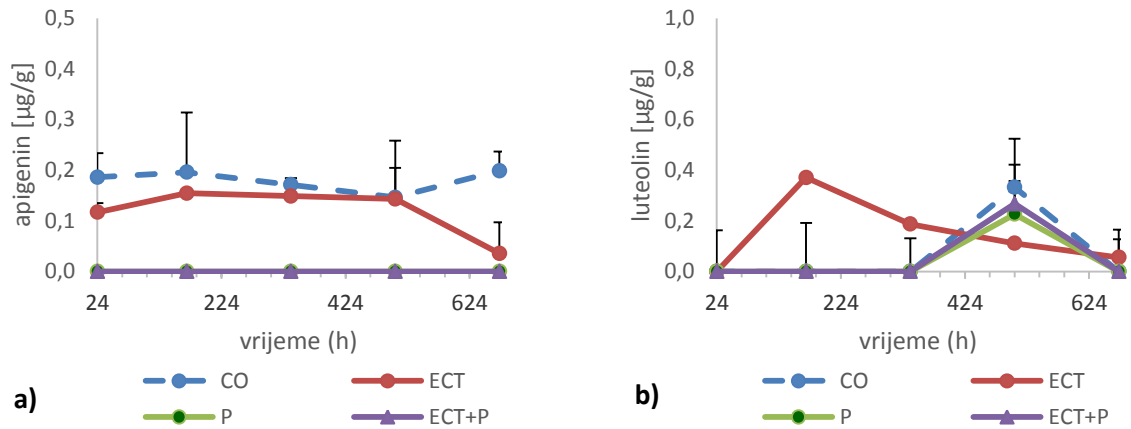
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u mozgu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke prikazani su u Tablici 49.

Tablica 49. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u mozgu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavona detektirani u mozgu; subkronična doza (1.-28. dan)	Skupina											
	CO			ECT			P			ECT+P		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
Apigenin	672±83	0,19±0,07	116±21,3	168±0	0,15±0,00	83,8±4,3	-	<LOD	-	-	<LOD <sup>▲</sup>	-
Luteolin	504±83	0,33±0,03	27,9±3,4	168±0	0,37±0,00	109,8±0,0*	504±291	0,22±0,13	19,0±4,4	504±277	0,267±0,07	22,4±2,3 <sup>▲</sup>

<sup>a</sup> Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i proteinima sirutke u dozi od 700 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SD$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Farmakokinetika detektiranih spojeva flavona u mozgu miša C57BL/6 prikazana je na slici 54. U usporedbi sa spojevima iz skupine flavonola, koncentracija flavona apigenina je tijekom cijelog trajanja obrade u skupini ECT+P iznosila nula, dok su za luteolin uočene vrlo niske vrijednosti porasta koncentracije između 14. i 28. dana (Slika 54).



Slika 54. Farmakokinetika i koncentracije flavona: a) apigenina, b) luteolina u ovisnosti o vremenu u mozgu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i proteina sirutke (700 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u mozgu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke prikazani su u Tablici 50.

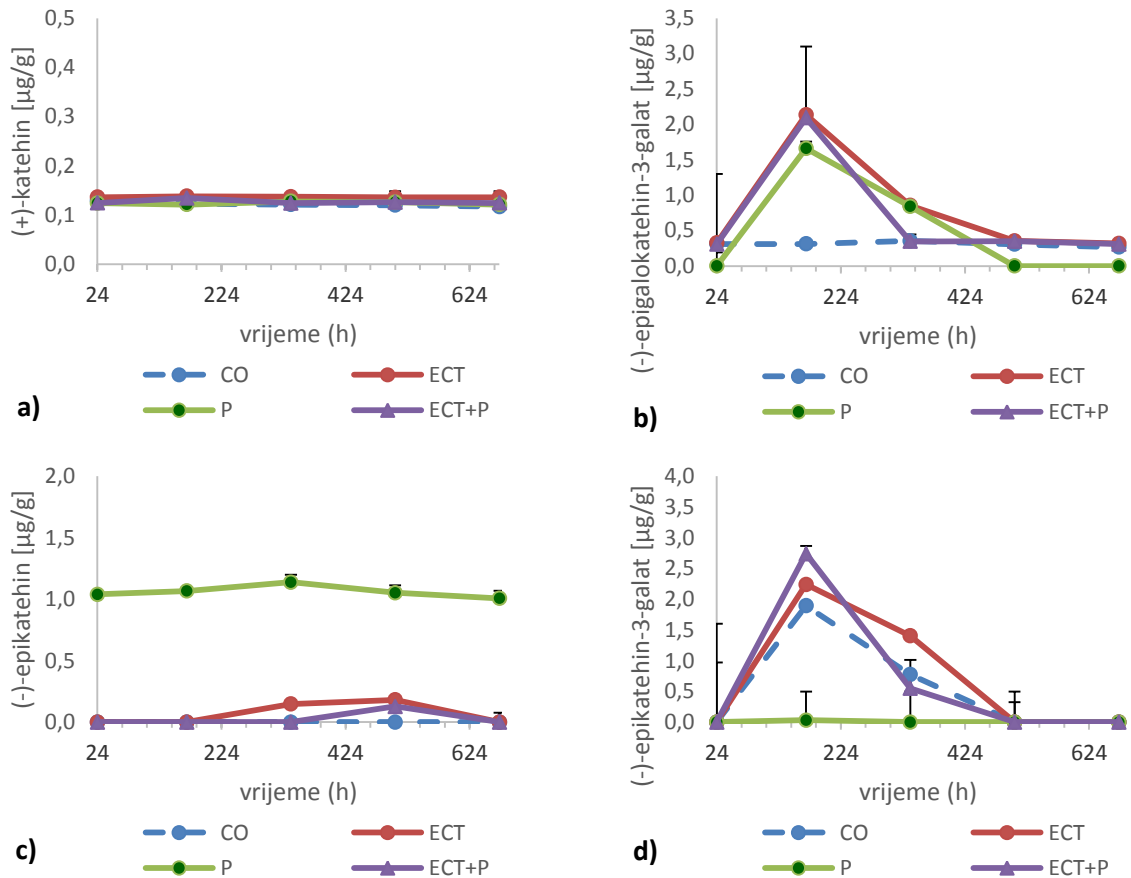


Tablica 50. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u mozgu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavan-3-ola detektirani u mozgu; subkronična doza (1.-28. dan)	Skupina											
	CO			ECT			P			ECT+P		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
(+)-katehin	24 $\pm$ 374	0,12 $\pm$ 0,05	80,4 $\pm$ 1,17	168 $\pm$ 37	0,13 $\pm$ 0,00	90,3 $\pm$ 1,17	336 $\pm$ 277	0,12 $\pm$ 0,00	82,2 $\pm$ 1,4	168 $\pm$ 0	0,13 $\pm$ 0,00	84,0 $\pm$ 1,4
(-)-epikatehin	24 $\pm$ 0	0,00 $\pm$ 0,00	0,0 $\pm$ 0,0	504 $\pm$ 0	0,18 $\pm$ 0,00	39,9 $\pm$ 0,0*	504 $\pm$ 291	0,10 $\pm$ 0,06	8,9 $\pm$ 2,5	504 $\pm$ 277	0,12 $\pm$ 0,03	10,7 $\pm$ 1,2 <sup>▲</sup>
(-)-epikatehin-3-galat	168 $\pm$ 0	1,89 $\pm$ 0,00	346,2 $\pm$ 0,0	168 $\pm$ 0	12,23 $\pm$ 0,00	461,6 $\pm$ 0,0	168 $\pm$ 97	1,66 $\pm$ 0,95	321,8 $\pm$ 32,5	168 $\pm$ 0	2,73 $\pm$ 1,27	425,9 $\pm$ 305,8
(-)-epigalokatehin-3-galat	336 $\pm$ 0	0,35 $\pm$ 0,00	207,7 $\pm$ 0,0	168 $\pm$ 0	2,13 $\pm$ 0,00	567,6 $\pm$ 0,0*	168 $\pm$ 19	0,09 $\pm$ 0,00	28,5 $\pm$ 4,6	168 $\pm$ 0	2,09 $\pm$ 1,00	453,5 $\pm$ 265,8

<sup>a</sup> Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i proteinima sirutke u dozi od 700 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SD$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Za spojeve iz skupine flavan-3-ola, relativno visoke vrijednosti bioapsorpcije u skupini ECT+P utvrđene su za spojeve (-)-epikatehin-3-galat i (-)-epigalokatehin-3-galat između 14. i 21. dana obrade. Vrijednost ostalih koncentracija (-)-epikatehina i (+)-katehina kretala se u vrlo niskom rasponu koncentracija tijekom svih 28. dana obrade (Slika 55).



Slika 55. Farmakokinetika i koncentracije flavan-3-ola: a) (+)-katehina, b) (-)-epigalokatehin-3-galata, c) (-)-epikatehina i d) (-)-epikatehin-3-galata u mozgu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i proteina sirutke (700 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

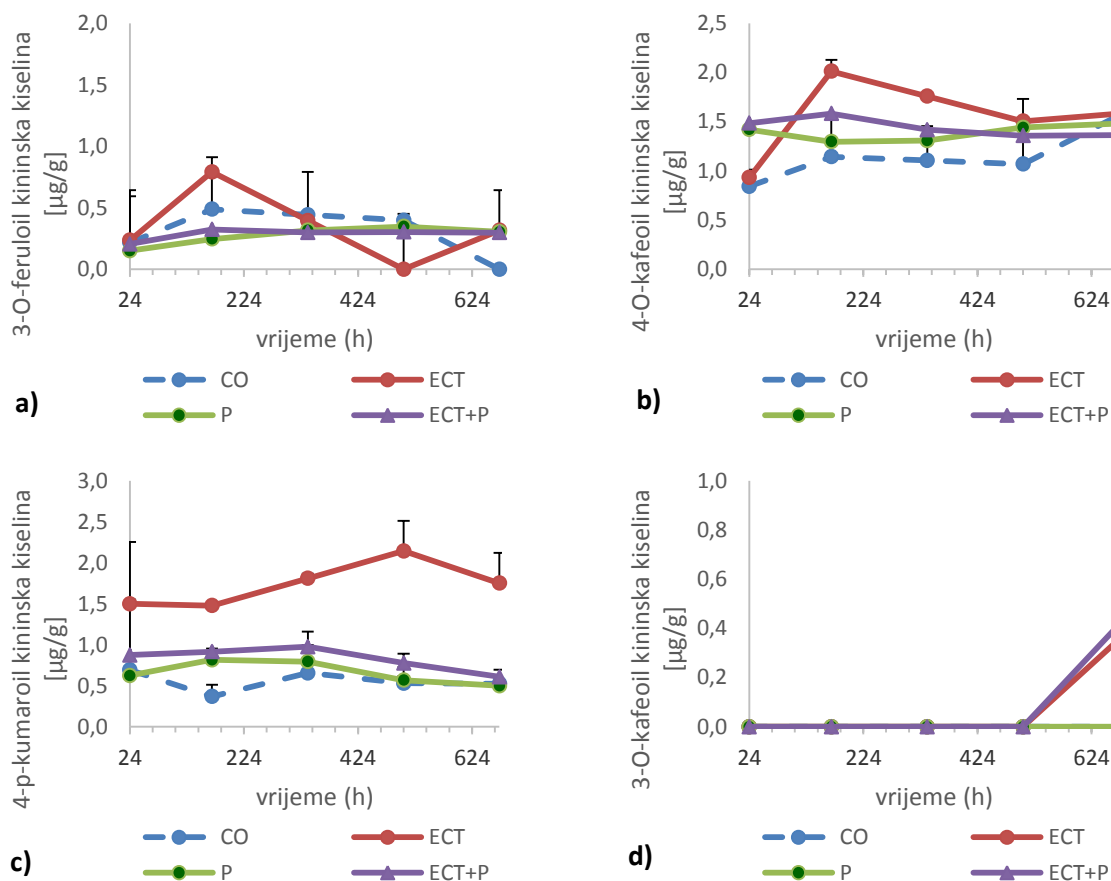
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u mozgu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke prikazani su u Tablici 51.

Tablica 51. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u mozgu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine fenolnih kiselina detektiranih u mozgu; subkronična doza (1.-28. dan)	Skupina											
	CO			ECT			P			ECT+P		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
3- <i>O</i> -feruloil kininska kiselina	168±19	0,48±0,05	202,0±114,9	168±0	0,79±0,00*	232,0±53,7	504±0	0,34±0,00	188,0±0,0	168±0	0,32±0,00 <sup>▲</sup>	193,8±0,0
4- <i>O</i> -kafeoil kininska kiselina	672±0	1,56±0,04	746,0±126,4	168±0	2,01±0,115	1072±43,3	672±0	1,48±0,00	907,6±0,0	168±0	1,58±0,00	952,3±0,0
4- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	24±3	0,69±0,25	356,0±153,67	504±0	2,14±0,05*	1166,0±47,9*	168±19	0,81±0,08	449,3±32,4	336±291	0,97±0,03 <sup>▲</sup>	560,6±14,1 <sup>▲</sup>
ferulinska kiselina	168±0	1,52±0,00	856,4±0,0	504±0	1,64±0,00	929,6±0,0	336±83	1,13±0,03	705,3±15,7	336±246	1,70±0,47	1021, 6±124,9
galna kiselina	24±0	1,87±0,47	185,8±143,8	24±0	2,50±0,47	685,6±26,7*	168±0	0,34±0,00	25,0±0,0	24±0	0,15±0,00 <sup>▲</sup>	20,7±0,0 <sup>▲</sup>

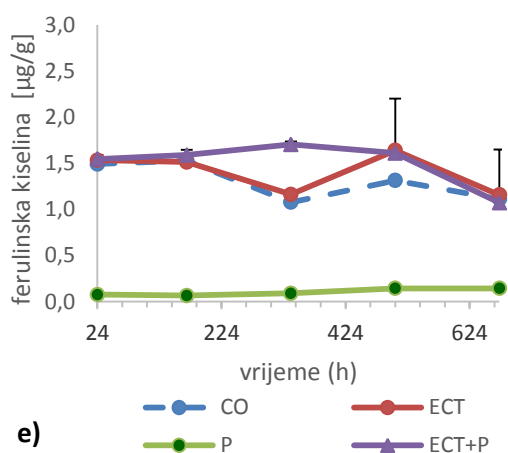
<sup>a</sup> Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i proteinima sirutke u dozi od 700 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SD$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Od fenolnih kiselina, najveće bioapsorbirane koncentracije čije su se vrijednosti kretale u umjerenom rasponu koncentracija kod skupine ECT+P utvrđene su za 4-*O*-kafeoil kininsku, 4-*p*-kumaroil kininsku i ferulinsku kiselinu. Biodinamika ostalih fenolnih kiselina bila je slična i kretala se u vrlo niskom rasponu koncentracija (Slika 56).



Slika 56. Farmakokinetika i koncentracije fenolnih kiselina: a) 3-*O*-feruloil kininske, b) 4-*O*-kafeoil kininske, c) 4-*p*-kumaroil kininske, d) 3-*O*-kafeoil kininske i e) ferulinske kiseline u mozgu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i proteina sirutke (700 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 56. nastavak



Nakon subkroničnog doziranja ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke, u bubrezima je ukupno detektirano 37,5% ( $N=12/32$ ) polifenolnih spojeva od ukupnog broja polifenolnih spojeva koje nalazimo u čistom ekstraktu cvijeta trnine. Statistički značajno različit AUC i  $c_{\max}$  kod skupine ECT+P u usporedbi sa skupinom ECT uočen za 7 spojeva što čini 21,8% od ukupnih spojeva pronađenih u ekstraktu cvijeta trnine i 58,3% od ukupno detektiranih spojeva u bubrezima.

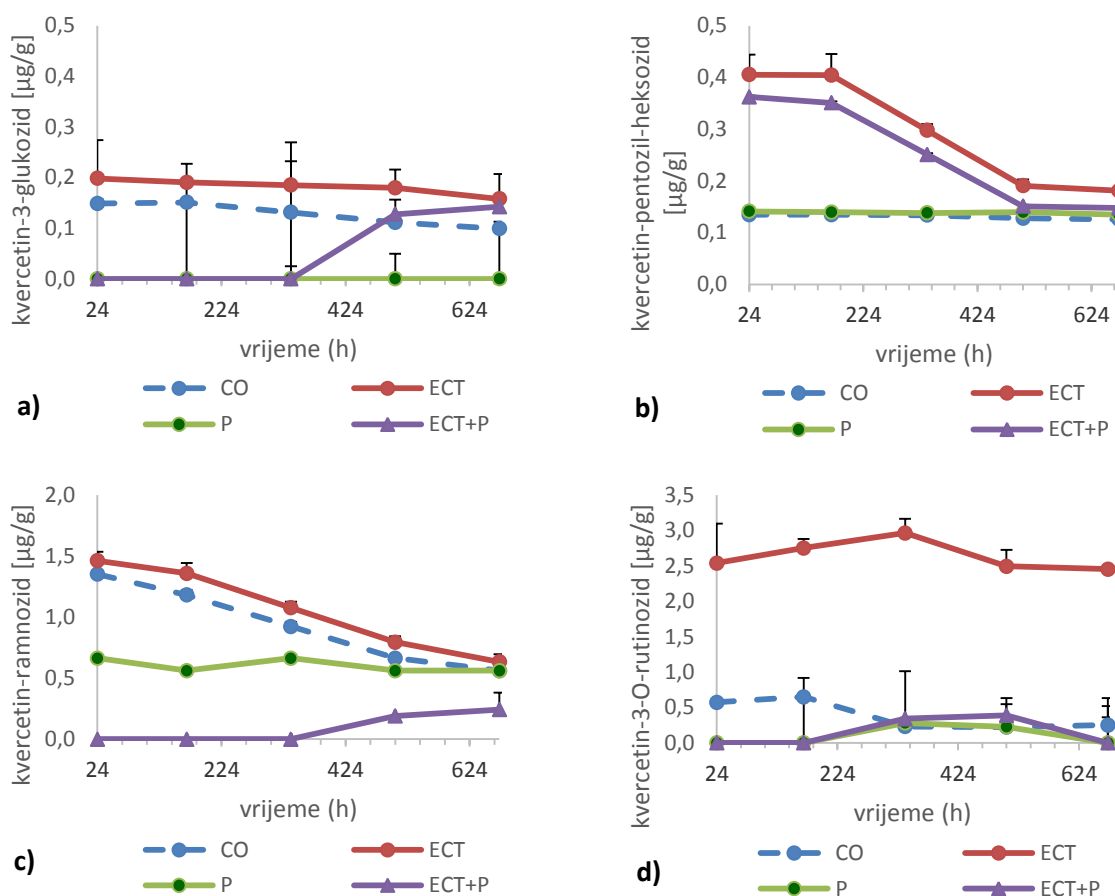
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavanola u bubregu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke prikazani su u Tablici 52.

Tablica 52. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u bubrezima kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima tijekom 28 dana

Flavonoli detektirani u bubrezima; subkronična doza (1.-28. dan)	Skupina											
	CO			ECT			P			ECT+P		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
kampferol-pentozid	24±0	2,77±0,02	1317,0±14,7	24±0	2,94±0,03	1381,1±12,5	24±0	1,33±0,00	536,7±0,0	24±0	2,76±0,00	1305,6±0,0
kvercetin-3-glukozid	168±83	0,15±0,00	85,1±1,0	24±0	0,20±0,00	121,0±0,6	24±0	<LOD	0,0±0,0	672±194	0,14±0,03	33,4±3,7 <sup>▲</sup>
kvercetin-3-O-rutinozid (rutin)	168±19	0,65±0,35	240,1±100,8	336±0	2,96±0,02*	1764,0±6,7*	336±0	0,28±0,01	65,8±15,2	504±0	0,38±0,00 <sup>▲</sup>	89,9±34,3 <sup>▲</sup>
kvercetin-pentozil-heksozid	24±0	0,13±0,00	86,8±1,2	24±8	0,41±0,00*	193,2±1,1*	24±0	0,14±0,00	91,6±0,3	24±9	0,36±0,00	163,9±1,4
kvercetin-ramnozid	24±0	1,35±0,02	609,0±12,7	24±0	1,46±0,00	699,5±1,0	24±0	0,66±0,00	395,7±0,0	672±388	0,24±0,14 <sup>▲</sup>	52,3±11,7 <sup>▲</sup>

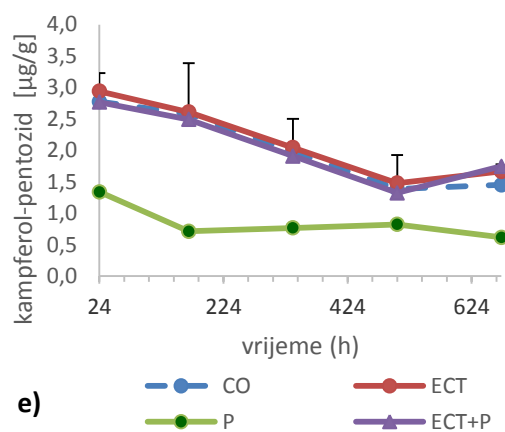
<sup>a</sup> Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i proteinima sirutke u dozi od 700 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SD$ . Kratice: CO – kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Od spojeva iz skupine flavonola u bubregu, za spojeve kampferol-pentozid i kvercetin-pentozil-heksozid je uočena slična vremenska biodinamika između skupina ECT i ECT+P, a više koncentracije su utvrđene za spoj kampferol-pentozid. Najistaknutije razlike u bioasporpciji uočene su za spojeve kvercetin-3-*O*-rutinozid i kvercetin-ramnozid čija je koncentracija bila znatno niža u skupini ECT+P u odnosu na skupinu ECT tijekom cijelog trajanja obrade (Slika 57).



Slika 57. Farmakokinetika i koncentracije kvercetina i kampferola: a) kvercetin-3-glukozida, b) kvercetin-pentozil-heksozida, c) kvercetin-ramnozida, d) kvercetin-3-*O*-rutinozida i e) kampferol-pentozida u bubrezima C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i proteina sirutke (700 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 57. nastavak



UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u bubrezima pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke prikazani su u Tablici 53.

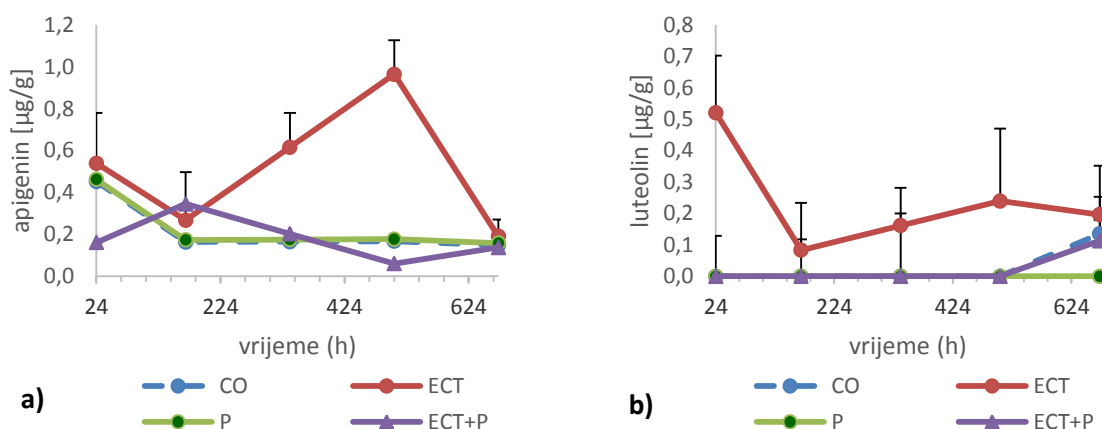


Tablica 53. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u bubrezima kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavona detektirani u bubrezima; subkronična doza (1.-28. dan)	Skupina											
	CO			ECT			P			ECT+P		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)
Apigenin	24±0	0,45±0,01	128,2±1,0	504±0	0,96±0,02*	349,2±2,6*	24±0	0,46±0,00	134,9±0,0	168±0	0,34±0,00 <sup>▲</sup>	119,5±0,0 <sup>▲</sup>
Luteolin	672±0	0,13±0,15	11,3±3,5	24±0	0,52±0,19*	131,2±13,7*	-	<LOD	-	672±388	0,11±0,06 <sup>▲</sup>	9,5±5,5 <sup>▲</sup>

<sup>a</sup> Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i proteinima sirutke u dozi od 700 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Za razliku od skupine ECT, bioapsorpcija luteolina je u skupini ECT+P do 21. dana obrade gotovo jednaka nuli, nakon čega je do 28. dana obrade uočen porast njegove bioapsorpcije, međutim u vrlo niskim koncentracijama. Za apigenin je utvrđena nešto drugačija biodinamika. Najveće koncentracije apigenina, iako u vrlo niskom rasponu koncentracija uočene su između 1. i 7. dana obrade u skupini ECT+P nakon čega mu se koncentracija do 21. dana obrade smanjuje. Istovremeno, kako se koncentracija apigenina u skupini ECT+P smanjuje, tako u skupini ECT njegova koncentracija raste (Slika 58).



Slika 58. Farmakokinetika i koncentracije flavona: a) apigenina, b) luteolina u bubrezima C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i proteina sirutke (700 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

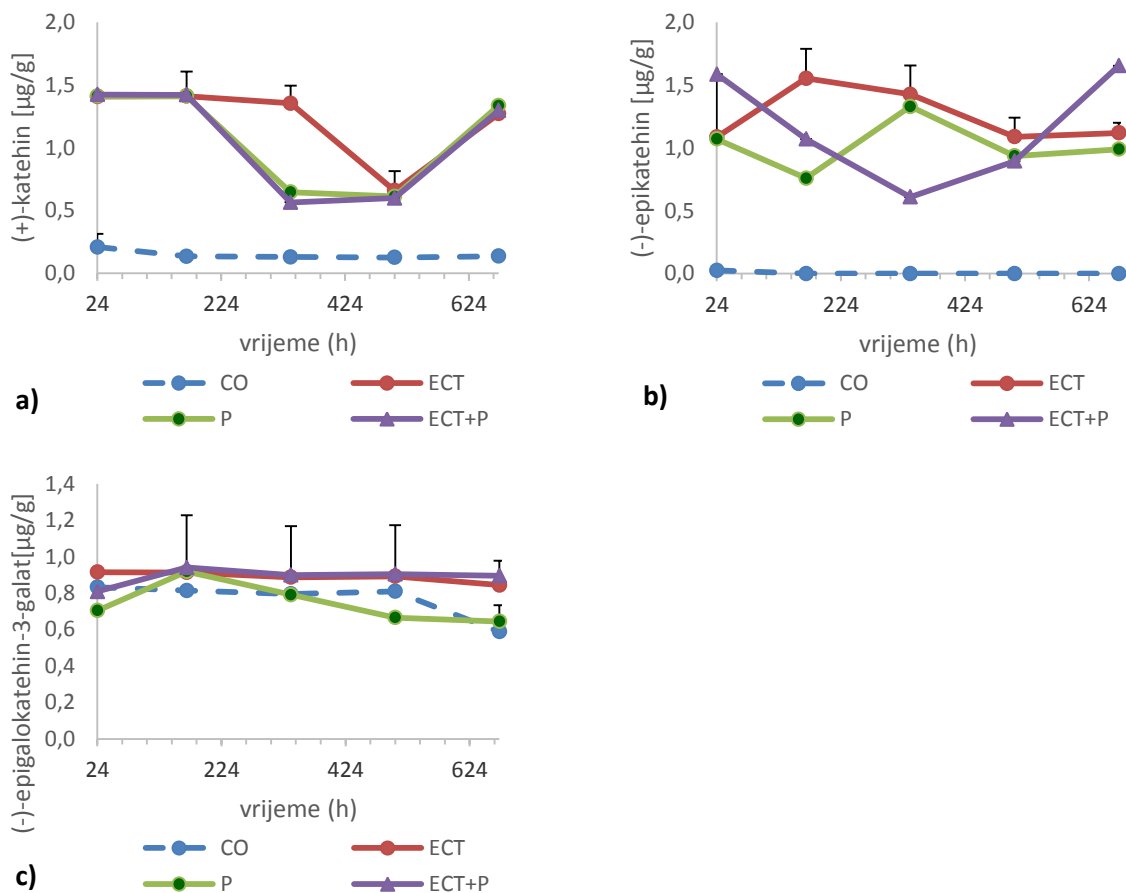
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u bubrezima pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke prikazani su u Tablici 54.

Tablica 54. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u bubrezima kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavan-3-ola detektirani u bubrezima; subkronična doza (1.-28. dan)	Skupina											
	CO			ECT			P			ECT+P		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
(+)-katehin	24±0	0,21±0,00	92,9±0,0	168±0	1,41±0,01*	776,2±1,4*	24±0	1,41±0,00	654,0±0,0	24±3	1,42±0,03	634,8±195,4
(-)-epikatehin	24±0	0,03±0,00	0,3±0,0	168±0	1,55±0,00*	848,4±0,4*	336±38	1,32±0,02	668,7±2,1	672±0	1,65±0,00	686,0±0,0
(-)-epigalokatehin-3-galat	24±0	0,83±0,00	514,9±0,0	24±0	0,91±0,00	589,1±0,0	168±0	0,91±0,55	500,7±138,4	168±29	0,94±0,14	592,8±72,6

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i proteinima sirutke u dozi od 700 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Za spojeve (+)-katehin i (-)-epigalokatehin-3-galata utvrđena je slična vremenska biodinamika kako kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine (ECT), tako i kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s visokoproteinskom dijetom (ECT+P). Najveća razlika u bioapsorpciji između skupina ECT i ECT+P utvrđena je za spoj (-)-epikatehin. Najveća bioapsorpcija u skupini ECT je utvrđena između 1. i 14. dana u umjerenom rasponu koncentracija cijelom cijelom trajanja obrade. Suprotno tome, u skupini ECT+P spoj (-)-epikatehin u vremenskom periodu od 1. do 14 dana doseže niske koncentracije nakon čega mu koncentracija do 28. dana raste do umjerenih koncentracija (Slika 59).



Slika 59. Farmakokinetika i koncentracije flavan-3-ola: a) (+)-katehina, b) (-)-epikatehina i c) (-)-epigalokatehin-3-galata u bubrezima C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i proteina sirutke (700 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

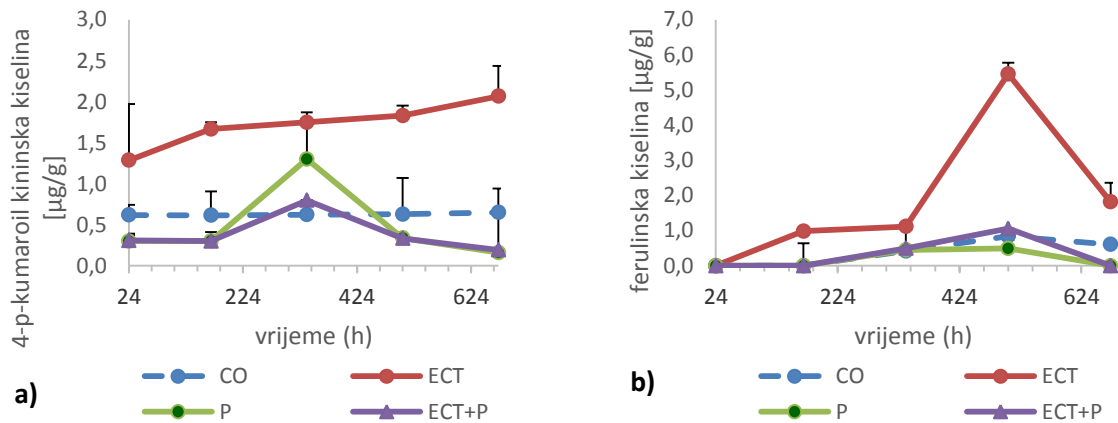
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u bubrezima pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke prikazani su u Tablici 55.

Tablica 55. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u bubrezima kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine fenolnih kiselina detektiranih u bubrezima; subkronična doza (1.-28. dan)	Skupina											
	CO			ECT			P			ECT+P		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
4- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	672±291	0,65±0,003	412,3±11,1	672±0	2,07±0,04*	1143,1±2,6*	336±0	1,30±0,01	341,6±25,9	336±37	0,79±0,01 <sup>▲</sup>	272,5±38,0 <sup>▲</sup>
ferulinska kiselina	504±277	0,84±0,56	261,6±212,79	504±0	5,45±0,00*	1354,5±0,3*	504±246	0,49±0,20	116,7±27,8	504±0	1,05±0,00 <sup>▲</sup>	172,0±0,0 <sup>▲</sup>

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i proteinima sirutke u dozi od 700 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Usporedbom bioapsorpcije fenolnih kiselina između skupina ECT i ECT+P (Slika 60), najveće razlike u koncentraciji uočene su za ferulinsku kiselinu koja nakon 14. dana obrade u skupini ECT doseže relativno visoke koncentracije za razliku od skupine ECT+P, nakon čega se u obje skupine nakon 21. dana obrade njena koncentracija smanjuje. Biodinamika 4-*p*-kumaroil kininske kiseline je do 14. dana između skupina ECT i ECT+P bila slična, nakon čega se u skupini ECT+P smanjuje, a skupini ECT povećava do relativno visokih koncentracija.



Slika 60. Farmakokinetika i koncentracije fenolnih kiselina: a) 4-*p*-kumaroil kininske, b) ferulinske kiseline u bubrezima C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i proteina sirutke (700 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

#### **4.3.2. UPLC analiza selektivne bioraspodjele apsorbiranih polifenolnih spojeva iz ekstrakta cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom mastima u tankom crijevu, jetri, mozgu i bubregu C57BL/6 miša**

Nakon subkroničnog doziranja ekstrakta cvijeta trnine i kolesterola (1.-28. dana), u tankom crijevu je ukupno detektirano 26 polifenolnih spojeva što čini 81,25% od ukupnog broja polifenolnih spojeva koje nalazimo u vodenom ekstraktu cvijeta trnine. Statistički značajno različit AUC i  $c_{\max}$  u tankom crijevu nakon subkronične obrade, uočen je za 9 polifenolnih spojeva kod skupine ECT+CHOL u odnosu na skupinu ECT što čini 28,1% od ukupnih spojeva pronađenih u ekstraktu cvijeta trnine i 34,6% od ukupno detektiranih spojeva u tankom crijevu.

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u tankom crijevu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i kolesterola prikazani su u Tablici 56.

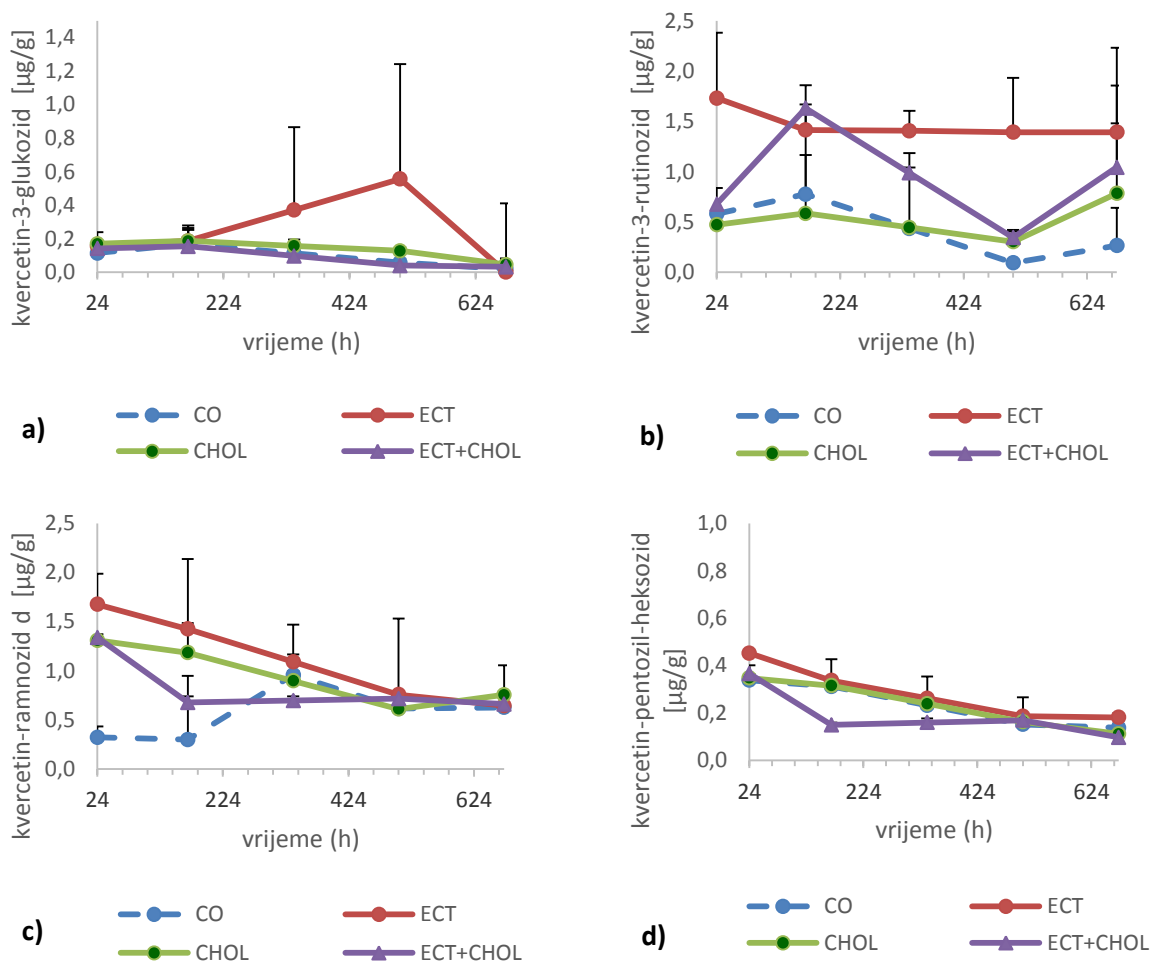
Tablica 56. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola unutar tankog crijeva kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom mastima tijekom 28 dana

Flavonoli detektirani u tankom crijevu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CHOL			ECT+CHOL		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)
izoramnetin-3-rutinozid	24±2	0,39±0,01	252,9±1,5	24±0	0,43±0,25	273,2±4,5	24±0	0,40±0,00	258,5±0,0	168±29	0,41±0,02	263,7±10,5
kvercetin-3-glukozid	168±0	0,17±0,00	63,9±10,2	504±19	0,56±0,05*	151,0±125,5*	168±0	0,18±0,00	93,3±0,5	168±83	0,15±0,01 <sup>▲</sup>	60,3±11 <sup>▲</sup>
kvercetin-3-rutinozid (rutin)	168±0	0,78±0,00	270,3±4,3	24±3	1,73±0,21*	952,0±120,8*	672±246	0,78±0,03	320,4±114,6	168±29	1,63±0,78	608,3±117,3
kvercetin-acetil-heksozid	672±291	0,52±0,01	219,2±23,8	672±0	0,67±0,39	429,9±0,9*	24±0	0,60±0,00	265,0±0,0	672±257	0,62±0,00	337,4±0,0
kvercetin-pentozid	168±83	1,37±0,07	654,5±19,2	24±0	1,94±1,03	814,6±8,0	24±0	1,76±0,00	699,1±0,0	24±0	2,05±0,49	671,9±123,0
kvercetin-pentozil-heksozid	24±8	0,34±0,01	152,3±13,9	24±0	0,45±0,04	179,9±10,2	24±0	0,34±0,4	154,0±125,4	24±0	0,36±0,04	114,8±10,2
kvercetin-ramnozid	336±83	0,96±0,10	387,7±11,8	24±8	1,68±0,95*	723,7±17,3*	24±97	1,30±0,70	608,1±131,2	24±0	1,33±0,04	504,9±28,8
kampferol-3-glukozid	168±83	0,16±0,00	93,5±2,1	168±0	0,30±0,17*	146,1±3,8*	168±0	0,19±0,00	98,6±0,0	24±8	0,18±0,0	88,2±6,6
kampferol-3-rutinozid	168±0	0,24±0,00	116,3±3,2	168±83	0,28±0,16	132,1±1,2	168±97	0,26±0,02	134,4±18,2	24±0	0,22±0,00	95,2±11,8
kampferol-pentozid	168±0	2,75±0,00	1344,3±6,0	24±0	5,29±2,91*	1559,4±74,7	24±0	2,81±0,00	1309,0±0,0	24±0	2,68±0,11 <sup>▲</sup>	1101,5±106,8
kampferol-3-O-ramnozid	168±0	0,00±0,00	0,0±0,0	672±0	0,06±0,00	9,9±0,0*	336±0	0,00±0,000	0,6±0,0	672±374	0,05±0,03	5,1±3,4
kampferol-ramnozil-heksozid	24±8	0,69±0,02	334,8±4,9	24±0	0,84±0,49	384,6±3,5	168±0	0,77±0,00	381,9±0,0	24±0	0,73±0,01	293,4±11,5
kampferol-acetil-heksozid	504±0	0,04±0,01	13,3±4,7	672±37	0,06±0,05	7,6±2,7	672±0	0,08±0,00	19,2±0,0	168±24	0,06±0,03	28,6±18,1 <sup>▲</sup>
kampferol-pentozil-heksozid	168±83	0,51±0,01	260,6±13,9	24±0	0,85±0,45*	329,4±10,2	168±0	0,61±0,00	291,7±0,0	24±0	0,57±0,02	229,0±22,6

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i kolesterolom u dozi od 140 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CHOL – kolesterol, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija.

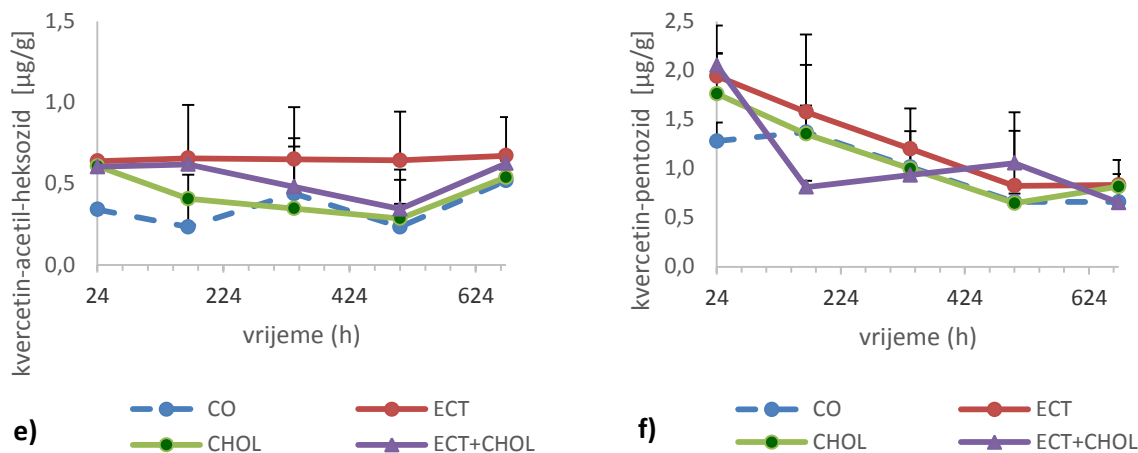


U tankom crijevu, među kvercetinским spojevima, kvercetin-3-glukozid, kvercetin-pentozil-heksozid i kvercetin-acetil-heksozid bili su unutar nižih apsorbiranih koncentracija, dok je koncentracija kvercetin-pentozida, kvercetin-ramnozid i kvercetin-3-rutinozida kretala unutar umjerenog raspona koncentracija. Između skupina obrađenih ekstraktom cvijeta trnine (ECT) i ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s kolesterolom (ECT+CHOL) uočena je slična biodinamika za sve spojeve kvercetina, izuzev kvercetin-rutinozida i kvercetin-3-glukozida (Slika 61).

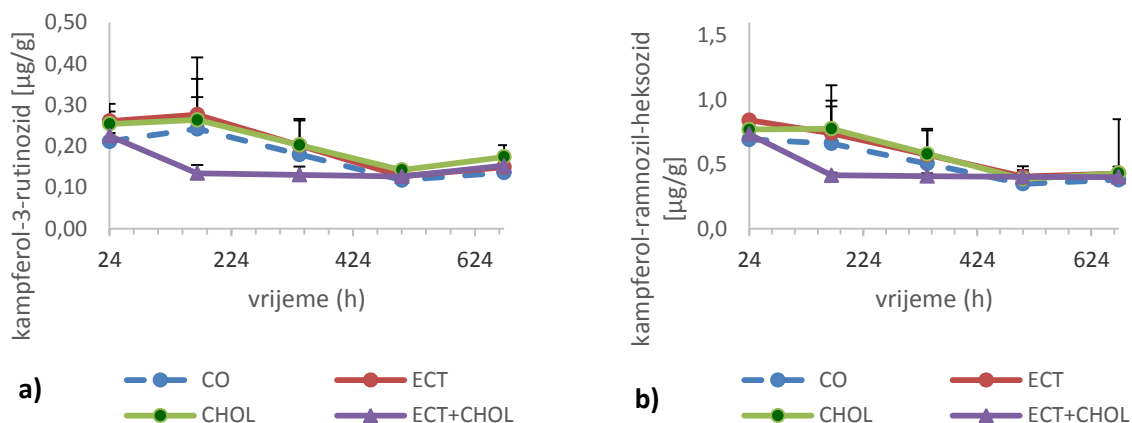


Slika 61. Farmakokinetika i koncentracije kvercetina: a) kvercetin-3-glukozida, b) kvercetin-3-rutinozida, c) kvercetin-ramnozida, d) kvercetin-pentozil-heksozida, e) kvercetin-acetil-heksozida i f) kvercetin-pentozida u u tankom crijevu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i kolesterola (140 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 61. nastavak

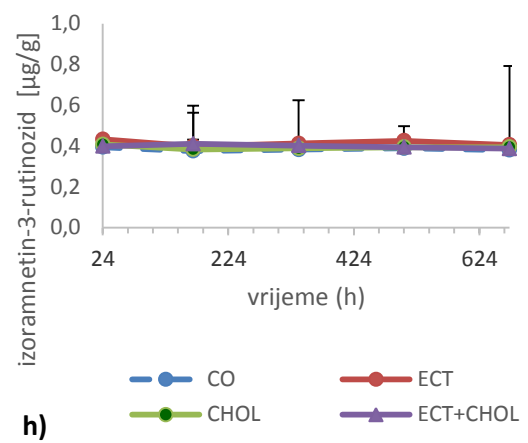
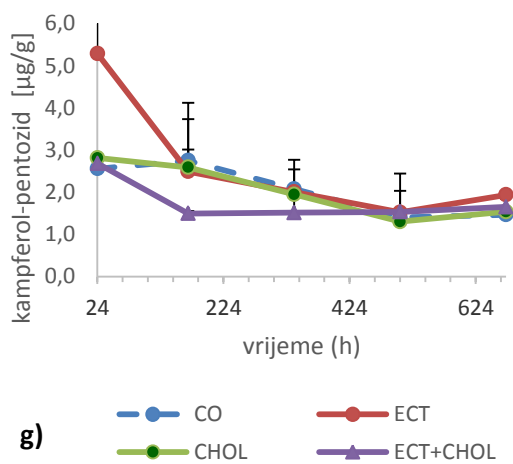
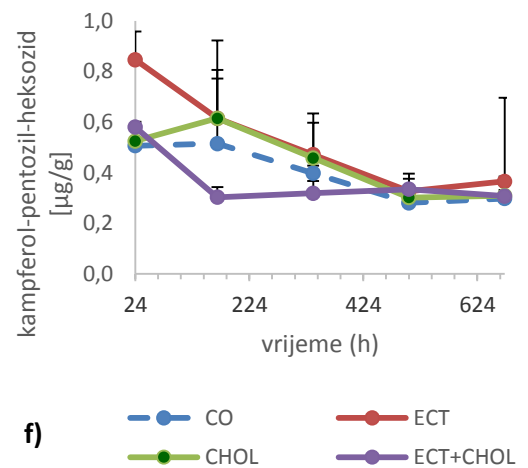
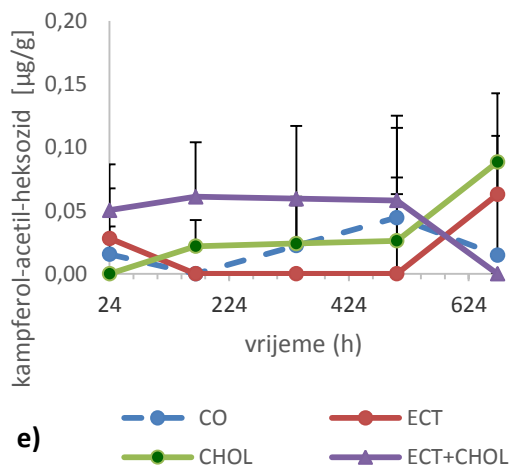
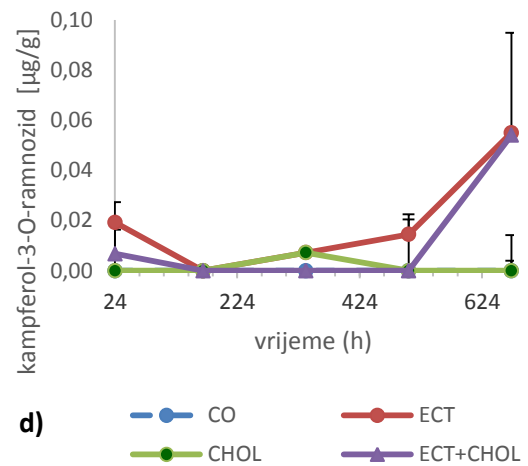
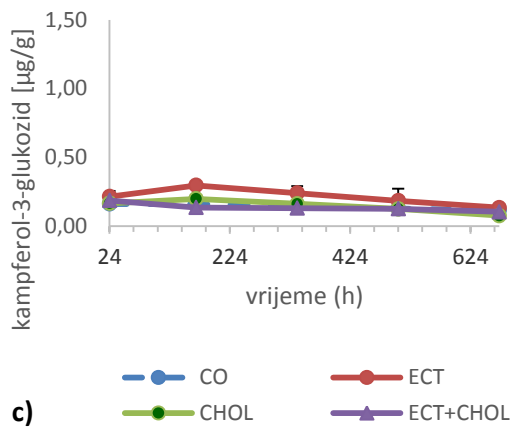


Slična vremenska biodinamika, te koncentracije koje su bile u niskom i vrlo koncentracijskom rasponu između skupina ECT i ECT+CHOL uočene su za sve detektirane spojeve kampferola, izuzev kampferol-pentozida čije su koncentracije bile u relativno visokom rasponu koncentracija tijekom svih 28. dana obrade (Slika 62).



Slika 62. Farmakokinetika i koncentracije kampferola: a) kampferol-3-rutinozida, b) kampferol-ramnozid-heksozida, c) kampferol-3-glukozida, d) kampferol-3-*O*-ramnozida, e) kampferol-acetil-heksozida, f) kampferol-pentozid-heksozida, g) kampferol-pentozida i h) izoramnetin-3-rutinozida u tankom crijevu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i kolesterola (140 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 62. nastavak



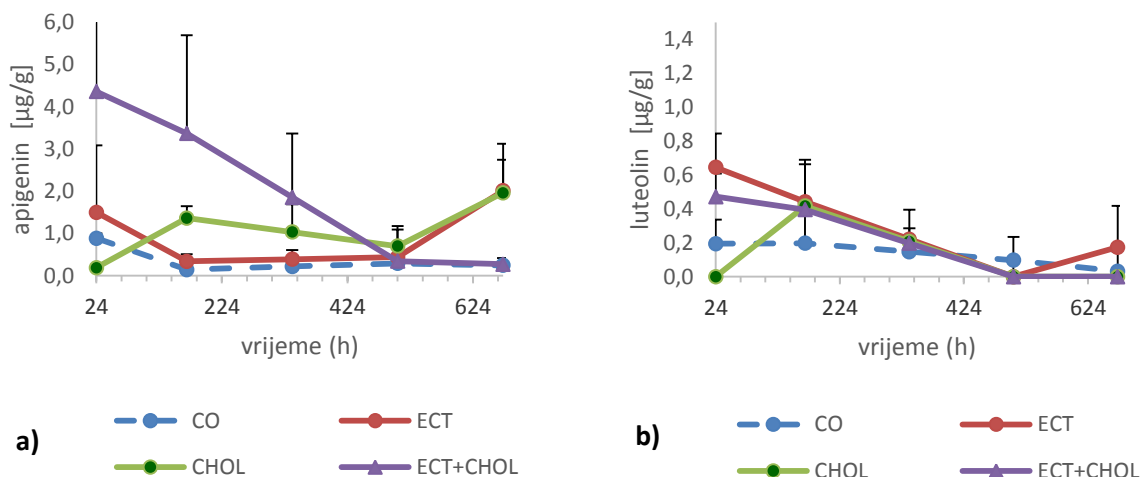
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u tankom crijevu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i kolesterola prikazani su u Tablici 57.

Tablica 57. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u tankom crijevu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom mastima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavona detektirani u tankom crijevu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CHOL			ECT+CHOL		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)
Apigenin	24±0	0,89±0,14	188,3±17,8	24±3	2,50±0,25*	523,9±72,5*	672±388	1,96±0,02	682,7±2,0	24±8	4,36±1,4	1235,4±419,7 <sup>▲</sup>
Luteolin	168±83	0,20±0,10	89,5±19,2	24±3	0,64±0,28*	171,8±30,6*	168±0	0,41±0,09	80,4±24,0	24±8	0,47±0,12	115,8±31,4

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i kolesterolom u dozi od 140 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CHOL – kolesterol, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija.

Uspoređujući biodinamiku flavona apigenina između skupine ECT i skupine ECT+CHOL, utvrđeno je da se koncentracija apigenina u skupini ECT+CHOL od 1. do 21. dana obrade s blagom tendencijom pada kretala u relativno visokim koncentracijama u odnosu na skupinu ECT. Biodinamika luteolina je kod obje skupine vrlo slična, a vrijednost koncentracija se kretala u vrlo niskom koncentracijskom rasponu kroz svih 28. dana obrade (Slika 63).



Slika 63. Farmakokinetika i koncentracije flavona: a) apigenina, b) luteolina u tankom crijevu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i kolesterola (140 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

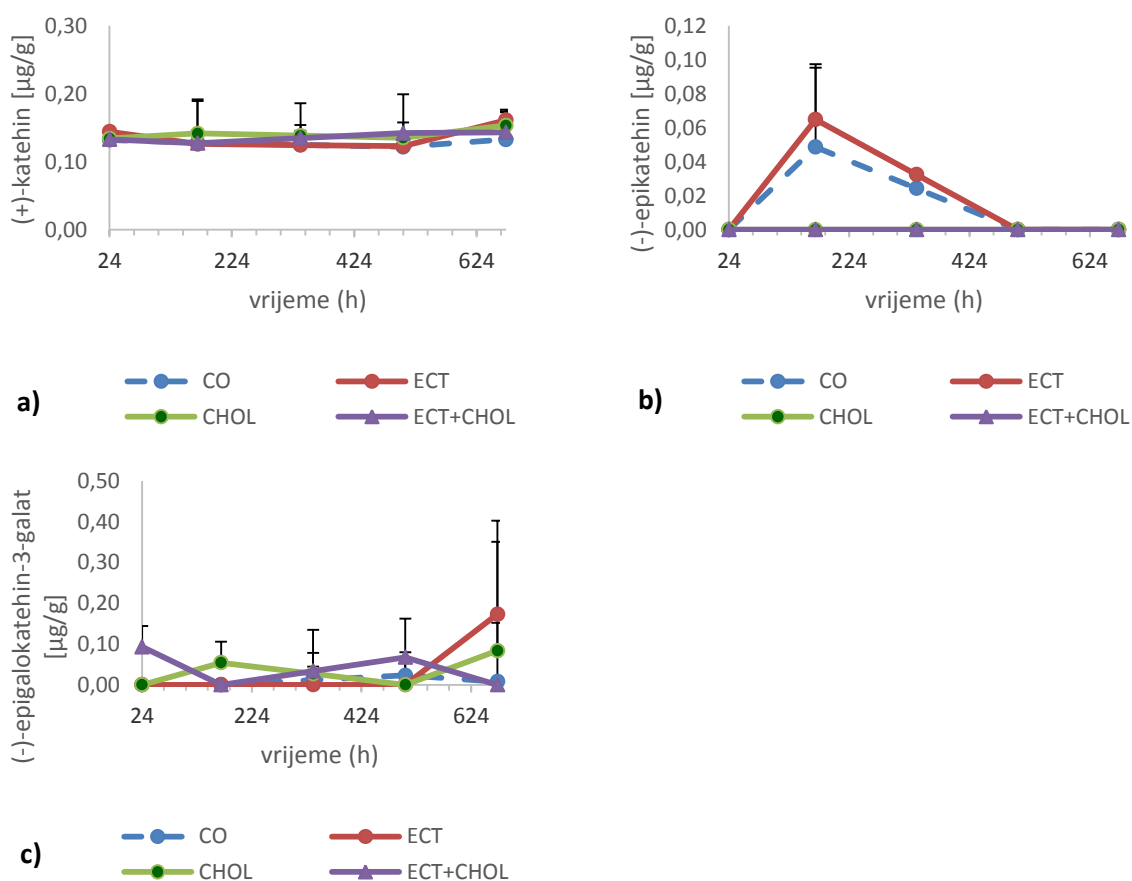
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u tankom crijevu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i kolesterola prikazani su u Tablici 58.

Tablica 58. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u tankom crijevu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom mastima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavan-3-ola detektirani u tankom crijevu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CHOL			ECT+CHOL		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
(+)-katehin	672±374	0,13±0,00	83,5±0,5	672±0	0,16±0,09	86,8±1,5	672±83	0,15±0,00	92,1±11,2	672±97	0,14±0,01	89,5±3,1
(-)-epikatehin	168±97	0,05±0,04	9,4±1,1	168±0	0,06±0,03	12,5±0,0	-	<LOD	-	-	<LOD <sup>▲</sup>	-
(-)-epigalokatehin-3-galat	504±291	0,02±0,00	6,3±0,8	672±0	0,17±0,02*	14,5±13,9*	672±0	0,08±0,00	19,7±1,5	24±2	0,09±0,07	19,1±2,6

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i kolesterolom u dozi od 140 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SD$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CHOL – kolesterol, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Uspoređujući biodinamiku spojeva iz skupine flavan-3-ola (Slika 64), vidljivo je da se za spoj (+)-katehin biodinamika između skupine ECT+CHOL i ECT nije značajno razlikovala. Nadalje, vrijednosti koncentracija (-)-epikatehina je kod skupine ECT+CHOL tijekom cijelog obrade iznosila nula u odnosu na skupinu ECT. Za spoj (-)-epigalokatehin-3-galat uočena je najveća razlika u biodinamici između skupina ECT+CHOL i ECT. Naime, koncentracija (-)-epigalokatehin-3-galata kod skupine ECT+CHOL bilježi najveće koncentracije nakon 1. dana obrade nakon čega se njegova koncentracija do 7. dana smanjuje, te do 21. dana raste, nakon čega se ponovno do 28. dana smanjuje. Suprotno tome, u skupini ECT njegova koncentracija sve do 21. dana iznosi nula, nakon čega se vrijednost koncentracije do 28. dana obrade povećava. Koncentracije svih navedenih spojeva iz skupine flavan-3-ola kretale su se u vrlo niskom rasponu koncentracija.



Slika 64. Farmakokinetika i koncentracije flavan-3-ola: a) (+)-katehina, b) (-)-epikatehina i c) (-)-epigalokatehin-3-galata u ovisnosti o vremenu u tankom crijevu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i kolesterola (140 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u tankom crijevu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trine i kolesterola prikazani su u Tablici 59.

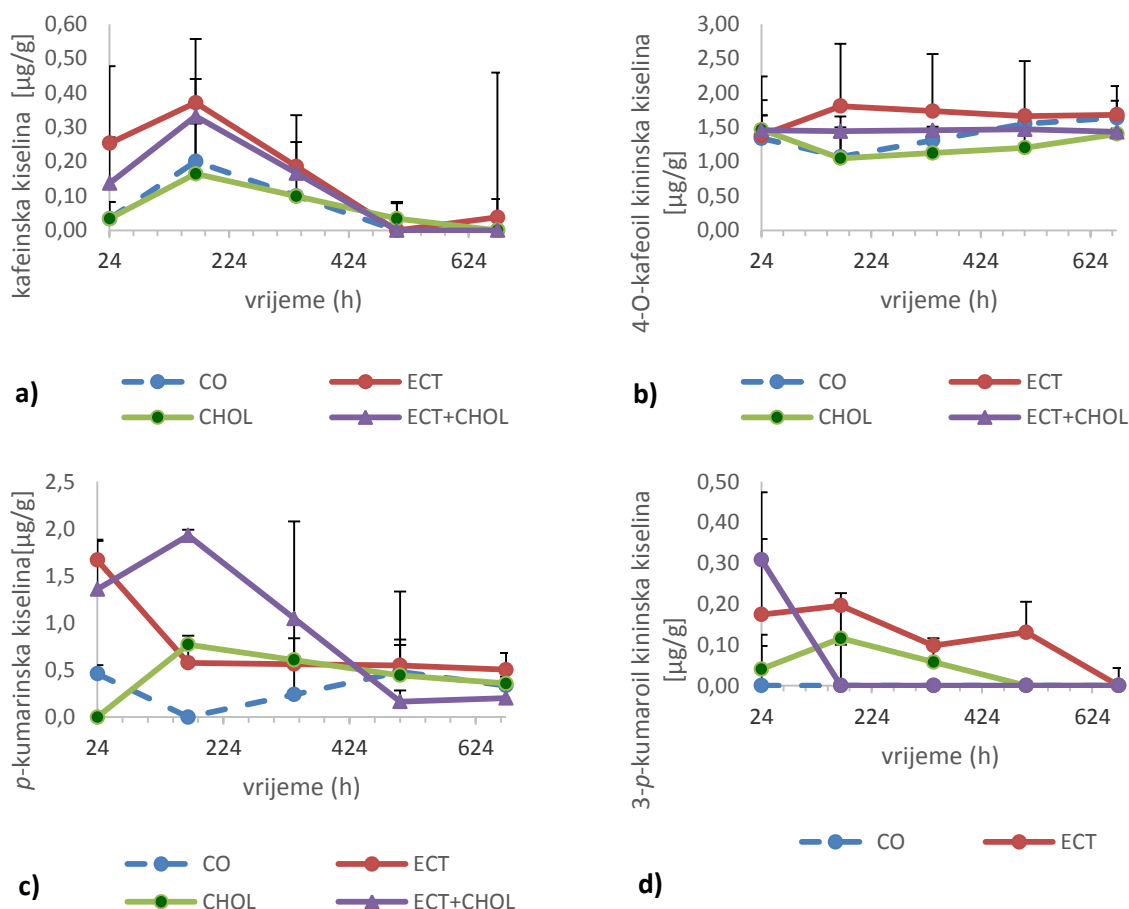
Tablica 59. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u tankom crijevu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trine u kombinaciji s prehranom obogaćenom mastima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine fenolnih kiselina detektiranih u tankom crijevu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CHOL			ECT+CHOL		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
3- <i>O</i> -feruloil kininska kiselina	168±83	0,62±0,13	211,9±37,3	168±37	4,61±0,42*	768,4±6,3*	24±0	0,62±0,00	204,2±0,0	24±3	0,31±0,23 <sup>▲</sup>	123,5±11,4 <sup>▲</sup>
3- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	24±8	0,00±0,05	0,0±16,2	168±14	0,20±0,02	71,8±14,4*	168±0	0,11±0,00	25,7±0,0	24±0	0,30±0,20	3,7±1,4 <sup>▲</sup>
4- <i>O</i> -kafeoil kininska kiselina	672±374	1,64±0,10	896,5±83,2	168±34	1,81±1,17	1110,1±25,4	24±0	1,46±0,00	793,7±0,0	504±0	1,46±0,00	958,8±0,0
4- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	24±0	1,22±0,05	627,7±4,2	504±97	2,16±1,27*	1095,0±27,8*	672±0	2,06±0,24	830,2±160,7	504±277	1,19±0,46	636,7±291,0
kafeinska kiselina	168±0	0,20±0,05	41,6±17,4	168±0	0,37±0,21*	111,8±13,9*	168±0	0,16±0,00	46,7±0,0	168±0	0,33±0,10	75,7±28,4
ferulinska kiselina	504±0	1,04±0,30	368,3±61,5	24±2	1,68±0,95*	740,9±9,7*	504±374	0,87±0,22	442,3±113,8	168±83	2,34±0,44	795,8±188,0
galna kiselina	24±0	1,28±0,67	215,1±96,7	168±0	2,21±1,27*	575,2±12,6*	168±0	0,87±0,00	201,4±0,0	672±381	0,29±0,43	140,3±93,7 <sup>▲</sup>
<i>p</i> -kumarinska kiselina	504±277	0,48±0,14	186,7±37,4	24±0	1,67±0,94*	444,9±6,3*	168±0	0,76±0,00	324,6±0,0	168±83	1,92±0,07	606,1±35,6 <sup>▲</sup>

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trine u dozi od 25 mg/kg/dan i kolesterolom u dozi od 140 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trine, CHOL – kolesterol, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija.

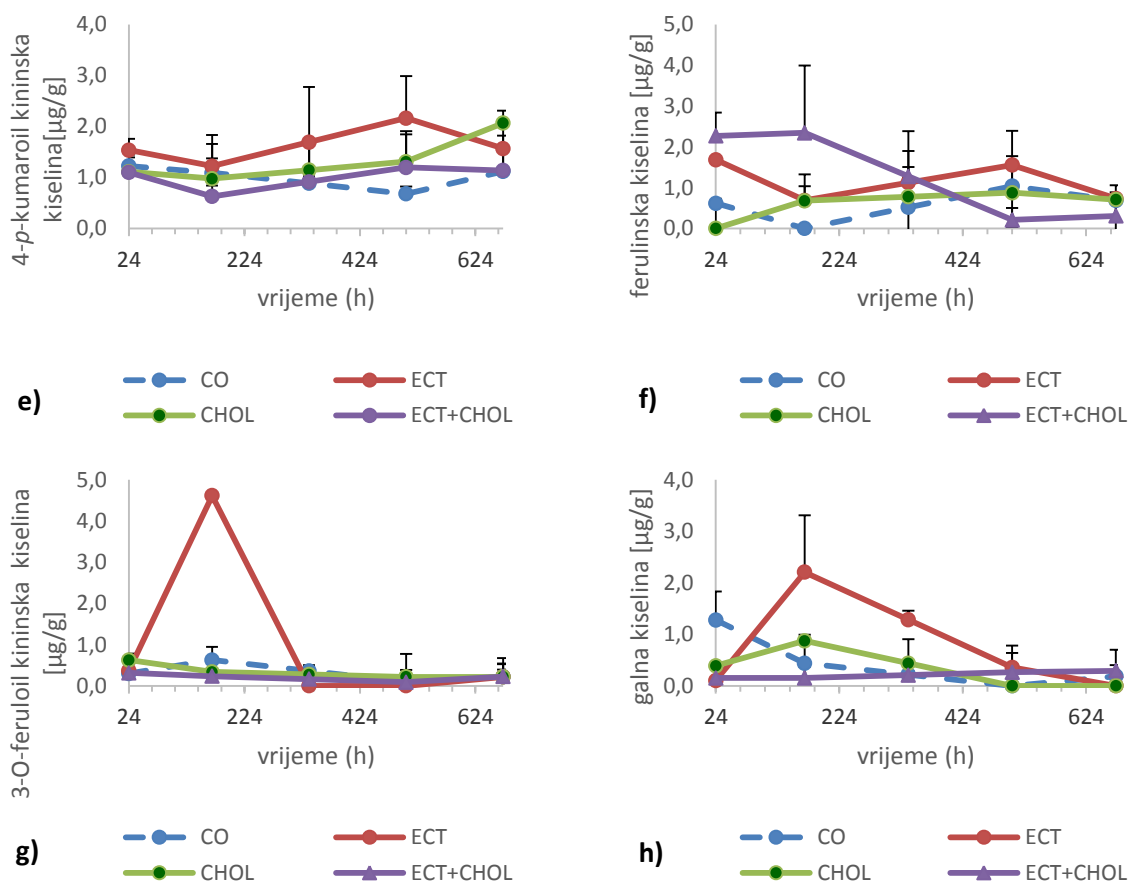


Koncentracija većine fenolnih kiselina je u usporedbi sa spojevima iz skupine flavonola i flavan-3-ola bila u umjerenom i relativno visokom rasponu koncentracija (Slika 65). Najveće koncentracije u skupini ECT+CHOL uočene su za 4-*O*-kafeoil kininsku tijekom svih 28.dna obrade, te *p*-kumarinsku i ferulinsku kiselinu do 14. dana obrade u odnosu na skupinu ECT. Biodinamika kafeinske i 4-*p*-kumaroil kininske kiseline između skupina ECT+CARB i ECT je bila slična s time da su u skupini ECT uočene više vrijednosti bioapsorbiranih koncentracija. Bioapsorpcija 3-*p*-kumaroil kininske, 3-*O*-feruloil kininske i galne kiseline je bila niska tijekom svih 28. dana obrade i kretala se u vrlo niskim koncentracijama.



Slika 65. Farmakokinetika i koncentracije fenolnih kiselina: a) kafeinske, b) 4-*O*-kafeoil kininske, c) *p*-kumarinske, d) 3-*p*-kumaroil kininske, e) 4-*p*-kumaroil kininske, f) ferulinske, g) 3-*O*-feruloil kininske i h) galne kiseline u tankom crijevu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i kolesterola (140 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija.

Slika 65. nastavak



Nakon subkroničnog doziranja ekstrakta cvijeta trnine i kolesterola, u jetri je ukupno detektrano 26 polifenolnih spojeva što čini 81,25% od ukupnog broja polifenolnih spojeva koje nalazimo u vodenom ekstraktu cvijeta trnine. Statistički značajno različit AUC i  $c_{\text{max}}$  u jetri, uočen je za 9 polifenolnih spojeva kod skupine ECT+CHOL u odnosu na skupinu ECT što čini 28,1% od ukupnih spojeva pronađenih u ekstraktu cvijeta trnine i 34,6% od ukupno detektiranih spojeva u jetri.

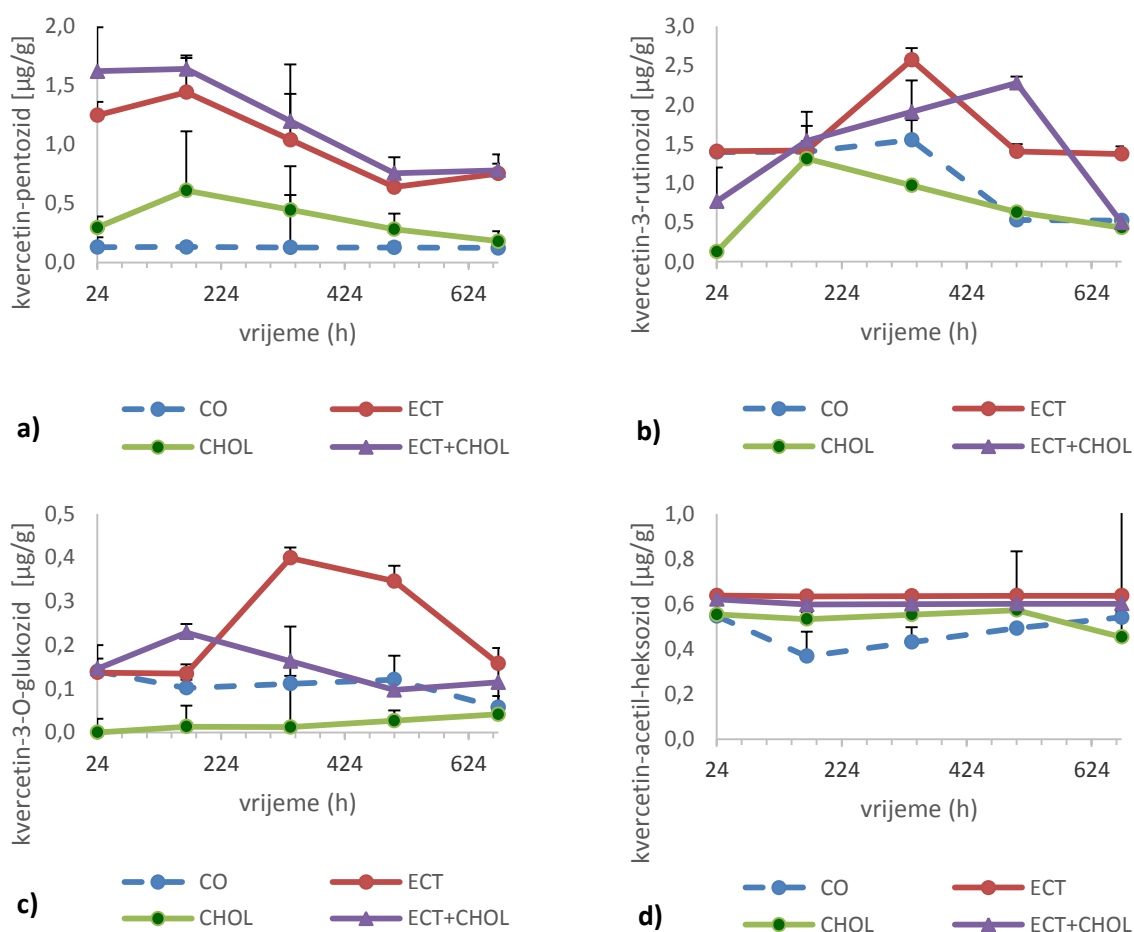
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u jetri pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i kolesterola prikazani su u Tablici 60.

Tablica 60. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u jetri kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom mastima tijekom 28 dana

Flavonoli detektirani u jetri; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CHOL			ECT+CHOL		
	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (μg/g)	AUC (h·μg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (μg/g)	AUC (h·μg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (μg/g)	AUC (h·μg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (μg/g)	AUC (h·μg/g)
izoramnetin-3-rutinozid	168±29	0,39±0,00	248,0±1,2	168±83	0,41±0,00	265,4±0,2	672±193	0,44±0,02	262,3±1,1	168±193	0,42±0,03	269,4±0,7
kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	24±0	0,14±0,00	70,6±0,8	336±277	0,40±0,00*	168,6±0,1*	672±0	0,04±0,04	12,2±2,0	168±0	0,22±0,02	100,4±0,6
kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid (rutin)	336±83	1,55±0,32	715,1±78,9	336±83	2,57±0,03*	1113,1±0,6*	168±0	1,31±0,06	517,7±2,3	504±0	2,27±0,03	1014,1±8,2
kvercetin-acetil-heksozid	24±3	0,55±0,00	302,8±2,5	24±3	0,64±0,00	419,2±0,2	504±0	0,57±0,26	356,2±65,7	24±2	0,62±0,00	397,4±1,5
kvercetin-pentozid	168±0	0,13±0,00	84,2±1,1	168±83	1,44±0,02*	670,0±1,6*	168±83	0,60±0,03	254,5±12,0	168±83	1,63±0,03	780,2±4,1
kvercetin-pentozil-heksozid	168±0	0,36±0,00	157,7±0,8	168±0	0,47±0,06	207,5±0,2	168±0	0,14±0,01	43,9±0,5	168±83	0,38±0,01	190,1±0,7
kvercetin-ramnozid	168±0	1,31±0,00	606,7±1,6	168±0	1,39±0,01	635,4±1,0	168±0	0,63±0,06	281,5±2,9	168±0	1,33±0,02	632,5±0,3
kampferol-3-glukozid	24±0	0,16±0,00	71,6±0,4	168±0	0,26±0,01	108,3±0,3	24±8	0,06±0,00	26,3±0,4	168±83	0,18±0,01	91,7±0,5
kampferol-3-rutinozid	24±8	0,23±0,01	114,9±0,8	168±0	0,29±0,00*	140,8±0,1*	168±0	0,13±0,01	59,4±0,8	24±8	0,25±0,01	126,4±0,4
kampferol-pentozid	168±0	2,60±0,00	1243,4±1,1	168±0	2,69±0,00	1382,3±1,0	168±0	1,28±0,08	564,7±3,6	24±8	2,85±0,01	1360,7±5,0
kampferol-3- <i>O</i> -ramnozid	168±34	0,03±0,00	8,0±1,1	168±0	0,12±0,02*	26,2±0,5*	24±13	LOD	0,0±0,1	168±83	0,05±0,02 <sup>▲</sup>	13,5±0,6 <sup>▲</sup>
kampferol-ramnozil-heksozid	168±83	0,70±0,00	330,5±1,5	168±0	0,80±0,00	374,2±0,5	168±0	0,27±0,05	142,5±2,2	168±0	0,77±0,05	377,8±1,8
kampferol-acetil-heksozid	168±96	0,02±0,00	4,1±0,8	168±0	0,07±0,00*	13,4±0,0*	504±0	0,12±0,00	37,0±0,5	24±3	0,08±0,02	23,2±0,9

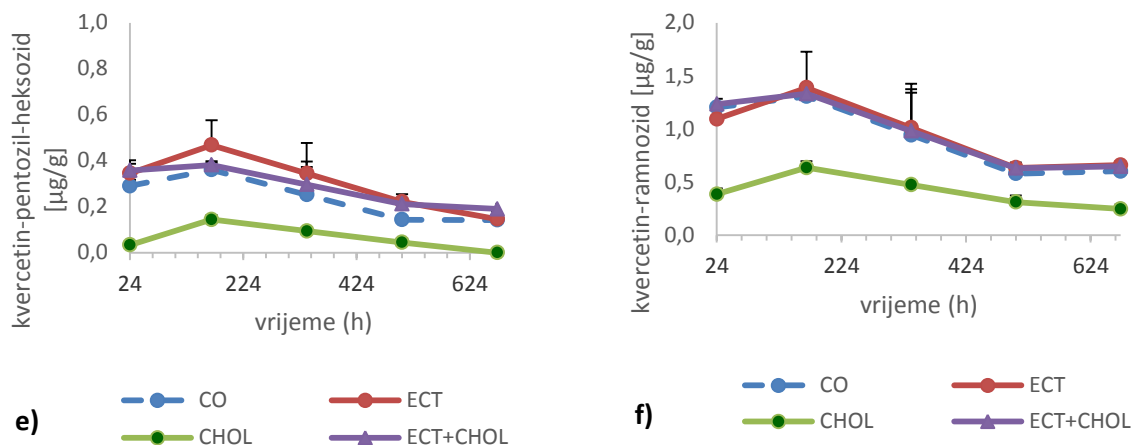
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i kolesterolom u dozi od 140 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CHOL – kolesterol, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija.

Od kvercetinских spojeva u jetri, najveće koncentracije u skupini ECT+CHOL uočene su za spojeve kvercetin-pentozid, kvercetin-3-*O*-rutinozid i kvercetin-ramnozid. Vrijednost koncentracija bioapsorpcije za spojeve kvercetin-pentozid i kvercetin-ramnozid se kretala unutar umjerenog raspona koncentracija svih 28. dana obrade, dok se vrijednosti umjerenih koncentracija postignutih između 1. i 7. dana za spoj kvercetin-3-*O*-rutinozid do 28. dana smanjuju prema vrlo niskom rasponu koncentracija. Za ostale metabolite kvercetina uočena je slična biodinamika, a vrijednosti bioapsorbiranih koncentracija se kretala u vrlo niskom rasponu koncentracija. Farmakokinetika kvercetinских spojeva u jetri miša C57BL/6 prikazana je na Slici 66.

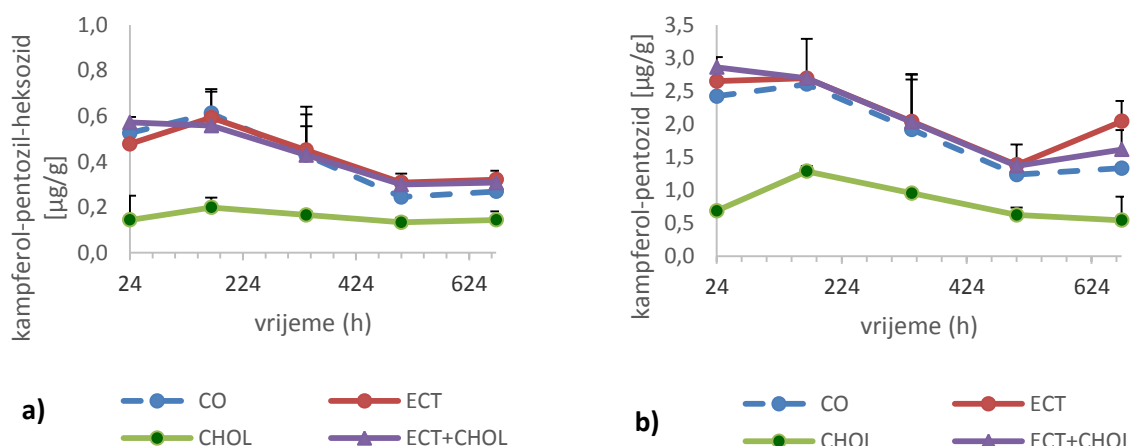


Slika 66. Farmakokinetika i koncentracije kvercetina: a) kvercetin-pentozida, b) kvercetin-3-*O*-rutinozida, c) kvercetin-3-*O*-glukozida, d) kvercetin-acetil-heksozida, e) kvercetin-pentozil-heksozida i f) kvercetin-ramnozida u jetri C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i kolesterola (140 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 66. nastavak

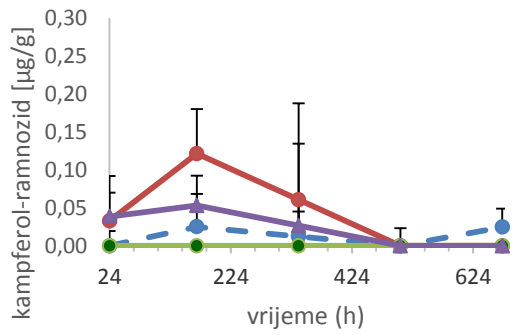


Među kampferolnim spojevima, najveća bioapsorpcija u relativno visokim koncentracijama u skupini ECT+CHOL uočena je za kampferol-pentozid. Za ostale spojeve kampferola također je uočena slična biodinamika, a vrijednosti bioapsorbiranih koncentracija su se kretale u niskom rasponu koncentracija (Slika 67).

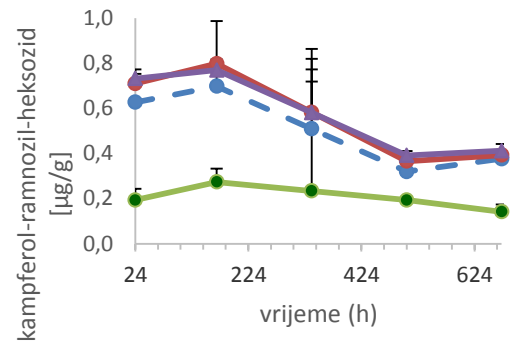


Slika 67. Farmakokinetika i koncentracije kampferola: a) kampferol-pentozil-heksozida, b) kampferol-pentozida, c) kampferol-ramnozida, d) kampferol-ramnozid-heksozida, e) kampferol-3-glukozida, f) kampferol-3-rutinozida, g) kampferol-acetil-heksozida i h) izoramnetin-3-rutinozida u jetri C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i kolesterola (140 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

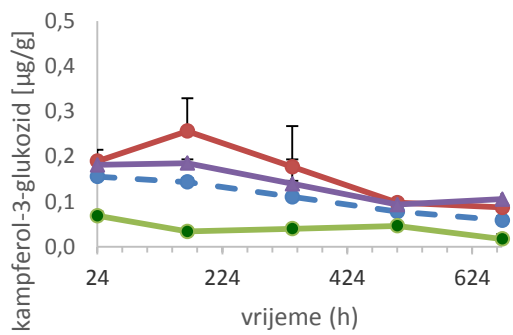
Slika 67. nastavak



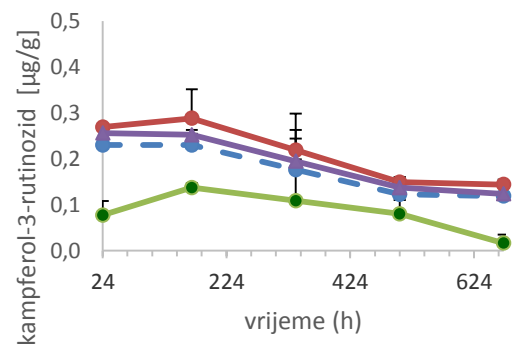
c) CO ECT  
CHOL ECT+CHOL



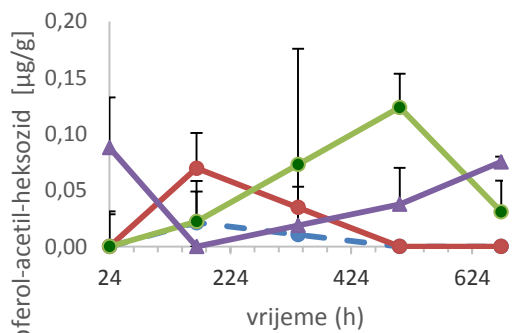
d) CO ECT  
CHOL ECT+CHOL



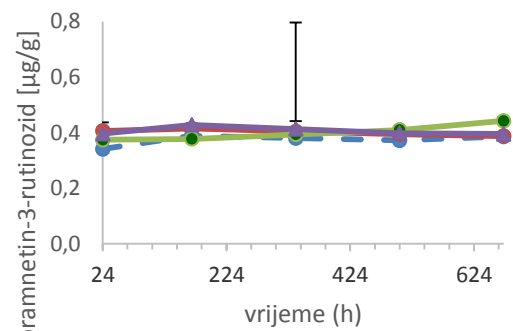
e) CO ECT  
CHOL ECT+CHOL



f) CO ECT  
CHOL ECT+CHOL



g) CO ECT  
CHOL ECT+CHOL



h) CO ECT  
CHOL ECT+CHOL

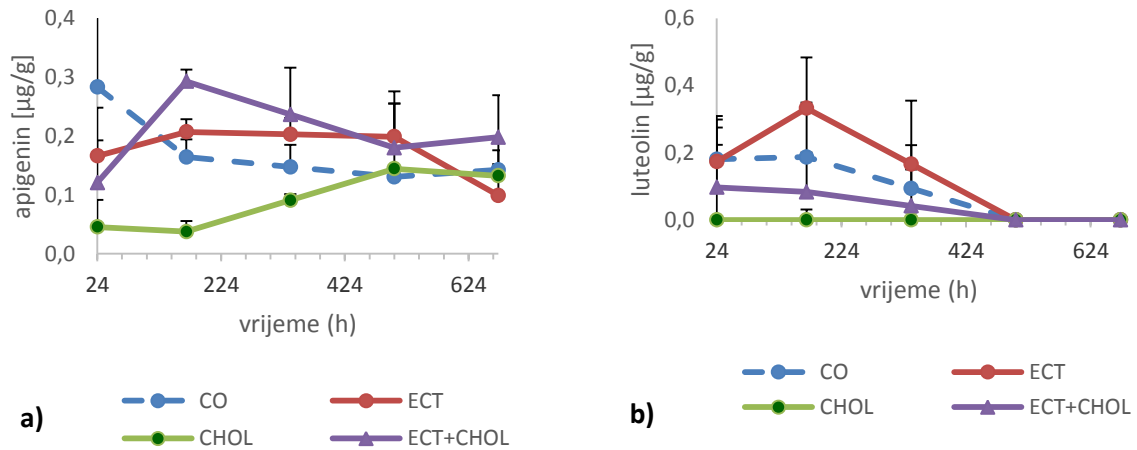
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u jetri pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i kolesterola prikazani su u Tablici 61.

Tablica 61. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u jetri kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom mastima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavona detektirani u jetri; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CHOL			ECT+CHOL		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC (h· $\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC (h· $\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC (h· $\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC (h· $\mu\text{g/g}$ )
Apigenin	24±8	0,28±0,01	107,2±0,9	24±8	0,28±0,01	107,2±0,9	504±0	0,14±0,01	60,4±3	168±29	0,29±0,02 <sup>▲</sup>	142±2,6 <sup>▲</sup>
Luteolin	168±83	0,19±0,00	51,3±3,3	168±83	0,19±0,01	51,3±3,3	24±0	0,08±0,03	23,2±1	24±9	0,09±0,01 <sup>▲</sup>	24,2±3,0 <sup>▲</sup>

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i kolesterolom u dozi od 140 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SD$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CHOL – kolesterol, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija.

U jetri, koncentracija bioapsorpcije flavona apigenina se u skupini ECT+CHOL kretala unutar vrlo niskog raspona koncentracija i to u nešto većim vrijednostima u odnosu na skupinu ECT. Također, koncentracija bioapsorpcije luteolina također je bila unutar vrlo niskog raspona koncentracija. Farmakokinetika flavona u jetri miša C57BL/6 prikazana je na Slici 68.



Slika 68. Farmakokinetika i koncentracije flavona: a) apigenina, b) luteolina u jetri C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i kolesterola (140 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u jetri pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i kolesterola prikazani su u Tablici 62.

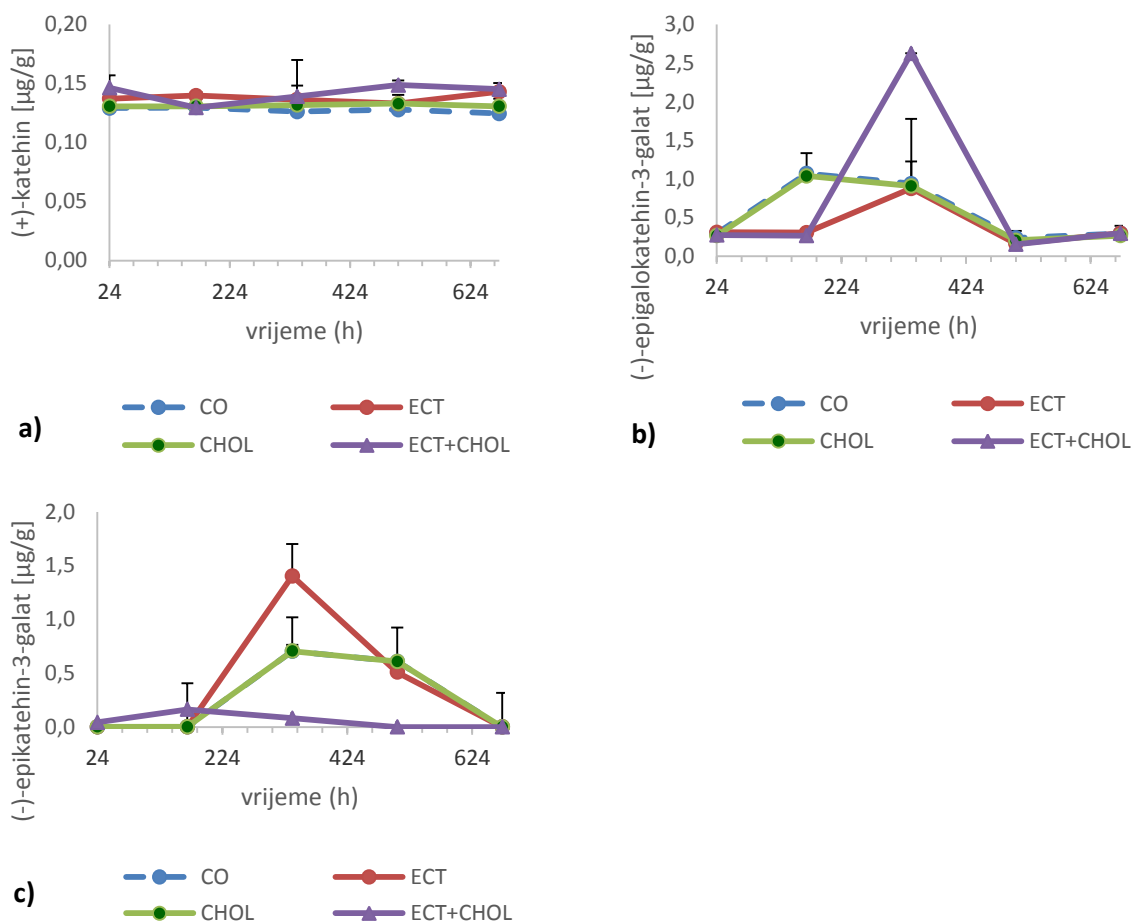


Tablica 62. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u jetri kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom mastima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavan-3-ola detektirani u jetri; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CHOL			ECT+CHOL		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
(+)-katehin	168±37	0,13±0,00	84,1±0,1	672±29	0,14±0,00	90,5±0,0	504±96	0,13±0,00	86,8±0,1	504±277	0,14±0,00	93,0±0,2
(-)-epikatehin-3-galat	336±193	0,70±0,00	169,2±2,4	336±0	1,40±0,00*	265,9±0,0*	336±0	0,70±0,00	169,6±0,0	168±0	0,16±0,00	35,4±0,0 <sup>▲</sup>
(-)-epigalokatehin-3-galat	168±193	1,07±0,25	400,0±61,5	336±0	0,88±0,00	256,6±0,0	168±0	1,03±0,00	379,2±0,0	336±0	2,62±0,00 <sup>▲</sup>	468,9±0,0

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i kolesterolom u dozi od 140 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CHOL – kolesterol, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija.

Farmakokinetika detektiranih flavan-3-ola prikazana je na slici 69. Bioapsorpcija (+)-katehina i (-)-epikatehin-3-galata se kretala tijekom svih 28. dana obrade u vrlo niskom rasponu koncentracija. Suprotno tome, relativno visoke vrijednosti bioapsorbiranih koncentracija u skupini ECT+CHOL uočene su za spoj (-)-epigalokatehin-3-galat između 7. i 21. dana obrade.



Slika 69. Farmakokinetika i koncentracije flavan-3-ola: a) (+)-katehina, b) (-)-epigalokatehin-3-galata i c) (-)-epikatehin-3-galata u jetri C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i kolesterola (140 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

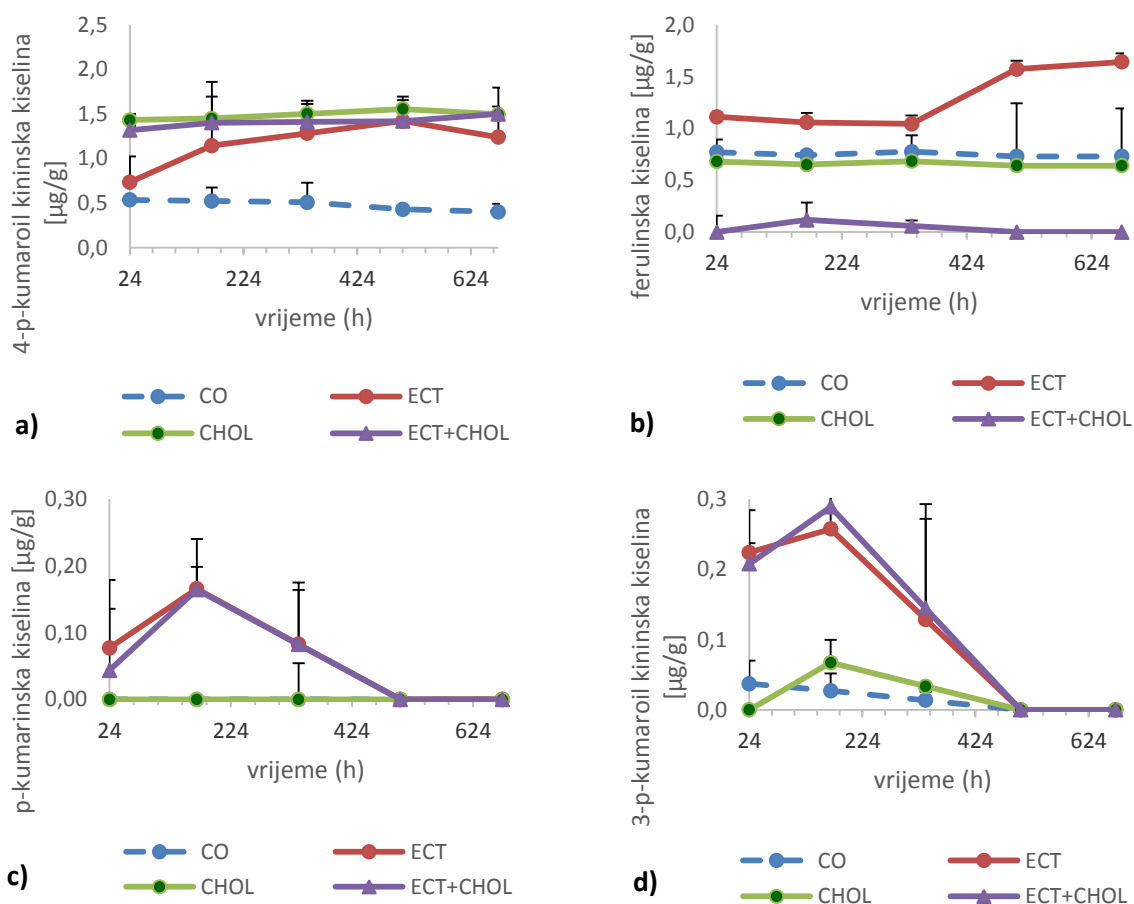
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u jetri pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i kolesterola prikazani su u Tablici 63.

Tablica 63. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u jetri kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom mastima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine fenolnih kiselina detektiranih u jetri; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CHOL			ECT+CHOL		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)
3- <i>O</i> -feruloil kininska kiselina	504±290	0,21±0,03	34,9±9,0	24±2	0,45±0,09*	81,0±4,6*	672±0	0,39±0,03	119,2±0,6	672±374	0,28±0,07	38,7±0,2 <sup>▲</sup>
3- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	24±8	0,04±0,00	8,3±0,7	168±0	0,26±0,00*	68,5±0,1*	168±0	0,06±0,00	13,0±0,7	168±0	0,28±0,07	73,2±17,0
4- <i>O</i> -kafeoil kininska kiselina	504±96	1,42±0,00	710,6±0,5	672±0	1,59±0,00	963,9±1,7	504±340	1,55±0,05	985,4±2,4	672±374	1,52±0,08	930,5±2,4
4- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	24±1	0,54±0,01	317,5±2,8	504±193	1,42±0,00*	798,1±0,2*	24±1	0,98±0,10	539,4±15,3	504±256	2,13±0,01	1266,2±15,3
ferulinska kiselina	336±83	0,77±0,00	494,6±0,4	672±290	1,64±0,02	835,8±3,6	336±0	0,68±0,00	435,2±0,0	168±96	0,11±0,02 <sup>▲</sup>	22,7±4,8 <sup>▲</sup>
galna kiselina	672±0	0,58±0,01	76,9±8,8	672±387	1,31±0,19*	110,1±16,2	24±3	0,15±0,03	1,8±0,9	24±8	3,04±0,45 <sup>▲</sup>	400,6±36,5 <sup>▲</sup>
kafeinska kiselina	504±0	0,24±0,00	54,5±0,2	504±277	1,79±0,15*	479,4±39,1*	168±0	0,03±0,00	7,3±0,3	504±0	0,19±0,00 <sup>▲</sup>	113,3±0,0 <sup>▲</sup>
<i>p</i> -kumarinska kiselina	24±0	LOD	0,0±0,0	168±83	0,17±0,03	38,4±0,0*	24±0	LOD	0,0 ±0,000	168±83	0,16±0,04	35,4±0,7

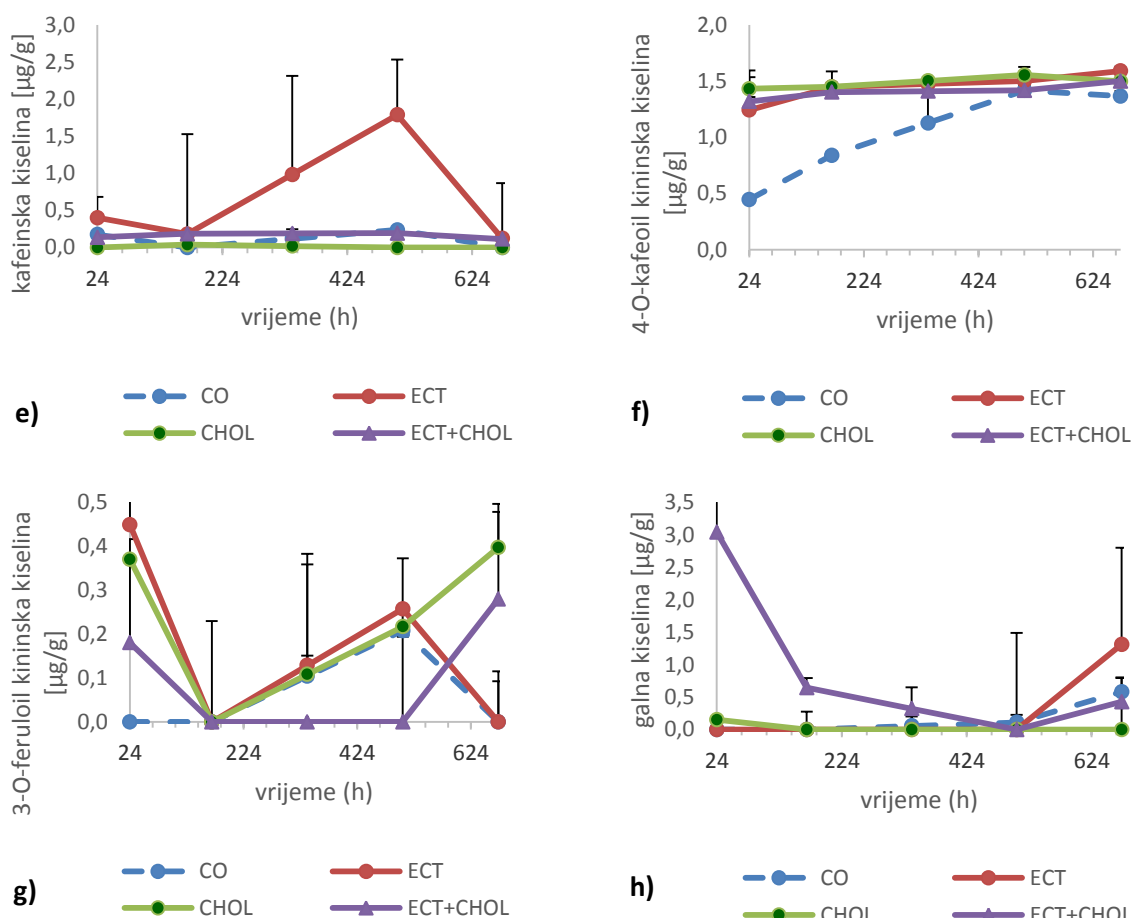
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i kolesterolom u dozi od 140 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CHOL – kolesterol, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija.

Farmakokinetika detektiranih fenolnih kiselina prikazana je na Slici 70. Vrijednosti bioapsobiranih koncentracija fenolnih kiselina u jetri skupina ECT+CHOL se uglavnom kretala u umjerenom i vrlo niskom rasponu koncentracija. Ravnomjerene koncentracije bioapsorpcije uočene su za *p*-kumaroil kininsku i 4-*O*-kafeoil kininsku kiselinu tijekom svih 28. dana obrade, dok se vrijednost bioapsorpcije galne kiseline prvog dana obrade kretala u relativno visokom rasponu koncentracija nakon čega joj se koncentracija do 7. dana obrade smanjuje do vrlo niskog koncentracijskog raspona.



Slika 70. Farmakokinetika i koncentracije fenolnih kiselina: a) 4-*p*-kumaroil kininske, b) ferulinske, c) *p*-kumarinske, d) 3-*p*-kumaroil kininske, e) kafeinske, f) 4-*O*-kafeoil kininske, g) 3-*O*-feruloil kininske i h) galne kiseline u tankom crijevu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i kolesterola (140 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija.

Slika 70. nastavak



Nakon subkroničnog doziranja ekstrakta cvijeta trnine i kolesterola, u mozgu je ukupno detektirano 62,5% ( $N=20/32$ ) polifenolnih spojeva od ukupnog broja polifenolnih spojeva koje nalazimo u čistom ekstraktu cvijeta trnine. Statistički značajno različit AUC i  $c_{\text{max}}$  kod skupine ECT+CHOL u usporedbi sa skupinom ECT uočen za 7 spojeva što čini 21,87% od ukupnih spojeva pronađenih u ekstraktu cvijeta trnine i 35% od ukupno detektiranih spojeva u mozgu.

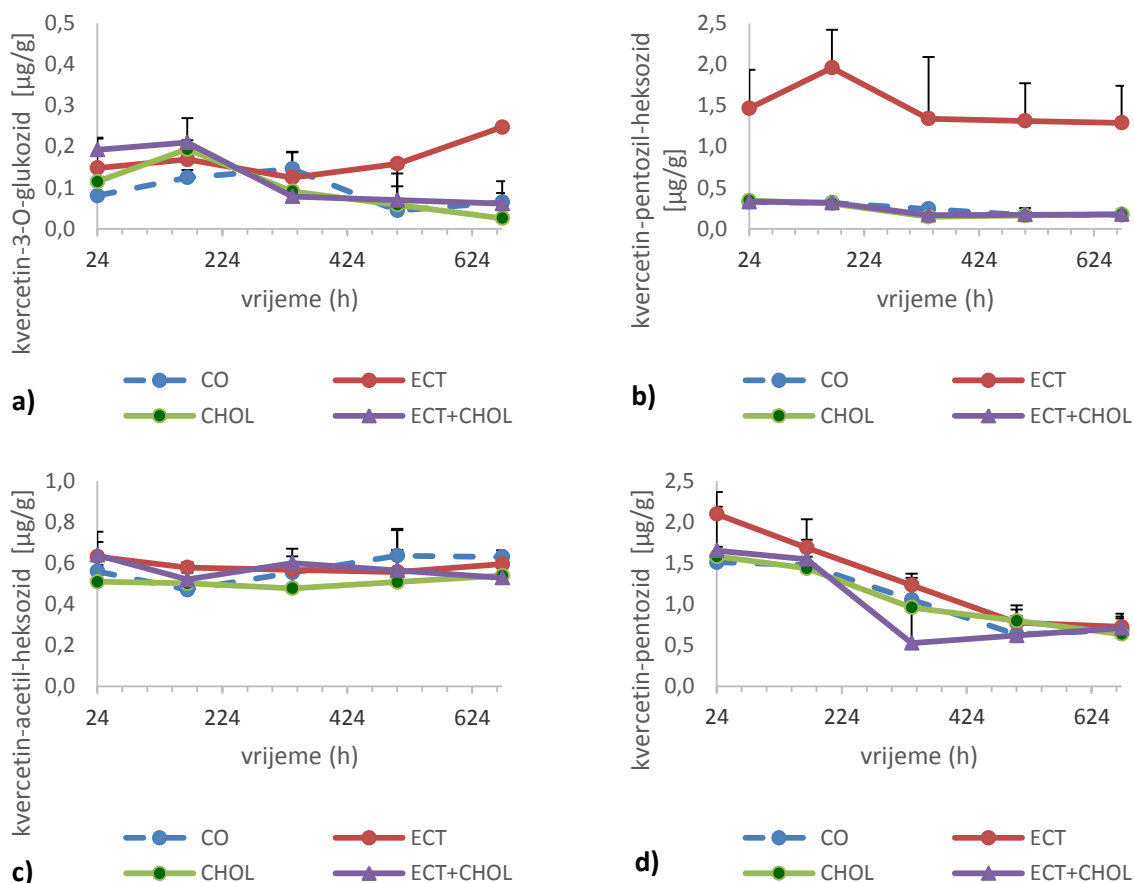
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u mozgu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i kolesterola prikazani su u Tablici 64.

Tablica 64. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u mozgu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom mastima tijekom 28 dana

Flavonoli detektirani u mozgu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CHOL			ECT+CHOL		
	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)
izoramnetin-3-rutinozid	504±83	0,68±0,02	425,9±4,0	672±0	2,92±0,01*	1136,4±0,58*	336±277	0,41±0,00	267,4±7,9	672±374	0,40±0,23	257,5±7,6
kvercetin-3-glukozid	24±8	0,32±0,03	158,0±78,6	168±83	1,96±0,04*	979,0±8,31*	168±0	0,19±0,02	65,4±7,0	168±0	0,21±0,13	77,1±10,2
kvercetin-3-O-rutinozid (rutin)	24±8	1,51±0,22	692,0±146,8	24±0	2,09±0,26	830,0±28,8	168±29	1,57±1,17	479,9±265,7	168±19	1,78±1,55	919,2±68,0
kvercetin-acetil-heksozid	504±97	0,63±0,00	373,0±15,8	24±0	0,63±0,01	382,0±17,02	672±340	0,53±0,01	331,5±59,5	24±2	0,63±0,36	374,2±20,2
kvercetin-pentozid	24±3	1,28±0,15	394,0±55,08	336±0	2,84±0,04*	1306,0±74,0*	24±8	1,57±0,09	700,4±66,0	24±8	1,65±1,11	616,2±142,6
kvercetin-pentozil-heksozid	336±0	0,14±0,01	62,0±6,8	672±0	0,24±0,03*	107,0±5,5*	24±0	0,34±0,00	141,8±8,4	24±0	0,32±0,18 <sup>▲</sup>	147,2±5,3 <sup>▲</sup>
kvercetin-ramnozid	24±8	0,65±0,04	294,6±15,7	336±0	0,73±0,01	416,7±5,5	24±8	0,13±0,02	57,2±30,9	168±83	1,29±0,12 <sup>▲</sup>	553,4±12,3 <sup>▲</sup>
kampferol-3-glukozid	168±83	2,58±0,04	1295,6±22,8	168±0	2,64±0,05	1326,7±17,6	168±83	0,22±0,10	89,2±24,0	168±83	0,19±0,12	83,5±12,3
kampferol-3-rutinozid	24±0	0,06±0,01	33,0±5,3	672±0	0,28±0,00*	147,0±1,3*	24±83	0,23±0,01	107,7±8,5	168±83	0,23±0,14	115,6±5,0
kampferol-pentozid	168±0	0,24±0,06	108,2±11,6	168±0	0,19±0,00	89,6±0,5	168±83	2,67±0,02	1205,5±30,1	24±0	2,56±1,48	1224,5±48,0
kampferol-ramnozil-heksozid	672±0	0,39±0,06	258,0±1,57	168±0	0,43±0,02	265,7±3,5	24±8	0,07±0,03	32,6±22,6	24±8	0,69±0,42	316,1±1,6

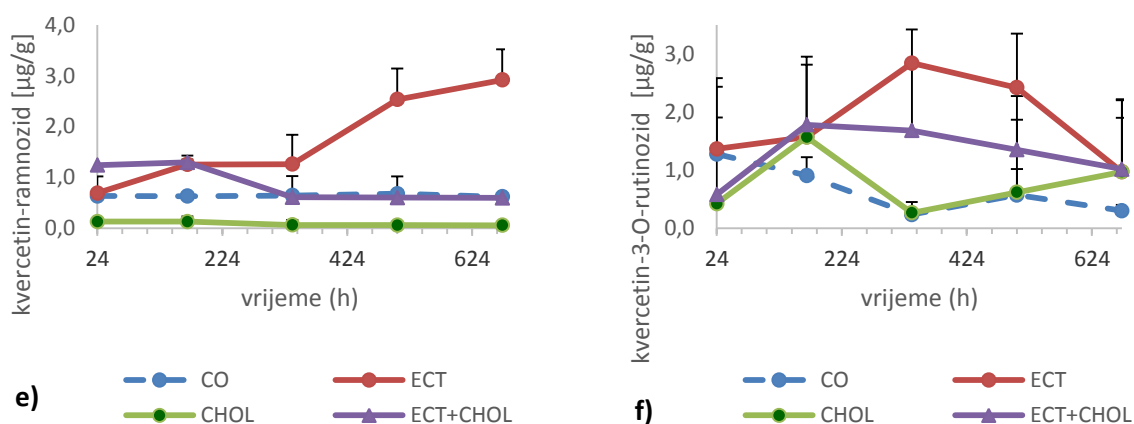
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i kolesterolom u dozi od 140 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CHOL – kolesterol, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija.

Vrijednosti bioapsorbiranih koncentracija kvercetinских spojeva u mozgu (Slika 71) se u skupini ECT+CHOL uglavnom kretala u umjerenom i niskom rasponu koncentracija. Najveće koncentracije bioapsorpcije utvrđene su za spojeve kvercetin-pentozid i kvercetin-ramnozid (između 1. i 14. dana), a za kvercetin-3-*O*-rutinozid između 1. i 7. dana.

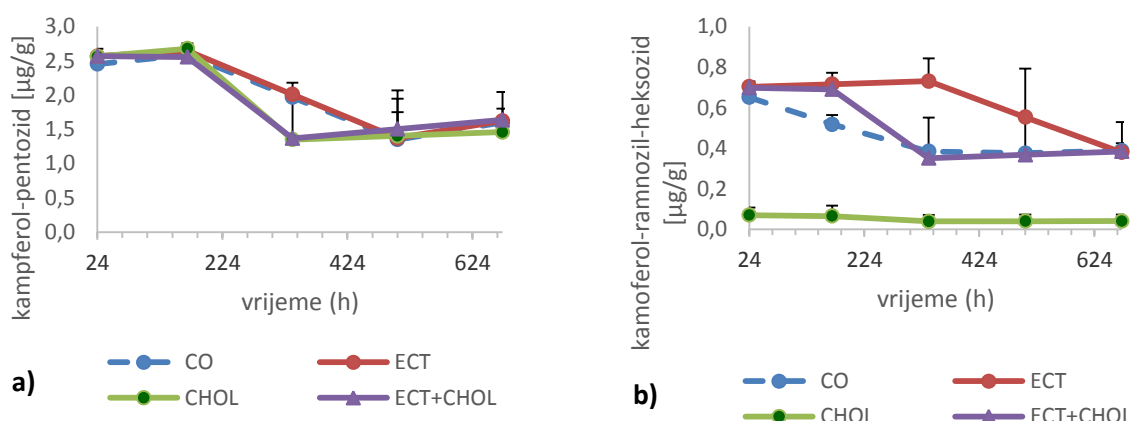


Slika 71. Farmakokinetika i koncentracije metabolita kvercetina: a) kvercetin-3-*O*-glukozida, b) kvercetin-pentozil-heksozida, c) kvercetin-acetil-heksozida, d) kvercetin-pentozida, e) kvercetin-ramnozida i f) kvercetin-3-*O*-rutinozida u mozgu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i kolesterola (140 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija.

Slika 71. nastavak



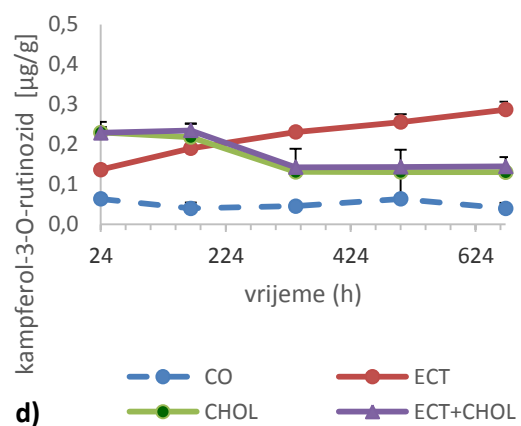
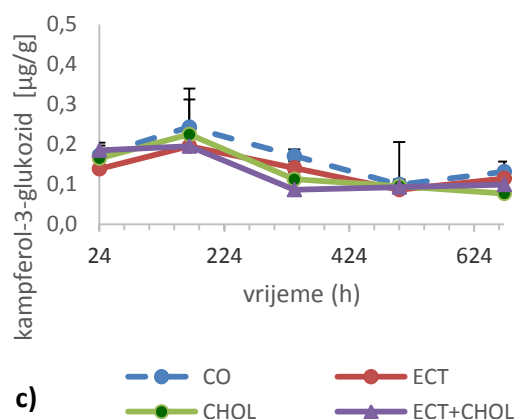
Među kampferolnim spojevima, najveća vrijednost bioapsorbiranih koncentracija u skupini ECT+CHOL uočena je za spoj kampferol-pentozid tijekom svih 28. dana obrade, dok se vrijednost ostalih bioapsorbiranih koncentracija kretala unutar niskog i vrlo niskog raspona (Slika 72).



Slika 72. Farmakokinetika i koncentracije kampferola: a) kampferol-pentozida, b) kampferol-ramnozid-heksozida, c) kampferol-3-glukozida i d) kampferol-3-rutinozida u mozgu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i kolesterola (140 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.



Slika 72. nastavak



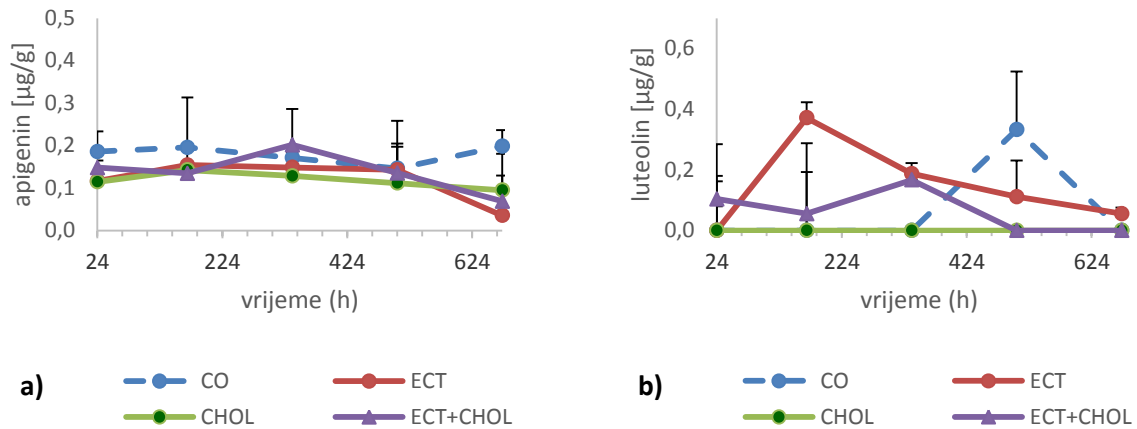
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u mozgu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i kolesterola prikazani su u Tablici 65.

Tablica 65. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u mozgu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom mastima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavona detektirani u mozgu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CHOL			ECT+CHOL		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
Apigenin	672±83	0,19±0,07	116±21,3	168±0	0,15±0,00	83,8±4,3	168±19	0,14±0,02	80,1±12,6	336±277	0,20±0,13	95,0±27,1
Luteolin	504±83	0,33±0,03	27,9±3,4	168±0	0,37±0,00	109,8±0,0*	-	<LOD	-	336±14	0,16±0,01 <sup>▲</sup>	31,0±12,9 <sup>▲</sup>

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i kolesterolom u dozi od 140 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SD$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CHOL – kolesterol, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

U mozgu, koncentracija bioapsorpcije flavona apigenina se u skupini ECT+CHOL kretala unutar vrlo niskog raspona koncentracija i to u nešto većim vrijednostima u odnosu na skupinu ECT. Također, koncentracija bioapsorpcije luteolina također je bila unutar vrlo niskog raspona koncentracija (Slika 73).



Slika 73. Farmakokinetika i koncentracije flavona: a) apigenina, b) luteolina u mozgu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i kolesterola (140 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

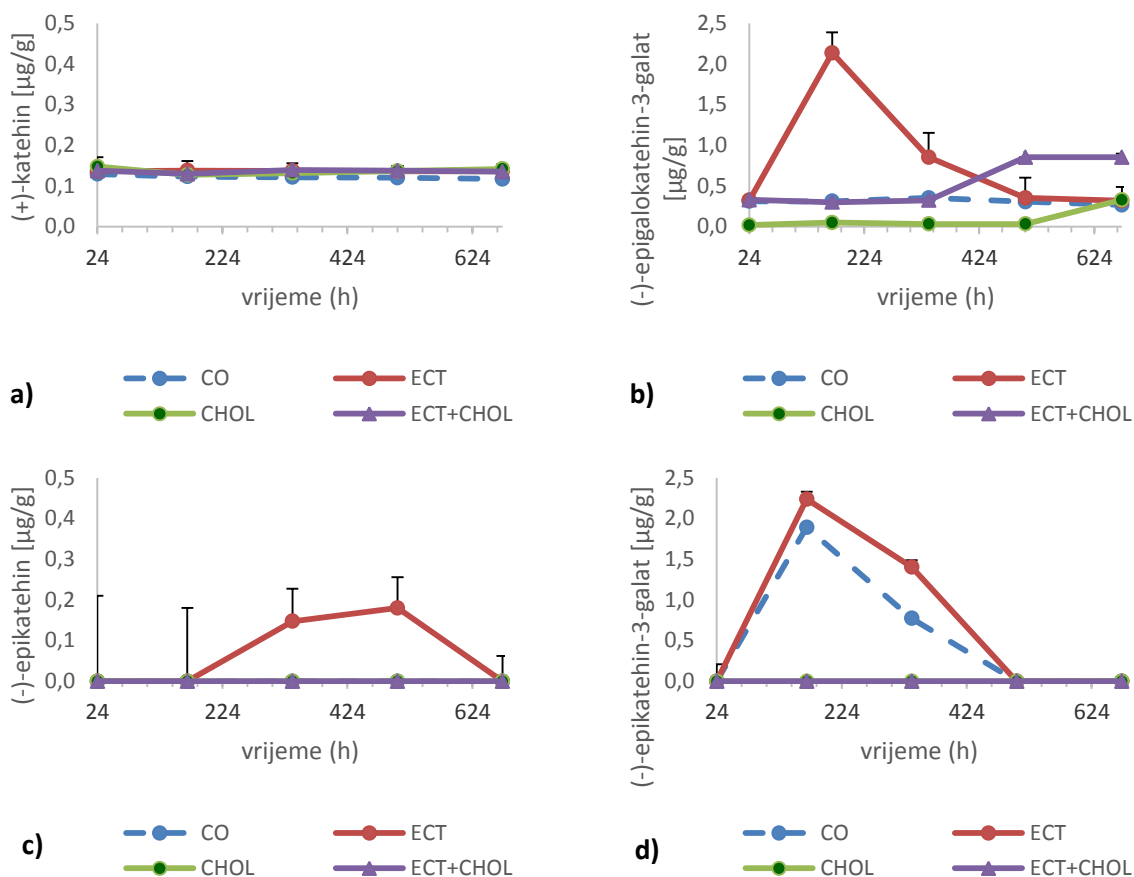
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u mozgu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i kolesterola prikazani su u Tablici 66.

Tablica 66. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u mozgu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom mastima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavan-3-ola detektirani u mozgu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CHOL			ECT+CHOL		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
(+)-katehin	24±374	0,12±0,05	80,4±1,17	168±37	0,13±0,00	90,3±1,17	24±3	0,14±0,03	89,2±3,5	336±246	0,14±0,08	89,7±1,6
(-)-epikatehin	-	<LOD	-	504±0	0,18±0,00	39,9±0,0*	24±0	LOD	0,0±0,0	24±0	LOD <sup>▲</sup>	0,0±0,0 <sup>▲</sup>
(-)-epikatehin-3-galat	168±0	1,89±0,00	346,2±0,0	168±0	12,23±0,00	461,6±0,0	24±0	LOD	0,0±0,0	24±0	LOD <sup>▲</sup>	0,0±0,0 <sup>▲</sup>
(-)-epigalokatehin-3-galat	336±0	0,35±0,00	207,7±0,0	168±0	2,13±0,00	567,6±0,0*	672±0	0,32±0,00	48,0±0,0	504±388	0,85±0,00 <sup>▲</sup>	343,8±3,7

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i kolesterolom u dozi od 140 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SD$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CHOL – kolesterol, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Biodinamika katehinskih molekula u skupini ECT+CHOL bila je slična i kretala se u vrlo niskom rasponu koncentracija (Slika 74). Najveća koncentracija u umjerenom rasponu bioapsorbiranih koncentracija uočena je za spoj (-)-epigalokatehin-3-galat između 21. i 28. dana obrade.



Slika 74. Farmakokinetika i koncentracije flavan-3-ola: a) (+)-katehina, b) (-)-epigalokatehin-3-galata, c) (-)-epikatehina i d) (-)-epikatehin-3-galata u mozgu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i kolesterola (140 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija.

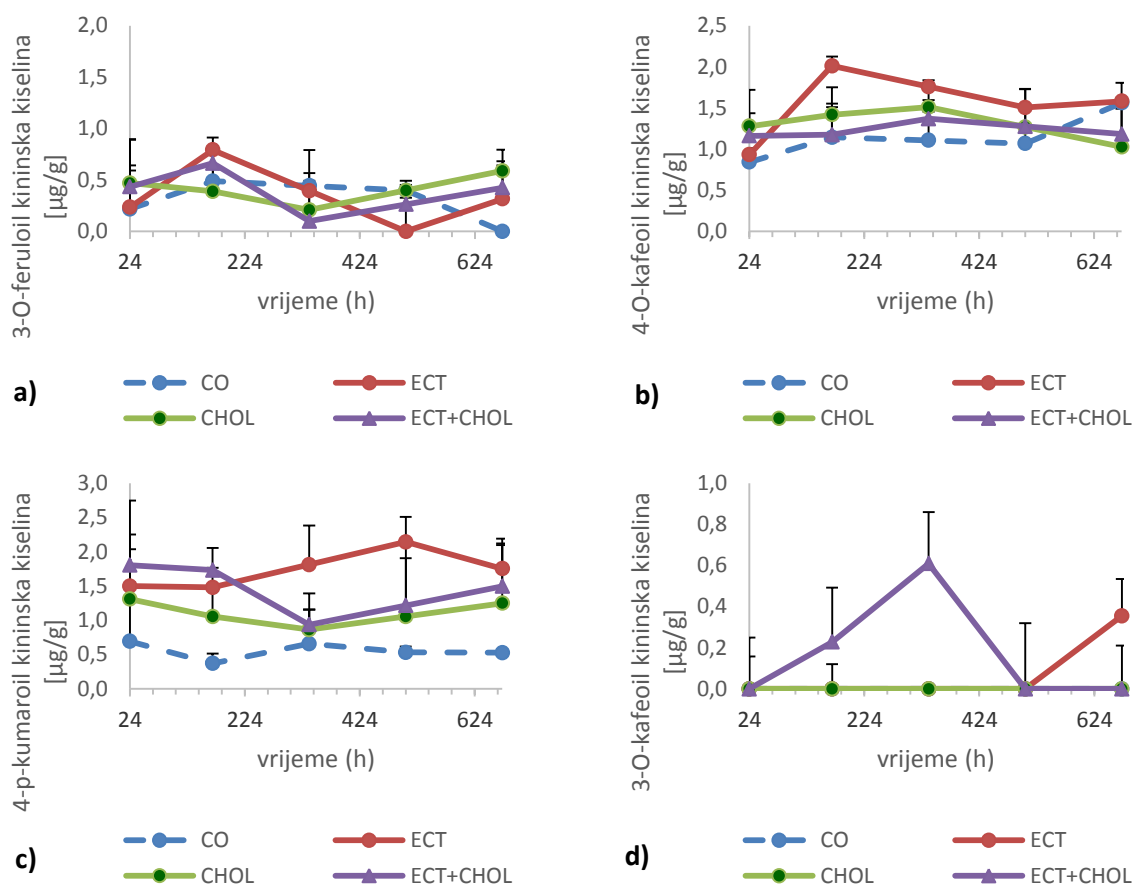
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u mozgu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i kolesterola prikazani su u Tablici 67.

Tablica 67. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u mozgu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom mastima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine fenolnih kiselina detektiranih u mozgu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CHOL			ECT+CHOL		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)
3- <i>O</i> -feruloil kininska kiselina	168±19	0,48±0,05	202,0±114,9	168±0	0,79±0,00*	232,0±53,7	672±340	0,58±0,06	249,4±41,0	168±0	0,66±0,47	222,1±60,9
4- <i>O</i> -kafeoil kininska kiselina	672±0	1,56±0,04	746,0±126,4	168±0	2,01±0,115	1072±43,3	336±277	1,51±0,08	880,4±34	336±246	1,37±0,185	824,3±116,1
4- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	24±3	0,69±0,25	356,0±153,67	504±0	2,14±0,05*	1166,0±47,9*	24±8	1,30±0,03	699,5±346,5	24±3	1,80±1,00	901,4±153,8
ferulinska kiselina	168±0	1,52±0,00	856,4±0,0	504±0	1,64±0,00	929,6±0,0	24±0	1,15±0,00	724,5±0,0	336±0	1,53±0,00	866,4±0,0
galna kiselina	24±0	1,87±0,47	185,8±143,8	24±0	2,50±0,47	685,6±26,7*	24±8	1,81±1,42	307,6±8,1	24±8	0,89±0,66 <sup>▲</sup>	216,0±132,6 <sup>▲</sup>

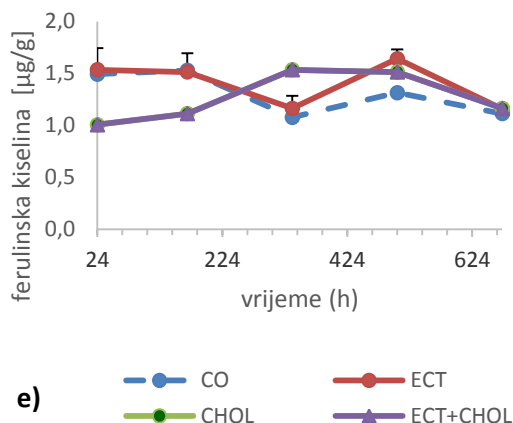
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i kolesterolom u dozi od 140 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SD$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CHOL – kolesterol, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija.

Od fenolnih kiselina, u skupini ECT+CHOL, najveće koncentracije čiji su vrijednosti bioapsorbiranih koncentracija bile u umjerenom rasponu koncentracija uočene su za ferulinsku, 4-*p*-kumaroil kininsku i 4-*O*-kafeoil kininsku kiselinu tijekom svih 28. dana obrade. Vrijednosti bioapsorbiranih koncentracija za 3-*O*-kafeoil kininsku i 3-*O*-feruloil kininsku kiselinu bile su u neravnomjernom i niskom rasponu koncentracija tijekom obrade od 1.-28. dana (Slika 75).



Slika 75. Farmakokinetika i koncentracije fenolnih kiselina: a) 3-*O*-feruloil kininsku, b) 4-*O*-kafeoil kininsku, c) 4-*p*-kumaroil kininsku, d) 3-*O*-kafeoil kininsku i e) ferulinsku kiselinu u mozgu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i kolesterola (140 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 75. nastavak



Nakon subkroničnog doziranja ekstrakta cvijeta trnine i kolesterola, u bubrezima je ukupno detektirano 37,5% ( $N=12/32$ ) polifenolnih spojeva od ukupnog broja polifenolnih spojeva koje nalazimo u čistom ekstraktu cvijeta trnine. Statistički značajno različit AUC i  $c_{max}$  kod skupine ECT+CHOL u usporedbi sa skupinom ECT uočen za 5 spojeva što čini 15,6% od ukupnih spojeva pronađenih u ekstraktu cvijeta trnine i 41,6% od ukupno detektiranih spojeva u bubrezima.

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u bubrezima pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i kolesterola prikazani su u Tablici 68.

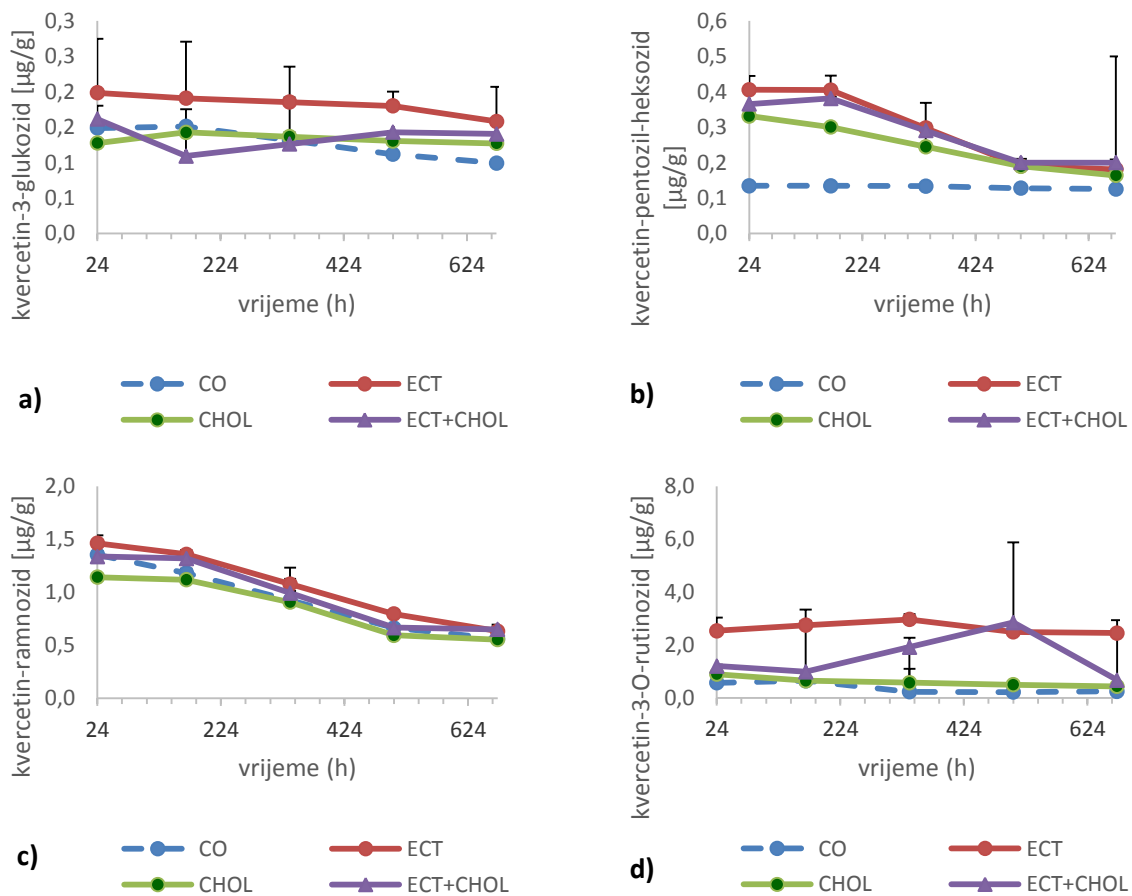


Tablica 68. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u bubrezima kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom mastima tijekom 28 dana

Flavonoli detektirani u bubrezima; subkronična doza (1.-28. dan)	Skupina											
	CO			ECT			CHOL			ECT+CHOL		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
kampferol-pentozid	24±0	2,77±0,02	1317,0±14,7	24±0	2,94±0,03	1381,1±12,5	168±0	0,14±0,01	88,5±20,7	24±0	0,16±1,56	87,3±40,1
kvercetin-3-glukozid	168±83	0,15±0,00	85,1±1,0	24±0	0,20±0,00	121,0±0,6	24±0	0,89±0,00	393,1±0,4	504±83	2,85±0,10	1069,3±18,2
kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid (rutin)	168±19	0,65±0,35	240,1±100,8	336±0	2,96±0,02*	1764,0±6,7*	24±0	0,33±0,00	161,0±3,3	168±27	0,38±0,71	188,4±93,7
kvercetin-pentozil-heksozid	24±0	0,13±0,00	86,8±1,2	24±8	0,41±0,00*	193,2±1,1*	24±0	1,14±0,00	566,0±0,7	24±2	1,33±0,41	648,0±29,6
kvercetin-ramnozid	24±0	1,35±0,02	609,0±12,7	24±0	1,46±0,00	699,5±1,0	24±0	2,76±0,02	1305,6±15,3	24±8	2,73±0,75	1350,5±1,9

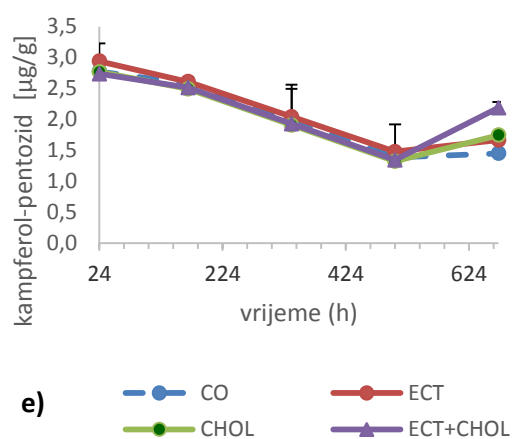
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i kolesterolom u dozi od 140 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SD$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CHOL – kolesterol, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Farmakokinetika detektiranih flavonola u bubregu C57BL/6 miša prikazan je na Slici 76. Između skupina ECT+CHOL i ECT, od spojeva iz skupine flavonola za spojeve kvercetin-3-*O*-glukozid, kvercetin-pentozil-heksozid, kvercetin ramnozid i kampferol-pentozid uočena je slična vremenska biodinamika kao i vrijednost bioapsorbiranih koncentracija. Najistaknutije razlike biodinamici među detektiranim flavonolima utvrđena je za kvercetin-ramnozid koji u skupini ECT+CHOL doseže relativno visoke koncentracije kao i u ECT nakon 7. dana obrade, nakon čega mu se koncentracija od 21. dana obrade smanjuje.



Slika 76. Farmakokinetika i koncentracije flavonola: a) kvercetin-3-glukozida, b) kvercetin-pentozil-heksozida, c) kvercetin-ramnozida, d) kvercetin-3-*O*-rutinozida i e) kampferol-pentozida u bubrezima C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i kolesterola (140 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 76. nastavak



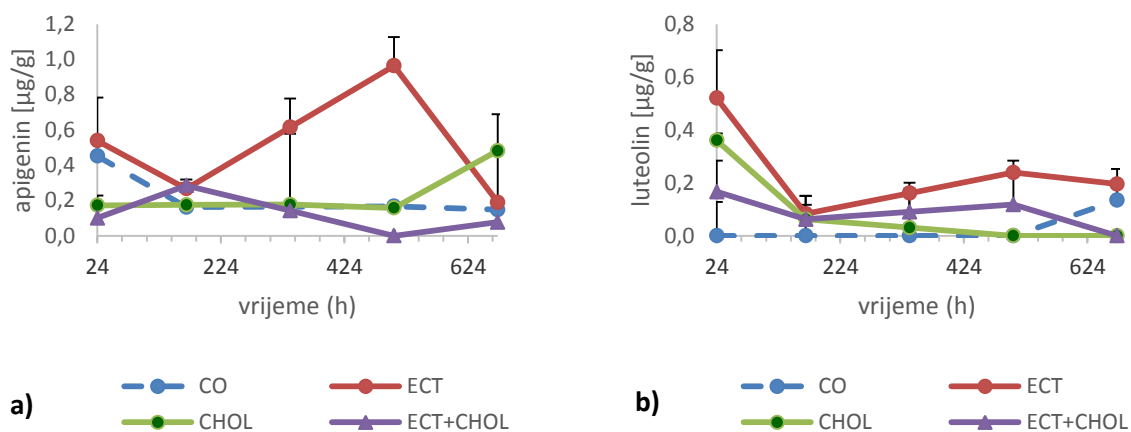
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u bubrezima pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i kolesterola prikazani su u Tablici 69.

Tablica 69. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u bubrezima kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom mastima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavona detektirani u bubrezima; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CHOL			ECT+CHOL		
	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (μg/g)	AUC (h·μg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (μg/g)	AUC (h·μg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (μg/g)	AUC (h·μg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (μg/g)	AUC (h·μg/g)
Apigenin	24±0	0,45±0,01	128,2±1,0	504±0	0,96±0,02*	349,2±2,6*	672±277	0,48±0,01	138,7±8,6	168±0	0,28±0,14 <sup>▲</sup>	82,0±13,5 <sup>▲</sup>
Luteolin	672±0	0,13±0,15	11,3±3,5	24±0	0,52±0,19*	131,2±13,7*	24±0	0,36±0,02	36,4±24,4	24±2	0,16±0,14 <sup>▲</sup>	47,6±8,3 <sup>▲</sup>

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i kolesterolom u dozi od 140 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CHOL – kolesterol, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija.

Farmakokinetika detektiranih flavona u bubrezima miša C57BL/6 prikazan je na Slici 77. Među flavonima je za luteolin uočena slična vremenska biodinamika kao i nizak raspon bioapsorbiranih koncentracija kako kod skupine ECT tako i ECT+CHOL. Za apigenin je utvrđena slična biodinamika kao i kod visokoproteinske dijeta. Najveće koncentracije apigenina, iako u vrlo niskom rasponu koncentracija uočene su između 1. i 7. dana obrade u skupini ECT+CHOL nakon čega mu se koncentracija do 21. dana obrade smanjuje. Istovremeno, kako se koncentracija apigenina u skupini ECT+CHOL smanjuje, tako u skupini ECT njegova koncentracija raste.



Slika 77. Farmakokinetika i koncentracije flavona: a) apigenina, b) luteolina u bubrezima C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i kolesterola (140 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

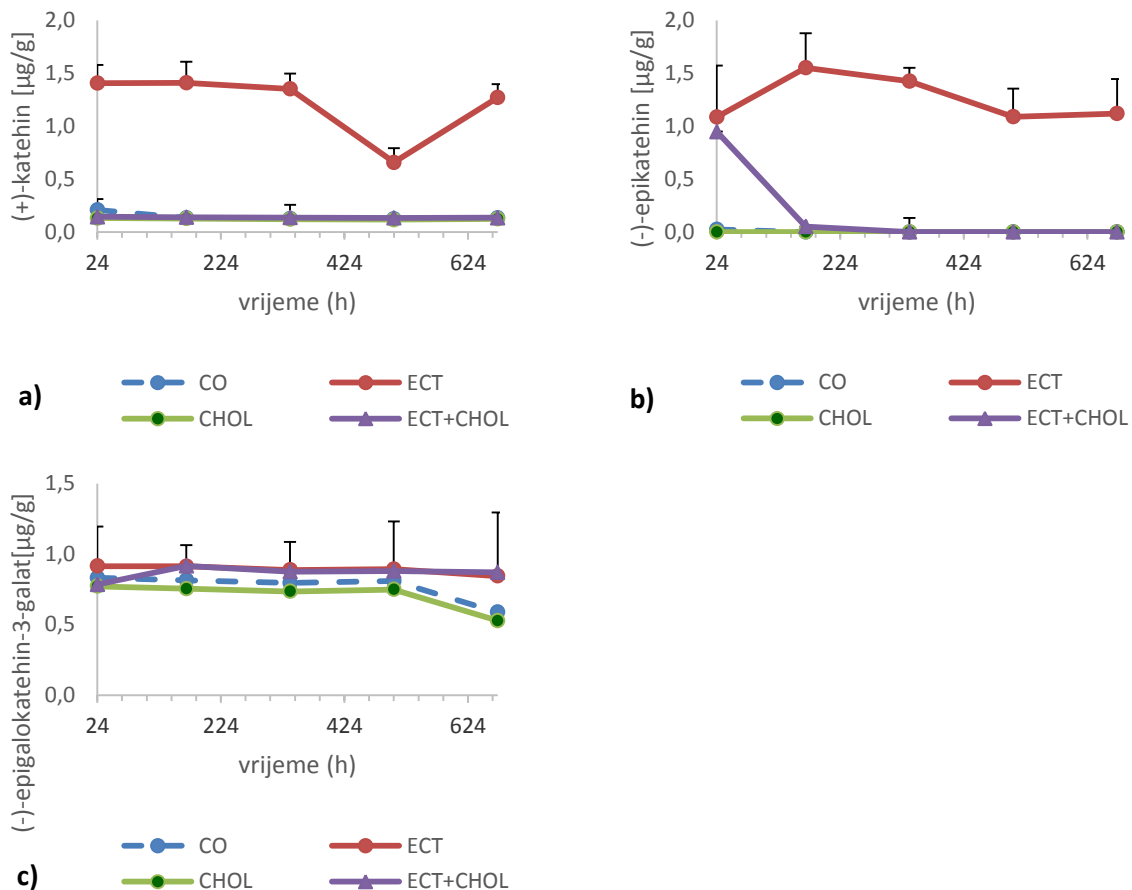
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u bubrezima pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i kolesterola prikazani su u Tablici 70.

Tablica 70. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u bubrezima kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom mastima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavan-3-ola detektirani u bubrezima; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CHOL			ECT+CHOL		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC (h· $\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC (h· $\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC (h· $\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC (h· $\mu\text{g/g}$ )
(+)-katehin	24±0	0,21±0,00	92,9±0,0	168±0	1,41±0,01*	776,2±1,4*	24±0	0,13±0,00	82,4±10,2	24±2	0,14±0,03 <sup>▲</sup>	91,3±14,8 <sup>▲</sup>
(-)-epikatehin	24±0	0,03±0,00	0,3±0,0	168±0	1,55±0,00*	848,4±0,4*	-	<LOD	-	24±0	0,94±0,00 <sup>▲</sup>	55,8±0,0 <sup>▲</sup>
(-)-epigalokatehin-3-galat	24±0	0,83±0,00	514,9±0,0	24±0	0,91±0,00	589,1±0,0	24±0	0,77±0,00	475,2±0,0	168±0	0,91±0,00	576,3±0,0

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i kolesterolom u dozi od 140 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CHOL – kolesterol, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Koncentracija (+)-katehina i (-)-epikatehina se gotovo tijekom cijelog trajanja obrade u skupini ECT+CHOL kretala u vrlo niskom rasponu koncentracija, dok je bioapsorpcija u skupini ECT bila znatno veća. Za spoj (-)-epigalokatehin-3-galat utvrđena je slična biodinamika između skupina ECT i ECT+CHOL tijekom svih 28. dana obrade u umjerenom rasponu koncentracija (Slika 78).



Slika 78. Farmakokinetika i koncentracije flavan-3-ola: a) (+)-katehina, b) (-)-epikatehina i c) (-)-epigalokatehin-3-galata u bubrezima C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i kolesterola (140 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u bubrezima pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i kolesterola prikazani su u Tablici 71.

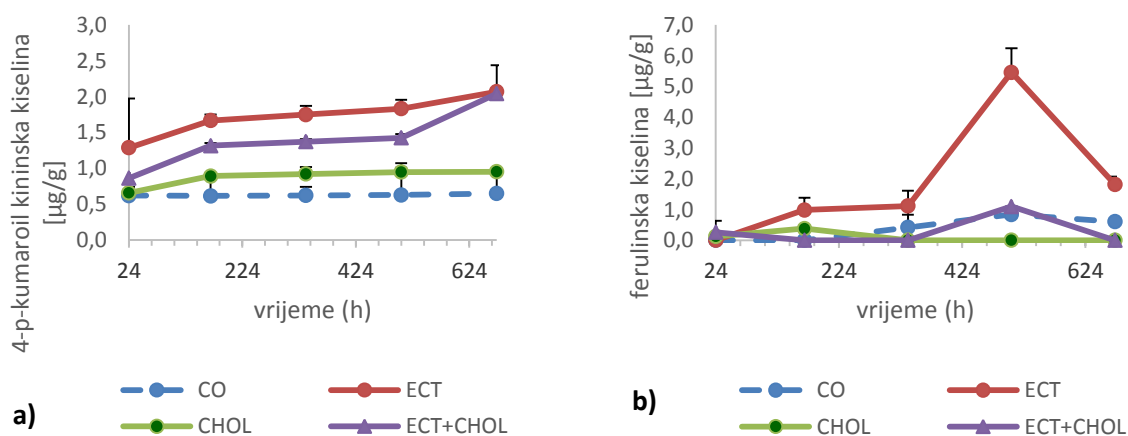
Tablica 71. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u bubrezima kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom mastima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine fenolnih kiselina detektiranih u bubrezima; subkronična doza (1.-28. dan)	Skupina											
	CO			ECT			CHOL			ECT+CHOL		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC (h· $\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC (h· $\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC (h· $\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC (h· $\mu\text{g/g}$ )
4- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	672±291	0,65±0,03	412,3±11,1	672±0	2,07±0,04*	1143,1±2,6*	672±97	0,95±0,02	588,1±21,5	672±0	2,04±1,19	918,9±26,6
ferulinska kiselina	504±277	0,84±0,56	261,6±212,79	504±0	5,45±0,00*	1354,5±0,3*	168±14	0,38±0,19	38,1±13,9	504±14	1,09±0,45 <sup>▲</sup>	114,3±32,6 <sup>▲</sup>

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i kolesterolom u dozi od 140 mg/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CHOL – kolesterol, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija.



Usporedbom bioapsorpcije fenolnih kiselina između skupina ECT i ECT+CHOL, najveće razlike u koncentraciji kao i kod visokoproteinske dijeta uočene su za ferulinsku kiselinu koja nakon 14. dana obrade u skupini ECT doseže relativno visoke koncentracije za razliku od skupine ECT+CHOL, nakon čega se u obje skupine nakon 21. dana obrade njena koncentracija smanjuje. Za 4-*p*-kumaroil kininske kiselinu između skupina ECT i ECT+CHOL utvrđena je vrlo slična vremenska biodinamika, iako je koncentracija u skupini ECT+CHOL bila nešto niža u odnosu na skupinu ECT (Slika 79).



Slika 79. Farmakokinetika i koncentracije fenolnih kiselina: a) 4-*p*-kumaroil kininske, b) ferulinske kiseline u bubrezima C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i kolesterola (140 mg/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

#### **4.3.3. UPLC analiza selektivne bioraspodjele apsorbiranih polifenolnih spojeva iz ekstrakta cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom ugljikohidratima u tankom crijevu, jetri, mozgu i bubregu C57BL/6 miša**

Nakon subkroničnog doziranja ekstrakta cvijeta trnine i saharoze, u tankom crijevu je ukupno detektirano 22 polifenolnih spojeva što čini 68,75% od ukupnog broja polifenolnih spojeva koje nalazimo u vodenom ekstraktu cvijeta trnine. Statistički značajno različit AUC i  $c_{\max}$  u tankom crijevu nakon subkronične obrade, uočeno je za 22 polifenolna spoja kod skupine ECT+CARB u odnosu na skupinu ECT što čini 68,75% od ukupnih spojeva pronađenih u ekstraktu cvijeta trnine i 96,65% od ukupno detektiranih spojeva u tankom crijevu.

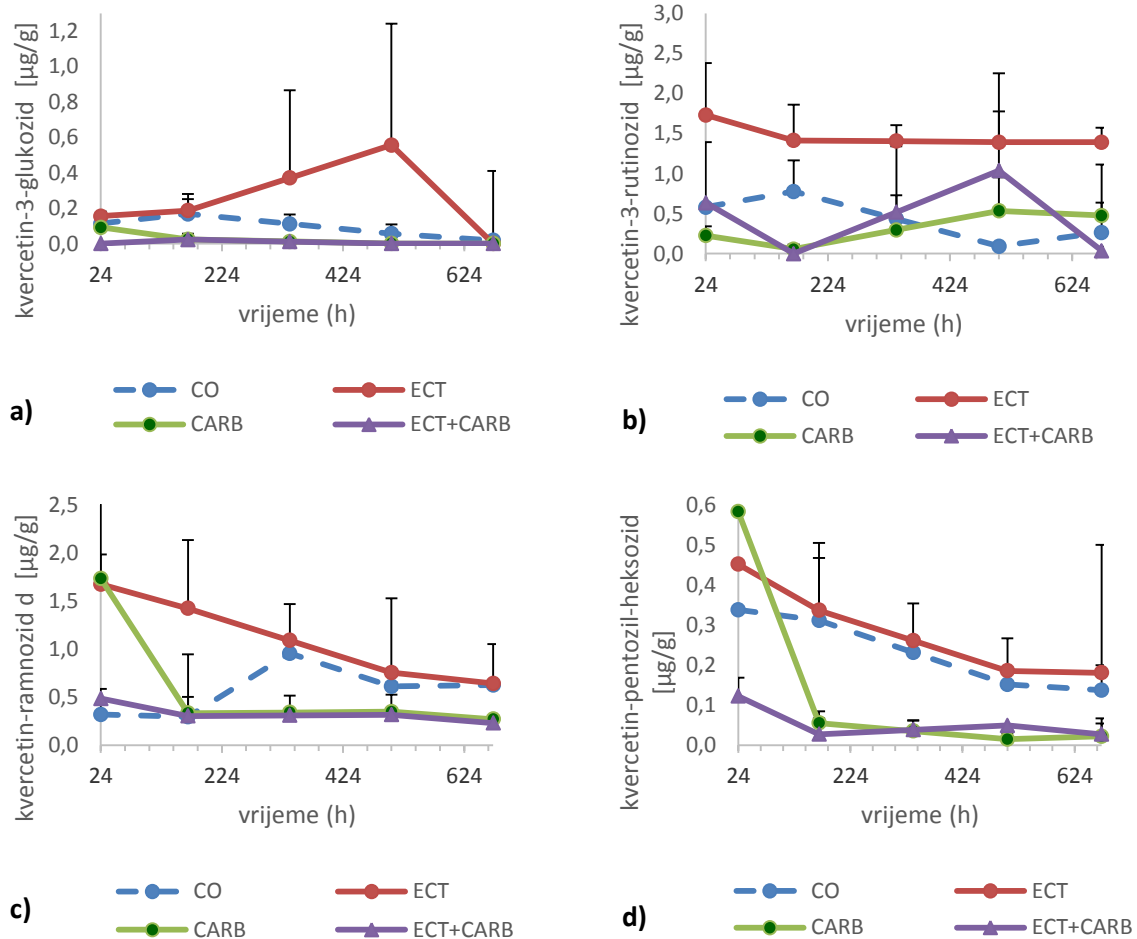
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri metabolita flavonola u tankom crijevu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i saharoze prikazani su u Tablici 72.

Tablica 72. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u tankom crijevu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom ugljikohidratima tijekom 28 dana

Flavonoli detektirani u tankom crijevu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CARB			ECT+CARB		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)
izoramnetin-3-rutinozid	24±2	0,39±0,01	252,9±1,5	24±0	0,43±0,25	273,2±4,5	672±291	0,45±0,03	263,6±2,9	168±34	0,42±0,00	275,9±0,0
kvercetin-3-glukozid	168±0	0,17±0,00	63,9±10,2	504±19	0,56±0,05*	151,0±125,5*	24±0	0,09±0,00	11,1±5,2	168±97	0,02±0,01 <sup>▲</sup>	4,4±0,0 <sup>▲</sup>
kvercetin-3-rutinozid (rutin)	168±0	0,78±0,00	270,3±4,3	24±3	1,73±0,21*	952,0±120,8*	504±336	0,53±0,33	204,7±133,3	504±277	1,03±0,74	277,8±0,0 <sup>▲</sup>
kvercetin-acetil-heksozid	672±291	0,52±0,01	219,2±23,8	672±0	0,67±0,39	429,9±0,9*	168±83	0,52±0,10	279,1±79,5	504±257	0,63±0,00	357,4±0,0
kvercetin-pentozid	168±83	1,37±0,07	654,5±19,2	24±0	1,94±1,03	814,6±8,0	24±3	0,52±0,06	205,3±23	24±8	0,37±0,06 <sup>▲</sup>	189,1±0,0 <sup>▲</sup>
kvercetin-pentozil-heksozid	24±8	0,34±0,01	152,3±13,9	24±0	0,45±0,04	179,9±10,2	24±0	0,58±0,40	54,2±35,5	24±8	0,12±0,03 <sup>▲</sup>	30,1±0,0 <sup>▲</sup>
kvercetin-ramnozid	336±83	0,96±0,10	387,7±11,8	24±8	1,68±0,95*	723,7±17,3*	24±0	1,73±1,29	310,5±90,2	24±8	0,48±0,11 <sup>▲</sup>	212,6±0,0 <sup>▲</sup>
kampferol-3-glukozid	168±83	0,16±0,00	93,5±2,1	168±0	0,30±0,17*	146,1±3,8*	168±83	0,12±0,04	45,9±12,1	168±34	0,05±0,00 <sup>▲</sup>	24,3±0,0 <sup>▲</sup>
kampferol-3-rutinozid	168±0	0,24±0,00	116,3±3,2	168±83	0,28±0,16	132,1±1,2	24±0	0,16±0,01	64,8±6,0	24±3	0,11±0,00 <sup>▲</sup>	53,6±0,0 <sup>▲</sup>
kampferol-pentozid	168±0	2,75±0,00	1344,3±6,0	24±0	5,29±2,91*	1559,4±74,7	24±8	0,97±0,12	519,8±56,0	24±8	1,05±0,05 <sup>▲</sup>	512,8±0,0 <sup>▲</sup>
kampferol-3-O-ramnozid	168±0	0,00±0,00	0,0±0,0	672±0	0,06±0,00	9,9±0,0*	24±3	0,03±0,01	4,2±1,3	24±14	0,00±0,00 <sup>▲</sup>	0,1±0,0 <sup>▲</sup>
kampferol-ramnozil-heksozid	24±8	0,69±0,02	334,8±4,9	24±0	0,84±0,49	384,6±3,5	24±0	0,36±0,05	145,8±3,6	24±8	0,35±0,11 <sup>▲</sup>	143,1±0,0 <sup>▲</sup>
kampferol-acetil-heksozid	504±0	0,04±0,01	13,3±4,7	672±37	0,06±0,05	7,6±2,7	168±0	0,08±0,00	25,9±1,0	24±2	0,07±0,03	24,3±0,0 <sup>▲</sup>
kampferol-pentozil-heksozid	168±83	0,51±0,01	260,6±13,9	24±0	0,85±0,45*	329,4±10,2	24±0	0,83±0,58	139,3±45,4	24±8	0,18±0,07 <sup>▲</sup>	86,3±0,0 <sup>▲</sup>

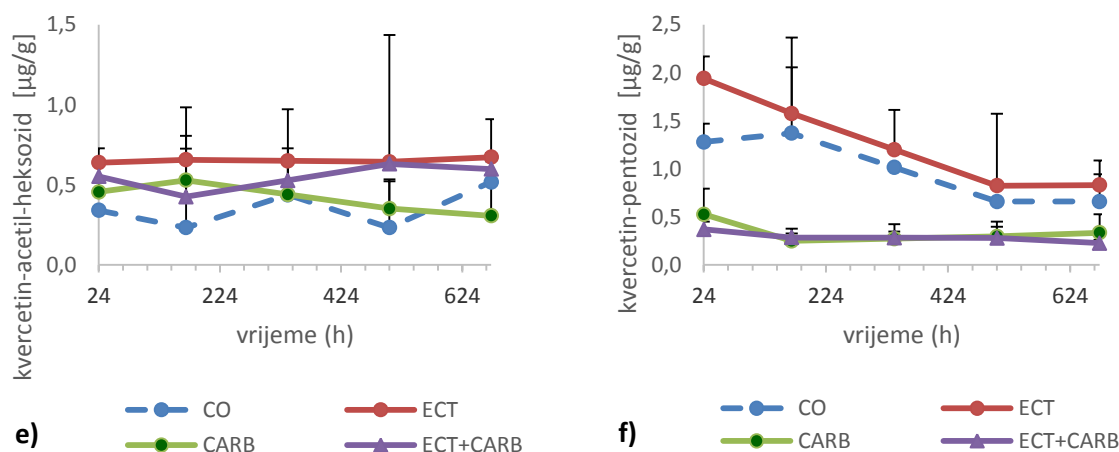
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i saharozom u dozi od 4 g/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Među kvercetinским spojevima, relativno visoka koncentracija u skupini obrađenoj ekstraktom cvijeta trine u kombinaciji s prehranom obogaćenom saharozom (ECT+CARB) postignuta je za spoje kvercetin-3-rutinozid (između 1. i 14. dana obrade). Biodinamika svih ostalih detektiranih spojeva kvercetina, kao i raspon koncentracija između skupina ECT+CARB i ECT je bila slična (Slika 80).

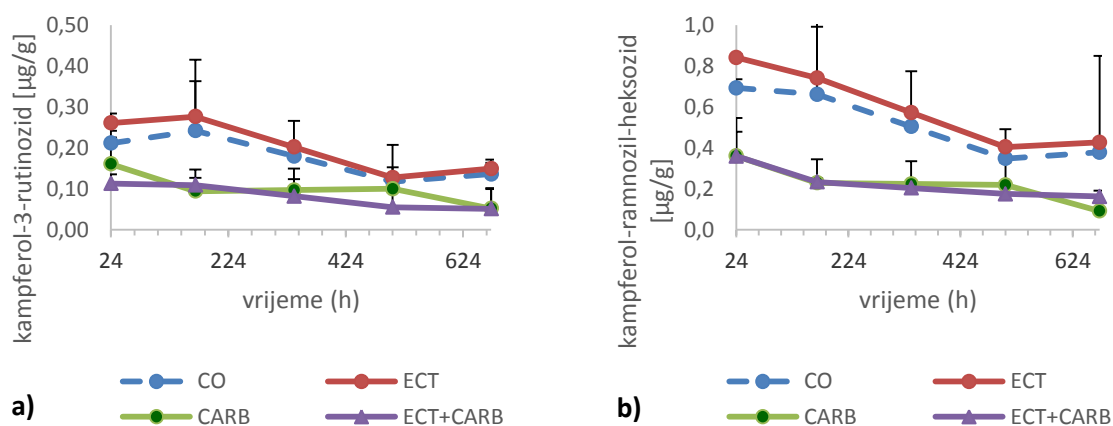


Slika 80. Farmakokinetika i koncentracije kvercetina: a) kvercetin-3-glukozida, b) kvercetin-3-rutinozida, c) kvercetin-ramnozida, d) kvercetin-pentozil-heksozida, e) kvercetin-acetil-heksozida, f) kvercetin-pentozida u tankom crijevu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trine (25 mg/kg tj. m.) i saharoze (4 g/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 80. nastavak

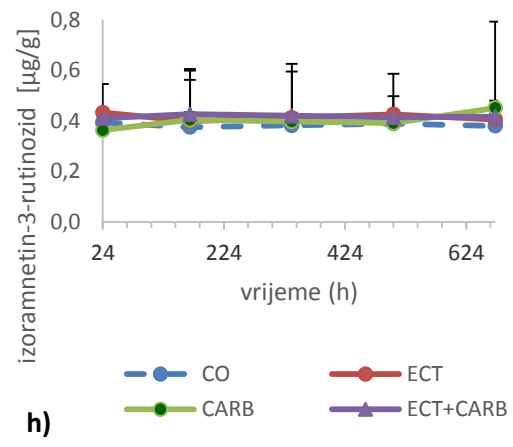
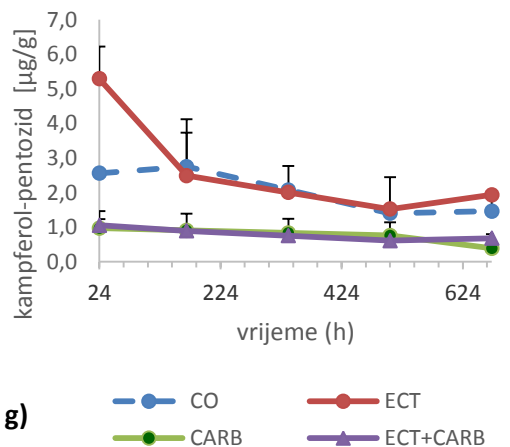
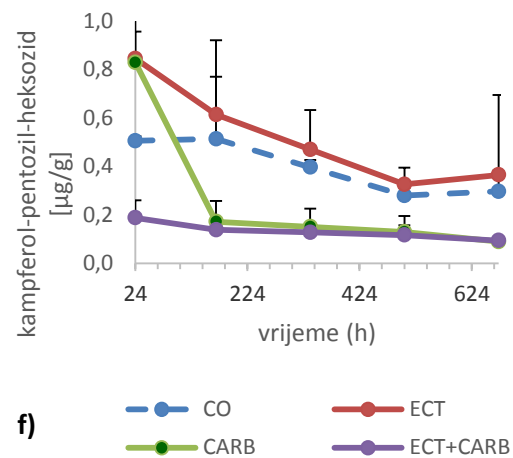
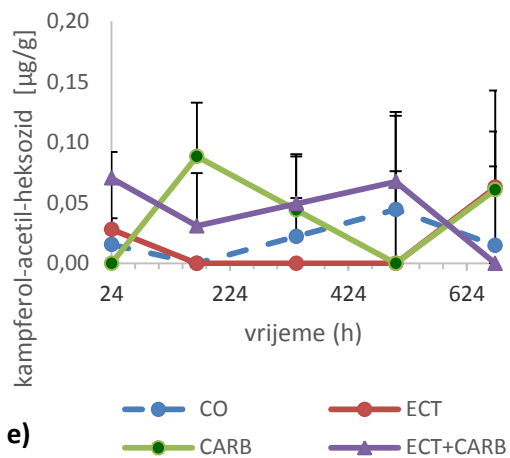
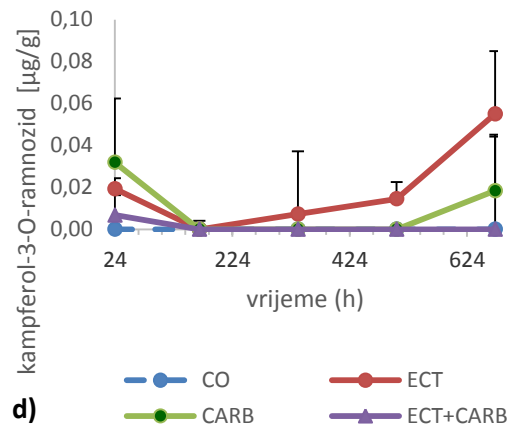
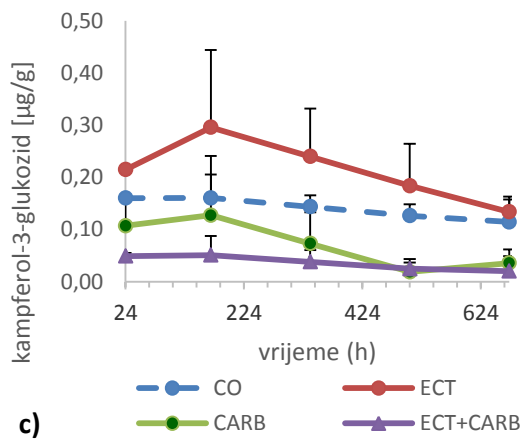


Koncentracija kampferolnih spojeva u skupini ECT+CARB kretala se unutar vrlo niskog i niskog raspona koncentracija u odnosu na skupinu ECT, gdje su se vrijednosti kampferolnih spojeva nalazile unutar umjerenog i relativno visokog raspona koncentracija tijekom cijelog trajanja obrade (Slika 81).



Slika 81. Farmakokinetika i koncentracije kampferola: a) kampferol-3-rutinozida, b) kampferol-ramnozil-heksozida, c) kampferol-3-glukozida, d) kampferol-3-O-ramnozida, e) kampferol-acetil-heksozida, f) kampferol-pentozil-heksozida, g) kampferol-pentozida i h) izoramnetin-3-rutinozida u tankom crijevu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i saharoze (4 g/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 81. nastavak



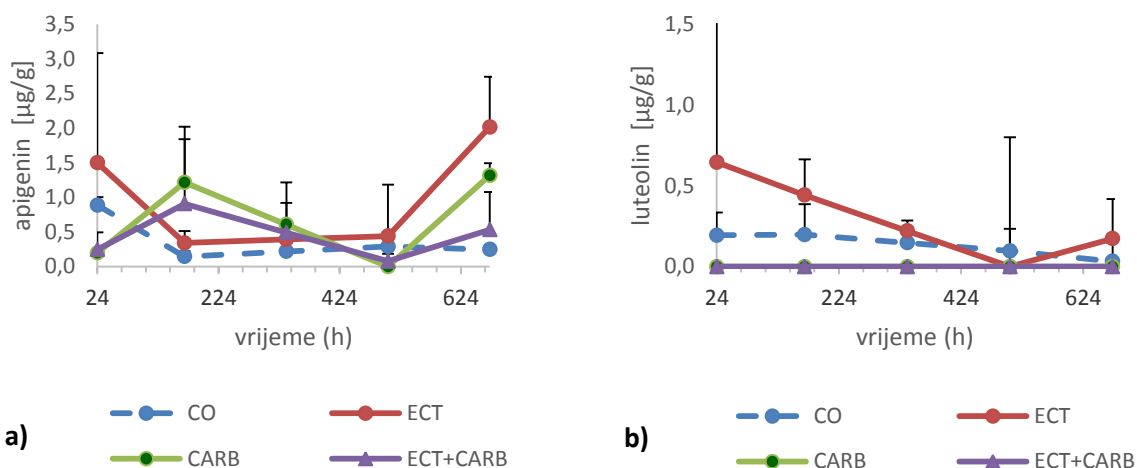
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u tankom crijevu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i saharoze prikazani su u Tablici 73.

Tablica 73. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u tankom crijevu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trine u kombinaciji s prehranom obogaćenom ugljikohidratima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavona detektirani u tankom crijevu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CARB			ECT+CARB		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)
Apigenin	24±0	0,89±0,14	188,3±17,8	24±3	2,50±0,25*	523,9±72,5*	672±291	1,31±0,10	412,8±38,4	168±35	0,90±0,65 <sup>▲</sup>	288,7±0,0 <sup>▲</sup>
Luteolin	168±83	0,20±0,10	89,5±19,2	24±3	0,64±0,28*	171,8±30,6*	-	<LOD	-	-	<LOD <sup>▲</sup>	-

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trine u dozi od 25 mg/kg/dan i saharozom u dozi od 4 g/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Uspoređujući biodinamiku flavona apigenina između skupine ECT i skupine ECT+CARB, utvrđeno je da koncentracija apigenina u skupini ECT+CARB postiže najveću vrijednost nakon 7. dana obrade koja je u tom vremenskom periodu veća u odnosu na koncentraciju apigenina kod skupine ECT. Nakon 7. dana obrade, koncentracija apigenina se do 21. dana obrade smanjuje gotovo do nule za razliku od koncentracije apigenina u skupini ECT. Nakon 21. dana obrade, koncentracija apigenina u skupini ECT+CARB raste, ali u dosta niskoj koncentracijskoj vrijednosti u odnosu na skupinu ECT. Vrijednost koncentracije luteolina je u skupini ECT+CARB kroz cijeli tretman iznosila nula (Slika 82).



Slika 82. Farmakokinetika i koncentracije flavona: a) apigenina, b) luteolina u tankom crijevu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i saharoze (4 g/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u tankom crijevu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i saharoze prikazani su u Tablici 74.

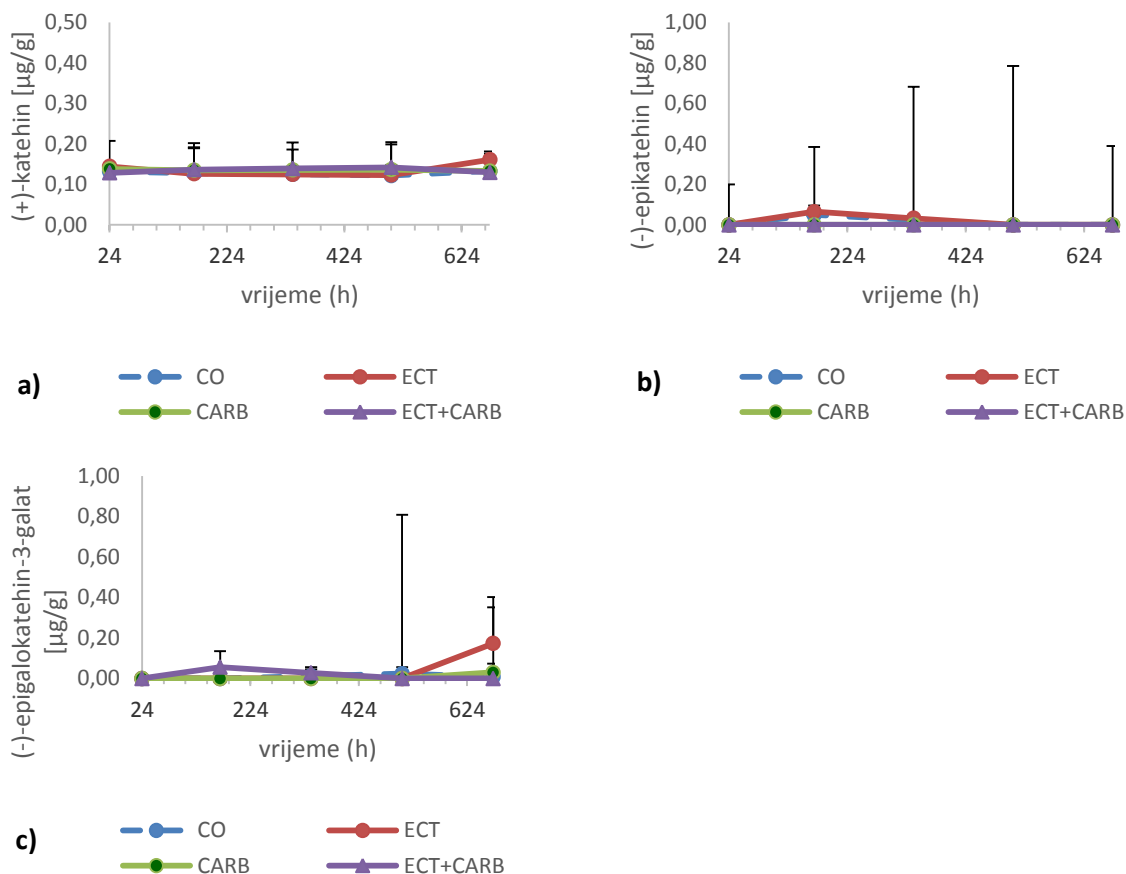


Tablica 74. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u tankom crijevu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom ugljikohidratima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavan-3-ola detektirani u tankom crijevu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CARB			ECT+CARB		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
(+)-katehin	672±374	0,13±0,00	83,5±0,5	672±0	0,16±0,09	86,8±1,5	24±8	0,13±0,00	89,4±0,6	504±194	0,14±0,00	90,1±0,0
(-)-epikatehin	168±97	0,05±0,04	9,4±1,1	168±0	0,06±0,03	12,5±0,0	-	<LOD	-	-	<LOD <sup>▲</sup>	-
(-)-epigalokatehin-3-galat	504±291	0,02±0,00	6,3±0,8	672±0	0,17±0,02*	14,5±13,9*	672±388	0,03±0,01	2,5±0,4	168±97	0,05±0,03 <sup>▲</sup>	10,8±0,0

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i saharozom u dozi od 4 g/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Za spojeve iz skupine flavan-3-ola uočene su vrlo niske vrijednosti koncentracija tijekom cijelog trajanja obrade (Slika 83). Najveće koncentracije u skupinama ECT+CHOL i ECT postignute su za spoj (+)-katehin. Koncentracija (-)-epikatehina je tijekom cijelog obrade u skupini ECT+CARB iznosila nula, dok su za (-)-epigalokatehin-3-galat najveće koncentracije u skupini ECT+CARB uočene između 1. i 14. dana obrade.



Slika 83. Farmakokinetika i koncentracije flavan-3-ola: a) (+)-katehina, b) (-)-epikatehina i c) (-)-epigalokatehin-3-galata u tankom crijevu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i saharoze (4 g/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

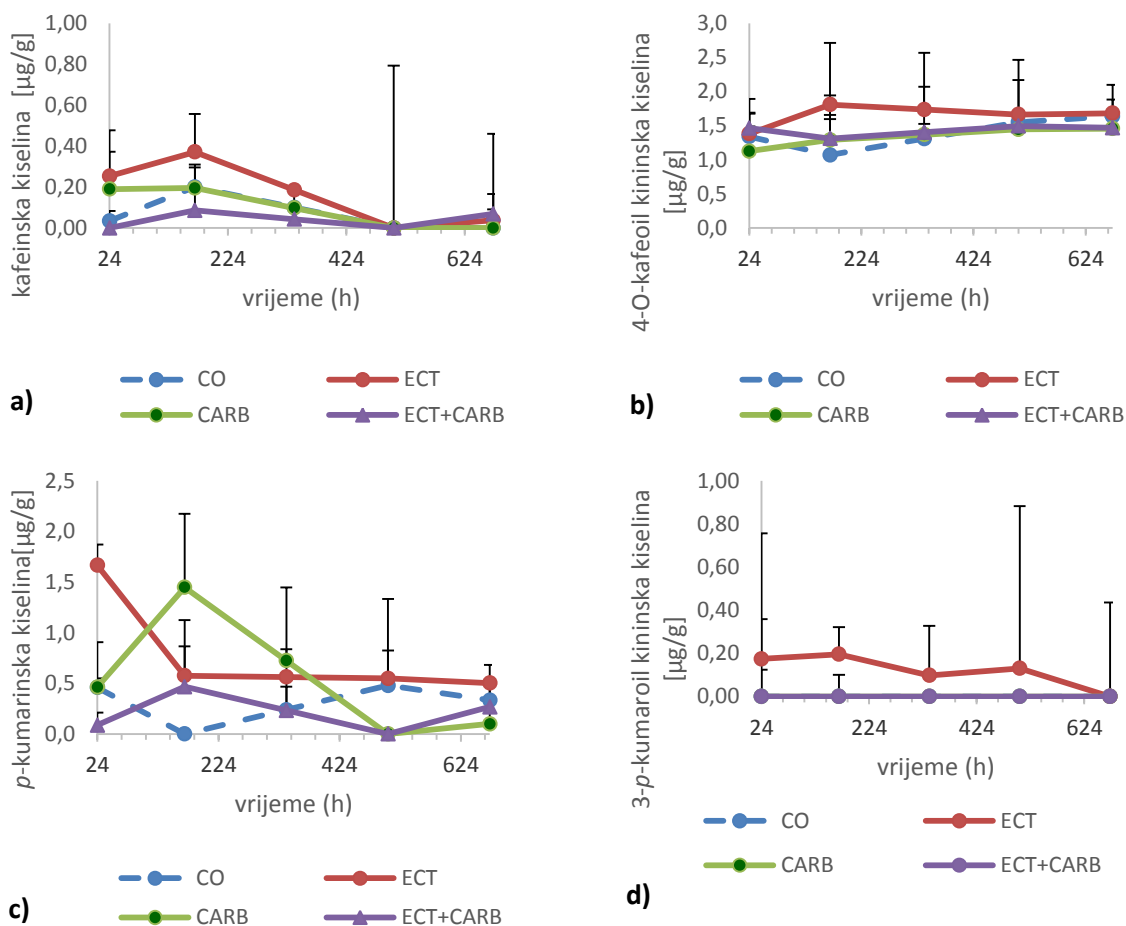
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u tankom crijevu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i saharoze prikazani su u Tablici 75.

Tablica 75. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u tankom crijevu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom ugljikohidratima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine fenolnih kiselina detektiranih u tankom crijevu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CARB			ECT+CARB		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
3- <i>O</i> -feruloil kininska kiselina	168±83	0,62±0,13	211,9±37,3	168±37	4,61±0,42*	768,4±6,3*	672±0	0,21±0,03	18,2±3,1	24±2	0,42±0,13 <sup>▲</sup>	205,3±0,0 <sup>▲</sup>
3- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	24±8	<LOD	0,0±16,2	168±14	0,20±0,02	71,8±14,4*	-	<LOD	-	-	<LOD <sup>▲</sup>	-
4- <i>O</i> -kafeoil kininska kiselina	672±374	1,64±0,10	896,5±83,2	168±34	1,81±1,17	1110,1±25,4	672±0	1,45±0,00	890,0±0,0	504±0	1,49±0,00	937,1±0,0
4- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	24±0	1,22±0,05	627,7±4,2	504±97	2,16±1,27*	1095,0±27,8*	24±3	1,25±0,03	549,3±109,7	672±0	2,03±0,10	622,4±0,0
kafeinska kiselina	168±0	0,20±0,05	41,6±17,4	168±0	0,37±0,21*	111,8±13,9*	168±83	0,19±0,09	53,7±6,3	168±35	0,08±0,01 <sup>▲</sup>	25,9±0,0 <sup>▲</sup>
ferulinska kiselina	504±0	1,04±0,30	368,3±61,5	24±2	1,68±0,95*	740,9±9,7*	168±0	3,38±0,16	874,6±72,0	672±388	1,24±0,33	293,9±0,0 <sup>▲</sup>
galna kiselina	24±0	1,28±0,67	215,1±96,7	168±0	2,21±1,27*	575,2±12,6*	24±14	0,74±0,07	9,0±5,3	-	LOD <sup>▲</sup>	-
<i>p</i> -kumarinska kiselina	504±277	0,48±0,14	186,7±37,4	24±0	1,67±0,94*	444,9±6,3*	168±0	1,44±0,1	387,9±19,6	168±35	0,46±0,28 <sup>▲</sup>	139,4±0,0 <sup>▲</sup>

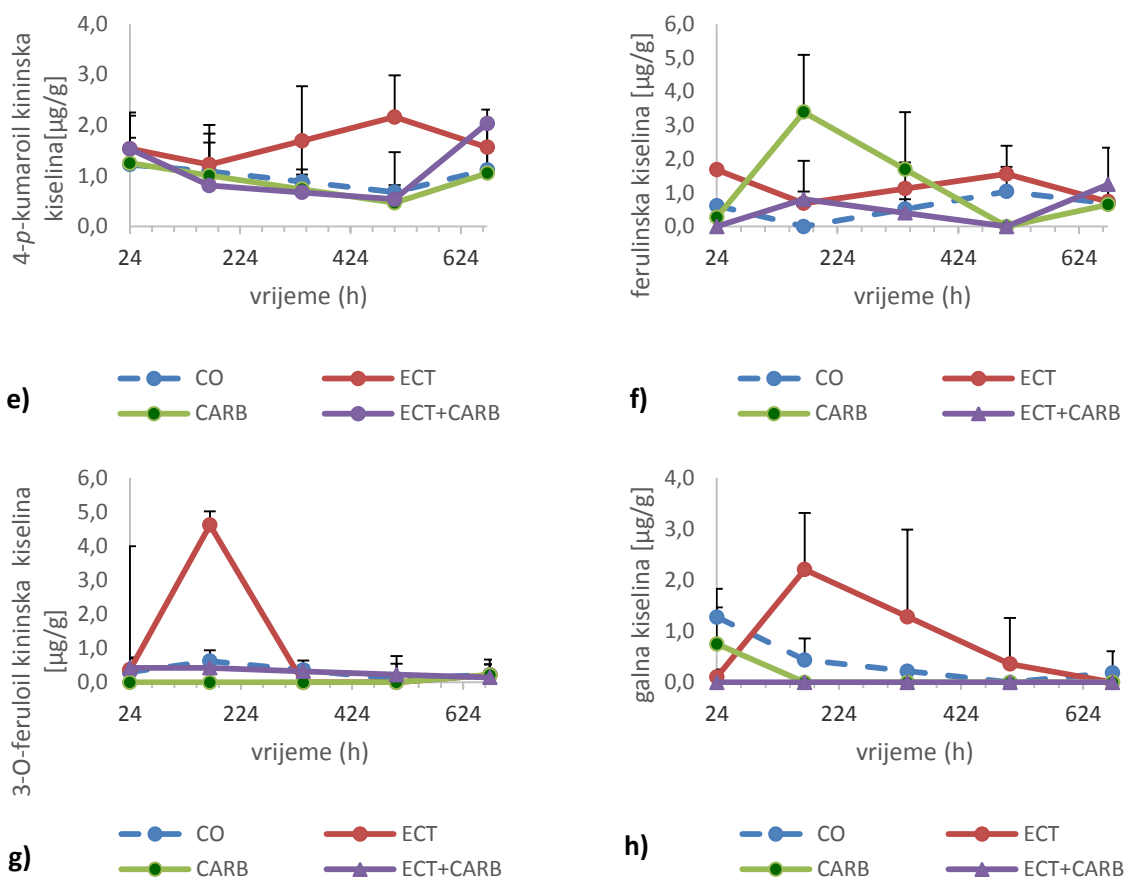
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i saharozom u dozi od 4 g/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Među fenolnim kiselina, najveće koncentracije u skupini ECT+CARB uočene su za 4-*O*-kafeoil kininsku tijekom svih 28. dana obrade, te 4-*p*-kumaroil kininsku nakon 21. do 28. dana obrade. Vrijednosti koncentracija ostalih fenolnih kiselina u skupini ECT+CARB u odnosu na ECT je bila u vrlo niskom rasponu koncentracija (Slika 84).



Slika 84. Farmakokinetika i koncentracije fenolnih kiselina: a) kafeinske, b) 4-*O*-kafeoil kininske, c) *p*-kumarinske, d) 3-*p*-kumaroil kininske, e) 4-*p*-kumaroil kininske, f) ferulinske, g) 3-*O*-feruloil kininske i h) galne kiseline u tankom crijevu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i saharoze (4 g/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 84. nastavak



U jetri, nakon subkroničnog doziranja ekstrakta cvijeta trnine i saharoze, ukupno je detektirano 24 polifenolnih spojeva što čini 75% od ukupnog broja polifenolnih spojeva koje nalazimo u vodenom ekstraktu cvijeta trnine. Statistički značajno različit AUC i  $c_{\text{max}}$  uočen je za 13 polifenolnih spojeva kod skupine ECT+CARB u odnosu na skupinu ECT što čini 40,63% od ukupnih spojeva pronađenih u ekstraktu cvijeta trnine i 54,1% od ukupno detektiranih spojeva u tankom crijevu.

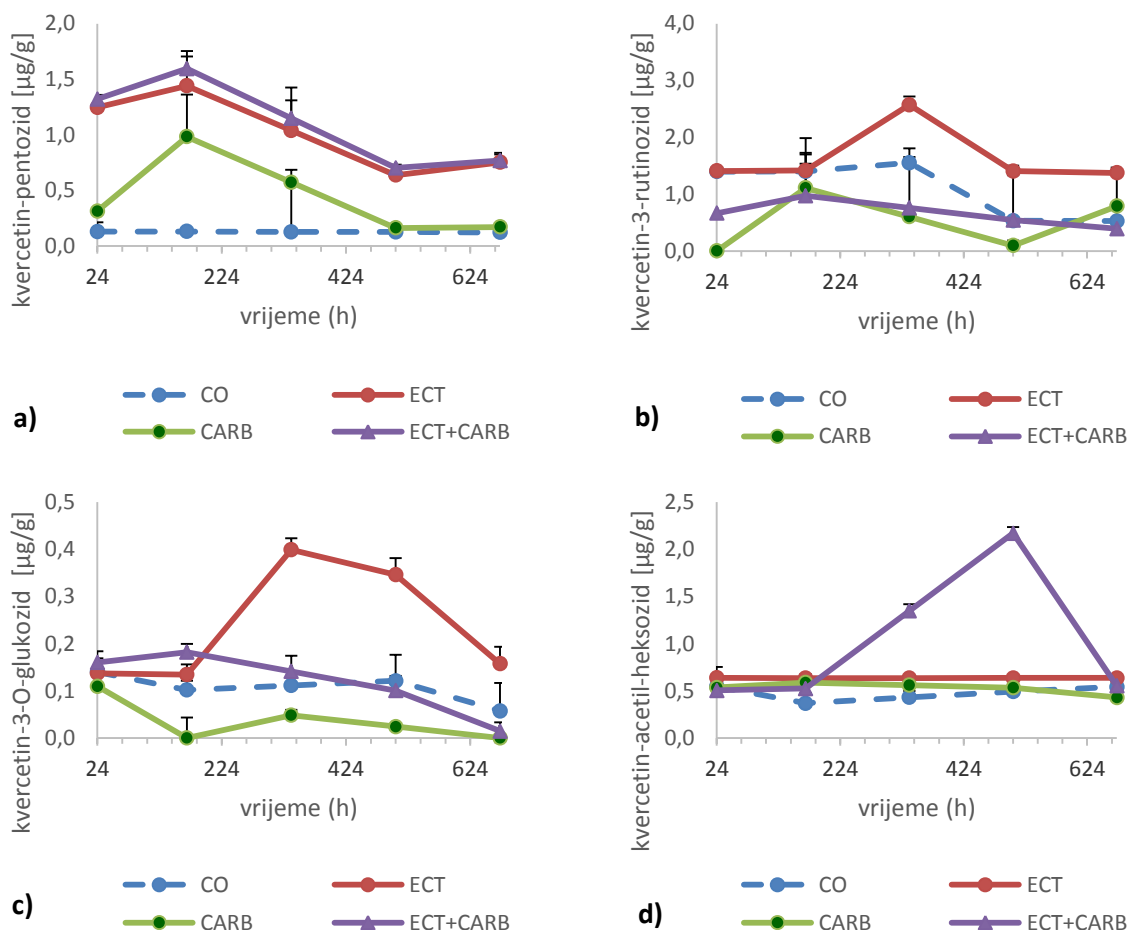
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola jetri pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i saharoze prikazani su u Tablici 76.

Tablica 76. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u jetri kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom ugljikohidratima tijekom 28 dana

Flavonoli detektirani u jetri; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CARB			ECT+CARB		
	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)
izoramnetin-3-rutinozid	168±29	0,39±0,00	248,0±1,2	168±83	0,41±0,00	265,4±0,2	672±96	0,42±0,01	275,2±0,1	168±0	0,40±0,00	259,8±0,5
kvercertin-3- <i>O</i> -glukozid	24±0	0,14±0,09	70,6±0,8	336±277	0,40±0,03*	168,6±0,1*	24±96	0,11±0,05	19,1±1,3	168±19	0,18±0,01 <sup>▲</sup>	81,1±0,6 <sup>▲</sup>
kvercetin-3- <i>O</i> -rutinozid (rutin)	336±83	1,55±0,32	715,1±78,9	336±83	2,57±0,03*	1113,1±0,6*	168±29	1,11±0,30	339,7±16,5	168±19	0,97±0,10 <sup>▲</sup>	455,6±7,7 <sup>▲</sup>
kvercetin-acetil-heksozid	24±3	0,55±0,00	302,8±2,5	24±3	0,64±0,00	419,2±0,2	168±34	0,58±0,05	355,2±0,8	504±25	2,16±0,01 <sup>▲</sup>	731,2±3,3
kvercetin-pentozid	168±0	0,13±0,00	84,2±1,1	168±83	1,44±0,02*	670,0±1,6*	168±0	0,98±0,18	307,5±4,7	168±0	1,59±0,13	730,3±1,9
kvercetin-pentozil-heksozid	168±0	0,36±0,02	157,7±0,8	168±0	0,47±0,06	207,5±0,2	168±0	0,11±0,01	40,3±0,5	168±0	0,36±0,02	173,9±0,8
kvercetin-ramnozid	168±0	1,31±0,01	606,7±1,6	168±0	1,39±0,01	635,4±1,0	168±0	0,54±0,01	237,0±1,8	168±0	1,36±0,21	661,2±4,9
kampferol-3-glukozid	24±0	0,16±0,00	71,6±0,4	168±0	0,26±0,01	108,3±0,3	24±0	0,05±0,00	8,0±0,4	168±27	0,15±0,02	82,7±1,1
kampferol-3-rutinozid	24±8	0,23±0,18	114,9±0,8	168±0	0,29±0,00*	140,8±0,1*	168±0	0,11±0,00	33,5±0,1	168±0	0,24±0,00	124,4±1,8
kampferol-pentozid	168±0	2,60±0,00	1243,4±1,1	168±0	2,69±0,00	1382,3±1,0	168±0	1,39±0,56	578,3±17,1	168±0	2,56±0,03	1290,2±8,4
kampferol-3- <i>O</i> -ramnozid	168±34	0,03±0,00	8,0±1,1	168±0	0,12±0,02*	26,2±0,5*	24±0	0,00±0,00	0,0±0,0	24±0	0,01±0,00 <sup>▲</sup>	0,2±0,0 <sup>▲</sup>
kampferol-ramnozil-heksozid	168±83	0,70±0,02	330,5±1,5	168±0	0,80±0,00	374,2±0,59	168±83	0,24±0,05	127,1±2,3	168±19	0,75±0,01	382,2±3,6
kampferol-acetil-heksozid	168±96	0,02±0,03	4,1±0,8	168±0	0,07±0,00*	13,4±0,0*	504±0	0,15±0,01	44,4±1,7	672±0	0,07±0,00	17,2±0,9

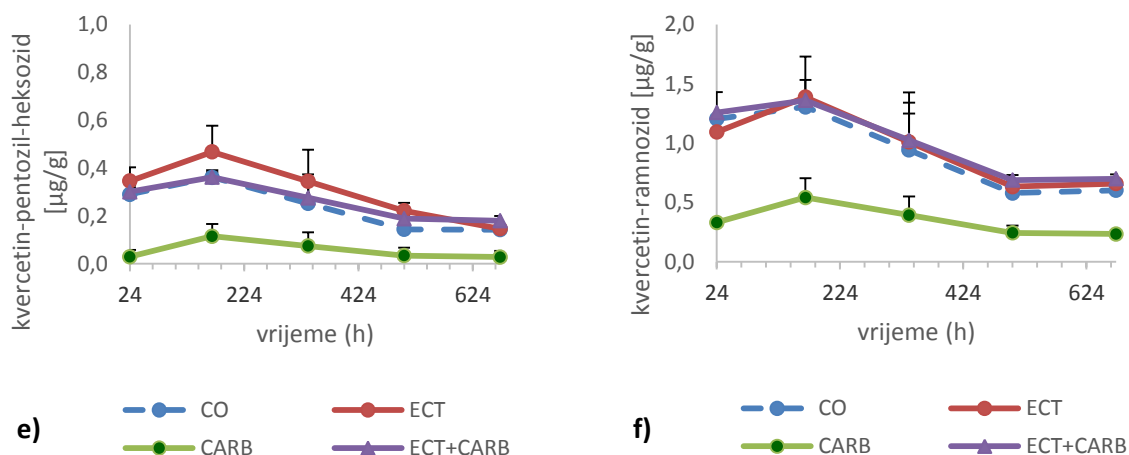
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i saharozom u dozi od 4 g/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Među spojevima kvercetina, relativno visoke koncentracije u jetri između 7. i 21. dana obrade u skupini ECT+CARB uočene su za spoj kvercetin-acetil-heksozid. Biodinamika kvercetin-pentozida, kvercetin-rutinozida i kvercetin-3-*O*-rutinozida bila je slična, a vrijednosti bioaspsorbiranih koncentracija bila je unutar umjerenog raspona koncentracija. Za ostale metabolite, također je uočena slična biodinamika, ali unutar niskog i vrlo niskog raspona koncentracija (Slika 85).

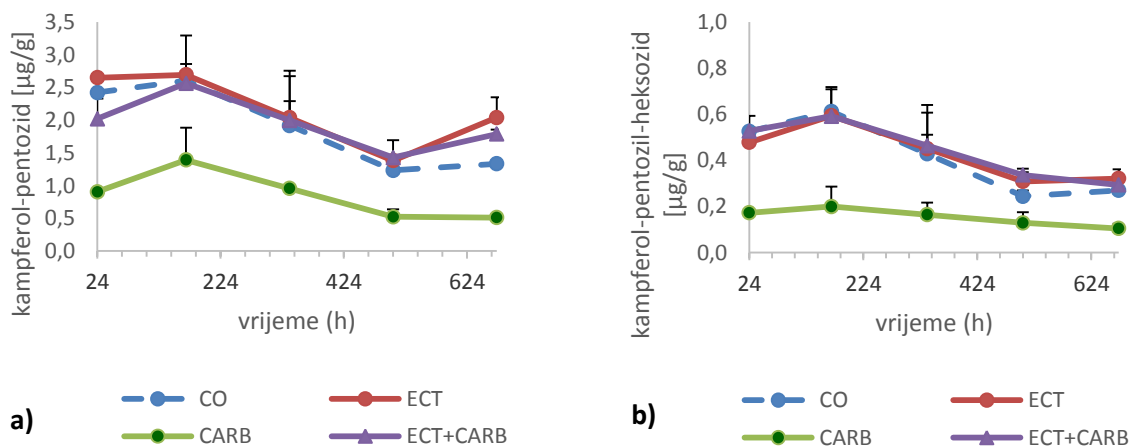


Slika 85. Farmakokinetika i koncentracije metabolita kvercetina: a) kvercetin-pentozida, b) kvercetin-3-rutinozida, c) kvercetin-3-*O*-glukozida, d) kvercetin-acetil-heksozida, e) kvercetin-pentozil-heksozida i f) kvercetin-ramnozida u jetri C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i saharoze (4 g/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 85. nastavak



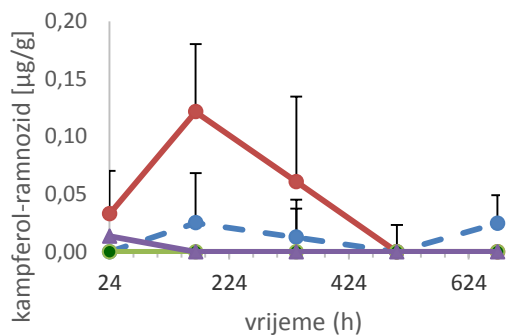
Od kampferolnih spojeva, najistaknutija koncentracija u relativno visokom i umjerenom koncentracijskom rasponu u skupini ECT+CARB uočena je za spoj kampferol-pentozid. Biodinamika ostalih metabolita kampferola između skupina ECT+CARB i ECT bila je slična, osim kampferol-ramnozida, a vrijednosti bioasporbiranih koncentracija kretale su se unutar vrlo niskog i niskog raspona koncentracija tijekom svih 28 dana obrade (Slika 86).



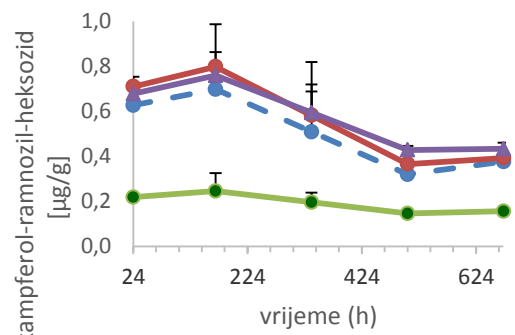
Slika 86. Farmakokinetika i koncentracije kampferola: a) kampferol-pentozida, b) kampferol-pentozil-heksozida, c) kampferol-ramnozida, d) kampferol-ramnozil-heksozida, e) kampferol-3-glukozida, f) kampferol-3-ruinozida, g) kampferol-acetil-heksozida i f) izoramnetin-3-rutinozida u jetri C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i saharoze (4 g/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.



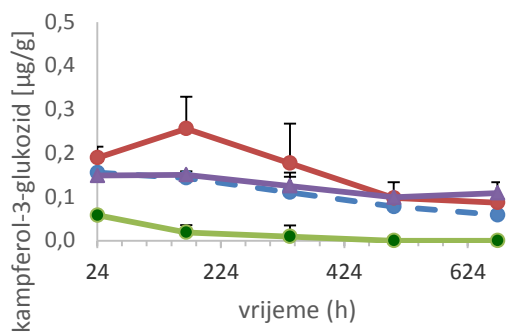
Slika 86. nastavak



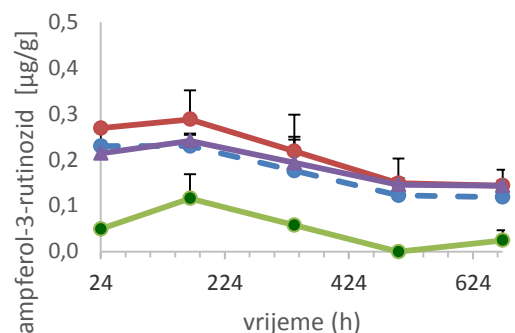
c)



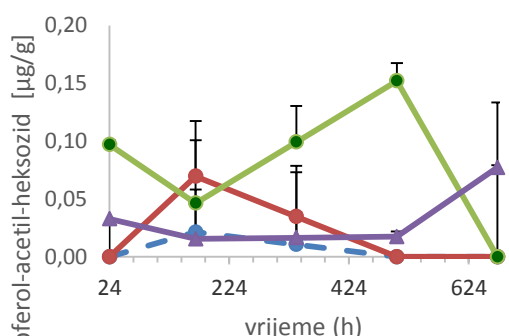
d)



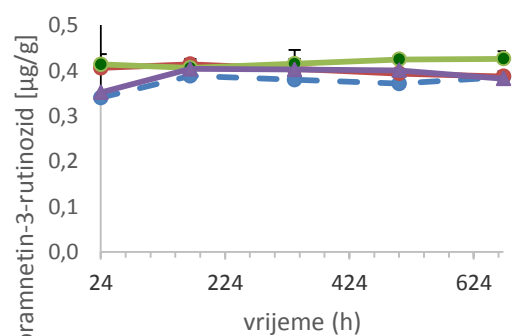
e)



f)



g)



h)



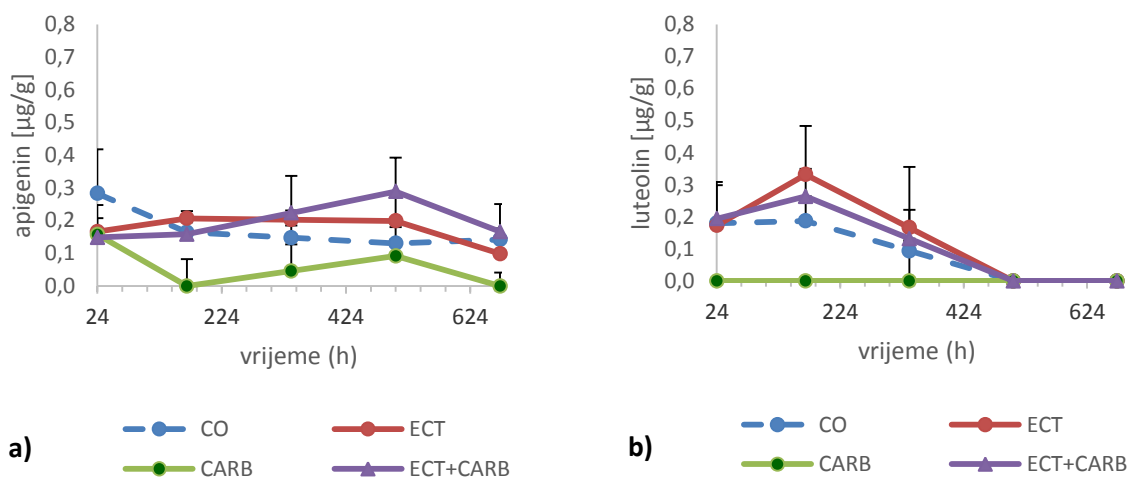
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u jetri pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i saharoze prikazani su u Tablici 77.

Tablica 77. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u jetri kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s visokugljikohidratnom dijetom tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavona detektirani u jetri; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CARB			ECT+CARB		
	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)
Apigenin	24±8	0,28±0,01	107,2±0,9	168±27	0,20±0,03	121,1±0,5	24±2	0,157±0,02	28,7±2,7	504±96	0,28±0,02 <sup>▲</sup>	136,3±3,6 <sup>▲</sup>
Luteolin	168±83	0,19±0,00	51,3±3,3	168±0	0,33±0,02*	78,7±1,0*	-	<LOD	-	168±0	0,26±0,00 <sup>▲</sup>	67,2±0,0 <sup>▲</sup>

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i saharozom u dozi od 4 g/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Farmakokinetika detektiranih flavona u jetri miša C57BL/6 prikazan je na Slici 87. Uspoređujući biodinamiku flavona apigenina između skupine ECT i skupine ECT+CARB, utvrđeno je da koncentracija apigenina u skupini ECT+CARB postiže najveću vrijednost nakon 7. dana obrade koja je u tom vremenskom periodu veća u odnosu na koncentraciju apigenina kod skupine ECT. Nakon 7. dana obrade, koncentracija apigenina se do 21. dana obrade smanjuje gotovo do nule za razliku od koncentracije apigenina u skupini ECT. Nakon 21. dana obrade, koncentracija apigenina u skupini ECT+CARB raste, ali u dosta niskoj koncentracijskoj vrijednosti u odnosu na skupinu ECT. Vrijednost koncentracije luteolina je u skupini ECT+CARB bila niskih vrijednosti do 21. dana obrade, a nakon toga iznosila nula.



Slika 87. Farmakokinetika i koncentracije flavona: a) apigenina, b) luteolina u jetri C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i saharoze (4 g/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

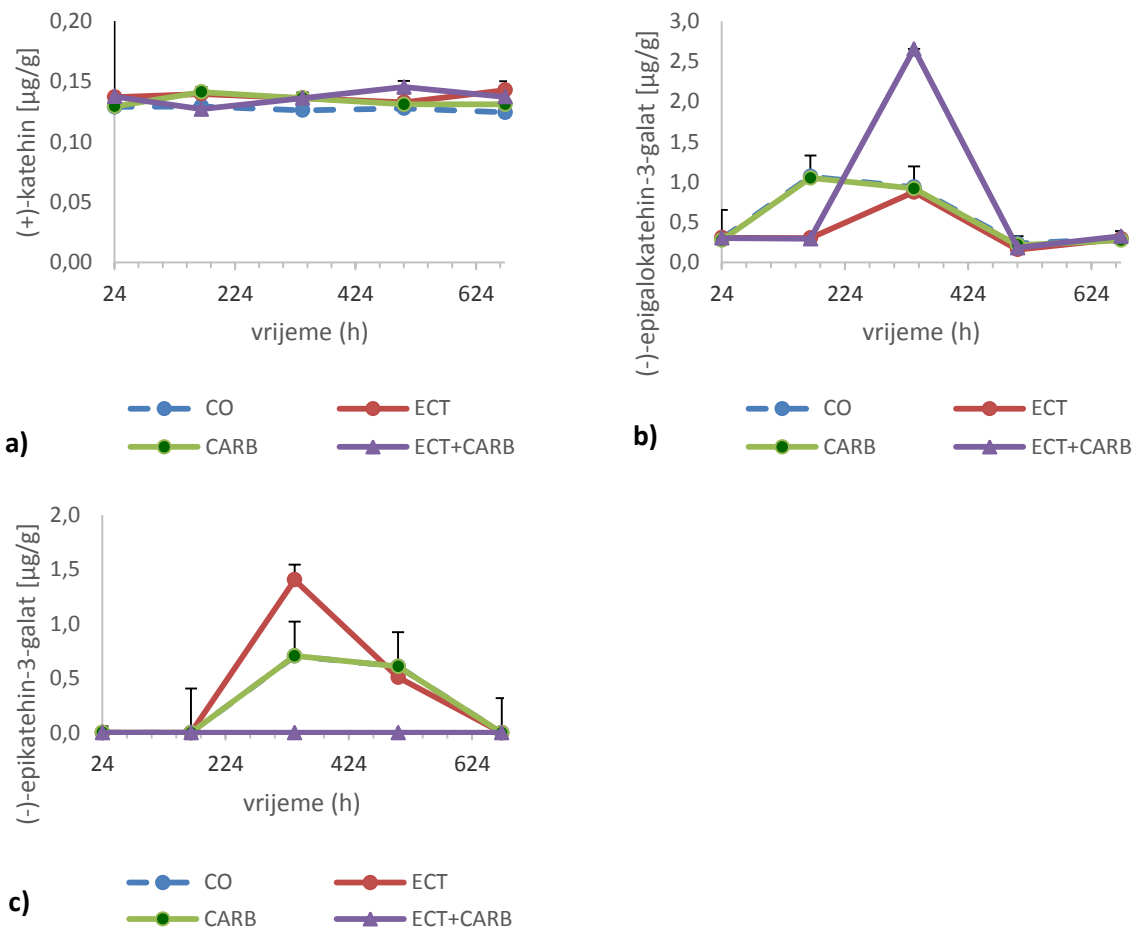
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u jetri pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i saharoze prikazani su u Tablici 78.

Tablica 78. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u jetri kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom ugljikohidratima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavan-3-ola detektirani u jetri; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CARB			ECT+CARB		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
(+)-katehin	168±37	0,13±0,00	84,1±0,1	672±290	0,14±0,00	90,5±0,0	168±0	0,14±0,00	88,9±0,0	504±277	0,14±0,00	90,3±0,1
(-)-epikatehin-3-galat	336±193	0,70±0,00	169,2±2,4	336±0	1,40±0,00*	265,9±0,0*	336±0	0,70±0,00	169,7±0,0	-	<LOD <sup>▲</sup>	-
(-)-epigalokatehin-3-galat	168±193	1,07±0,25	400,0±61,5	336±0	0,88±0,00	256,6±0,0	168±0	1,05±0,00	387,5±0,0	336±0	2,65±0,00 <sup>▲</sup>	492,9±0,0 <sup>▲</sup>

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i saharozom u dozi od 4 g/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Od spojeva iz skupine flavan-3-ola, najistaknutija koncentracija relativno viskom koncentracijama u skupini ECT+CARB uočena je za spoj (-)-epigalokatehin-3-galat između 7. i 21. dana obrade. Vrijednosti bioasporbiranih koncentracija ostalih spojeva iz skupine flavan-3-ola bila je vrlo niska (Slika 88).



Slika 88. Farmakokinetika i koncentracije flavan-3-ola: a) (+)-katehina, b) (-)-epigalokatehin-3-galata i c) (-)-epikatehin-3-galata u jetri C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i saharoze (4 g/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

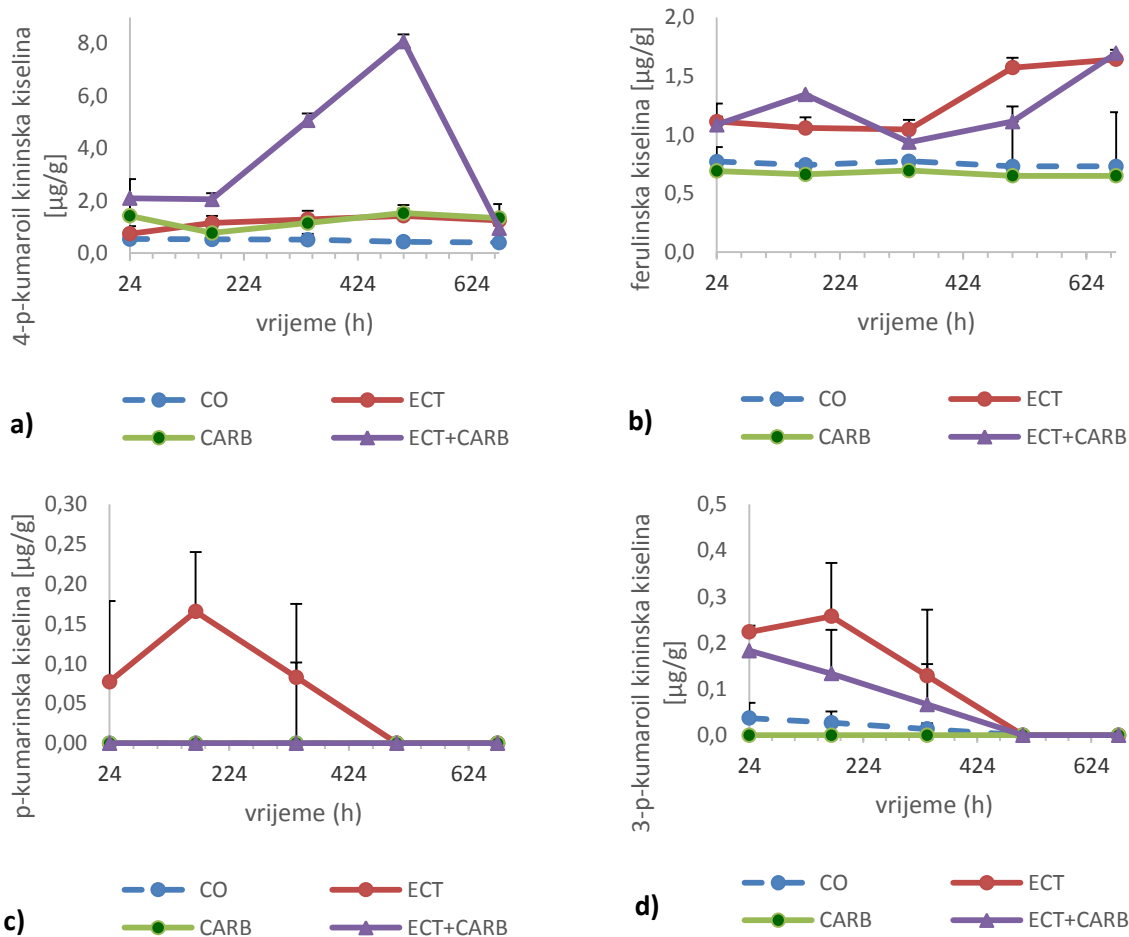
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u jetri pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i saharoze prikazani su u Tablici 79.

Tablica 79. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u jetri kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom ugljikohidratima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine fenolnih kiselina detektiranih u jetri; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CARB			ECT+CARB		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ (μg/g)	AUC (h·μg/g)
3- <i>O</i> -feruloil kininska kiselina	504±290	0,21±0,03	34,9±9,0	24±2	0,45±0,09*	81,0±4,6*	24±0	0,52±0,07	150,3±12,7	504±349	0,69±0,03	214,5±13,0 <sup>▲</sup>
3- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	24±8	0,04±0,00	8,3±0,7	168±0	0,26±0,00*	68,5±0,1*	24±0	LOD	LOD	24±9	0,18±0,01	40,9±2,7
4- <i>O</i> -kafeoil kininska kiselina	504±96	1,42±0,00	710,6±0,5	672±0	1,59±0,00	963,9±1,7	504±0	1,67±0,02	1026,1±6,5	24±9	1,38±0,00	822,0±1,7
4- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	24±1	0,54±0,01	317,5±2,8	24±1	0,54±0,01	317,5±2,8	504±374	1,52±0,09	793,3±14,2	504±277	8,07±0,07 <sup>▲</sup>	2582,7±13,3 <sup>▲</sup>
ferulinska kiselina	336±83	0,77±0,00	494,6±0,4	672±290	1,64±0,00	835,8±3,6	336±0	0,69±0,00	441,8±0,0	672±0	1,69±0,00	784,7±0,0
galna kiselina	672±0	0,58±0,01	76,9±8,8	672±387	1,31±0,19*	110,1±16,2	24±13	0,26±0,03	3,1±2,1	672±13	0,43±0,02 <sup>▲</sup>	73,6±1,9
kafeinska kiselina	504±0	0,24±0,00	54,5±0,2	504±277	1,79±0,15*	479,4±39,1*	168±96	0,072±0,08	13,9±1,9	504±96	0,21±0,00 <sup>▲</sup>	104,5±1,5 <sup>▲</sup>
<i>p</i> -kumarinska kiselina	24±0	0,00±0,00	0,0±0,0	168±83	0,17±0,03	38,4±0,0*	-	<LOD	-	-	<LOD <sup>▲</sup>	-

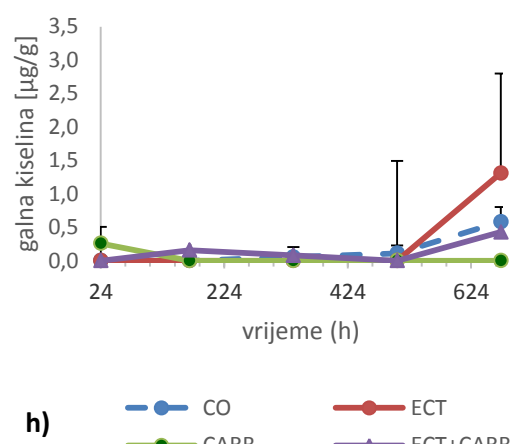
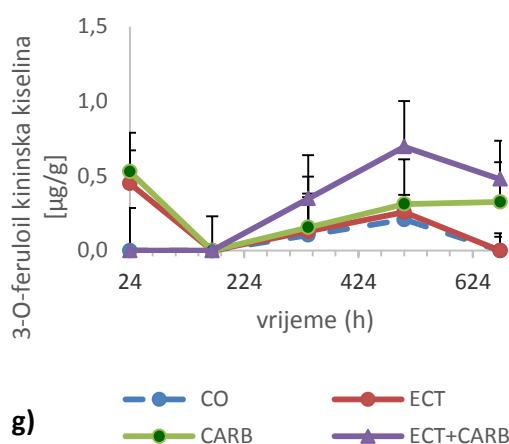
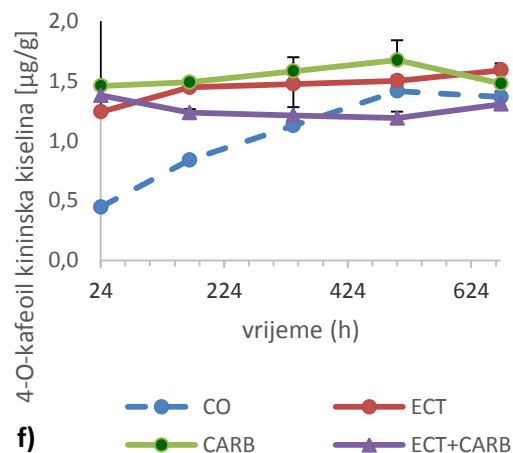
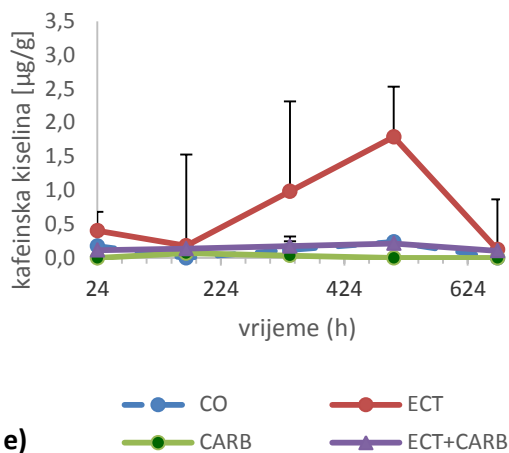
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i saharozom u dozi od 4 g/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Među fenolnim kiselina, najistaknutije vrijednosti bioapsorbiranih koncentracija čije su se vrijednosti kretale u relativno visokom i umjerenom koncentracijskom rasponu u skupini ECT+CARB uočene su za ferulinsku, 4-*O*-kafeoil kininsku i 4-*p*-kumaroil kininsku kiselinu. Vrijednosti bioapsorbiranih koncentracija ostalih spojeva iz skupine fenolnih kiselina bila je u vrlo niskom koncentracijskom rasponu (Slika 89).



Slika 89. Farmakokinetika i koncentracije fenolnih kiselina: a) 4-*p*-kumaroil kininske, b) ferulinske, c) *p*-kumarinske, d) 3-*p*-kumaroil kininske, e) kafeinske, f) 4-*O*-kafeoil kininske, g) 3-*O*-feruloil kininske i h) galne kiseline u jetri C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i saharoze (4 g/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 89. nastavak



Nakon subkroničnog doziranja ekstrakta cvijeta trnine i saharoze, u mozgu je ukupno detektirano 65,62% ( $N=21/32$ ) polifenolnih spojeva od ukupnog broja polifenolnih spojeva koje nalazimo u čistom ekstraktu cvijeta trnine. Statistički značajno različit AUC i  $c_{max}$  kod skupine ECT+CARB u usporedbi sa skupinom ECT uočen za 16 spojeva što čini 50% od ukupnih spojeva pronađenih u ekstraktu cvijeta trnine i 76,19% od ukupno detektiranih spojeva u mozgu.

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u mozgu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i saharoze prikazani su u Tablici 80.

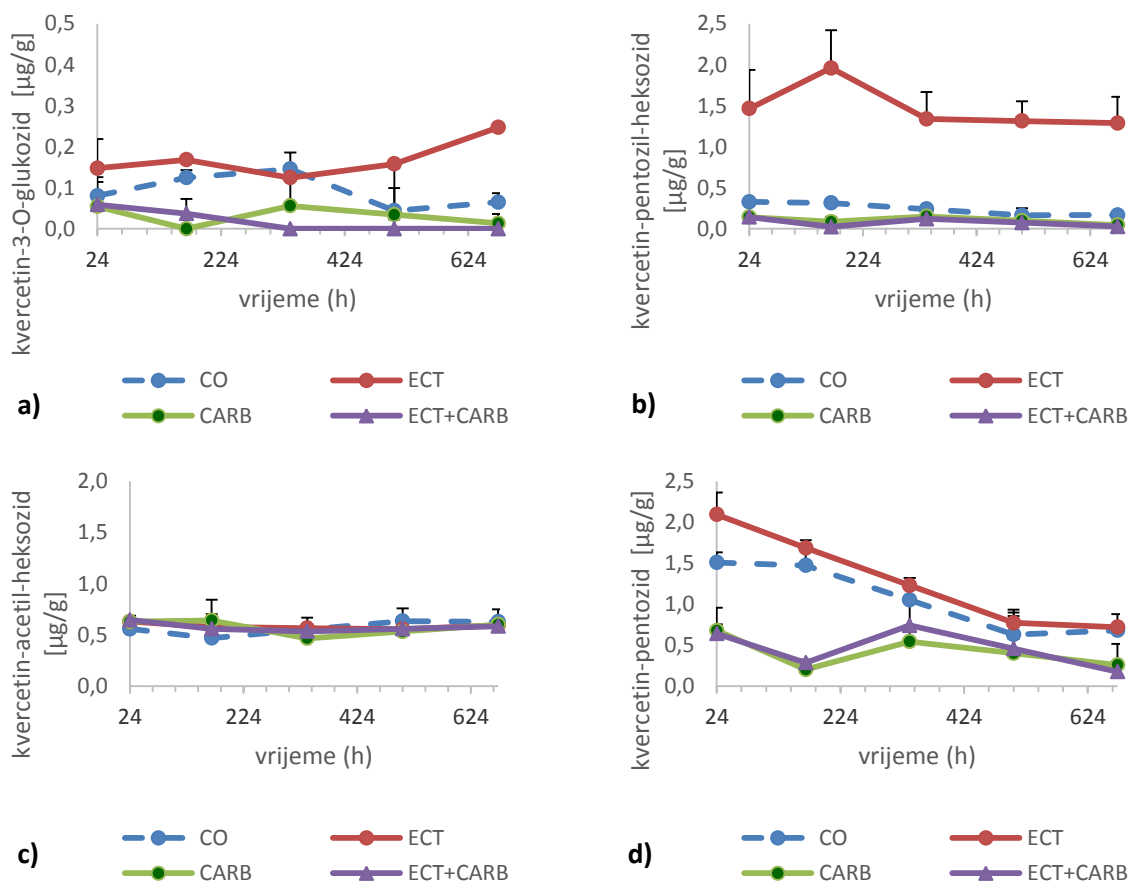


Tablica 80. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u mozgu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom ugljikohidratima tijekom 28 dana

Flavonoli detektirani u mozgu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CARB			ECT+CARB		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ (µg/g)	AUC (h·µg/g)
izoramnetin-3-rutinozid	672±0	0,39±0,06	258,0±1,57	168±0	0,43±0,02	265,7±3,5	168±29	0,41±0,05	263,4±13,5	672±340	0,42±0,00	266,9±0,0
kvercetin-3-glukozid	336±0	0,14±0,01	62,0±6,8	672±0	0,24±0,03*	107,0±5,5*	336±277	0,05±0,03	20,5±18,0	24±8	0,05±0,02 <sup>▲</sup>	7,5±0,0 <sup>▲</sup>
kvercetin-3- <i>O</i> -rutinid (rutin)	24±3	1,28±0,15	394,0±55,8	336±0	2,84±0,04*	1306,0±74,0*	168±83	1,77±1,04	493,7±343,6	168±3	1,57±0,24	638,7±0,0 <sup>▲</sup>
kvercetin-acetil-heksozid	504±97	0,63±0,00	373,0±15,8	24±0	0,63±0,01	382,0±17,02	168±19	0,64±0,05	371,1±51,6	24±0	0,64±0,01	375,4±0,0
kvercetin-pentozid	24±8	1,51±0,22	692,0±146,8	24±0	2,09±0,26	830,0±28,8	24±27	0,67±0,08	262,1±22	336±277	0,74±0,26 <sup>▲</sup>	306,8±0,0 <sup>▲</sup>
kvercetin-pentozil-heksozid	24±8	0,32±0,03	158,0±78,6	168±83	1,96±0,04*	979,0±8,31*	336±246	0,15±0,01	70,2±14,7	24±2	0,14±0,01 <sup>▲</sup>	48,0±0,0 <sup>▲</sup>
kvercetin-ramnozid	504±83	0,68±0,02	425,9±4,0	672±0	2,92±0,01*	1136,4±0,58*	24±8	0,06±0,01	30,1±5,2	24±0	0,65±0,05 <sup>▲</sup>	291,0±0,0 <sup>▲</sup>
kampferol-3-glukozid	168±0	0,24±0,06	108,2±11,6	168±0	0,19±0,00	89,6±0,5	168±8	0,07±0,01	38,3±1,7	24±0	0,11±0,02	23,5±0,0 <sup>▲</sup>
kampferol-3-rutinozid	24±0	0,06±0,01	33,0±5,3	672±0	0,28±0,00*	147,0±1,3*	24±8	0,15±0,00	71,6±11,5	24±2	0,13±0,02 <sup>▲</sup>	64,8±0,0 <sup>▲</sup>
kampferol-pentozid	168±83	2,58±0,04	1295,6±22,8	168±0	2,64±0,05	1326,7±17,6	24±2	1,66±0,10	691,2±67,3	24±0	1,57±0,16	602,8±0,0 <sup>▲</sup>
kampferol-ramnozil-heksozid	24±8	0,65±0,04	294,6±15,7	336±0	0,73±0,01	416,7±5,5	24±2	0,03±0,00	14,6±1,5	24±0	0,40±0,04	156,7±0,0 <sup>▲</sup>

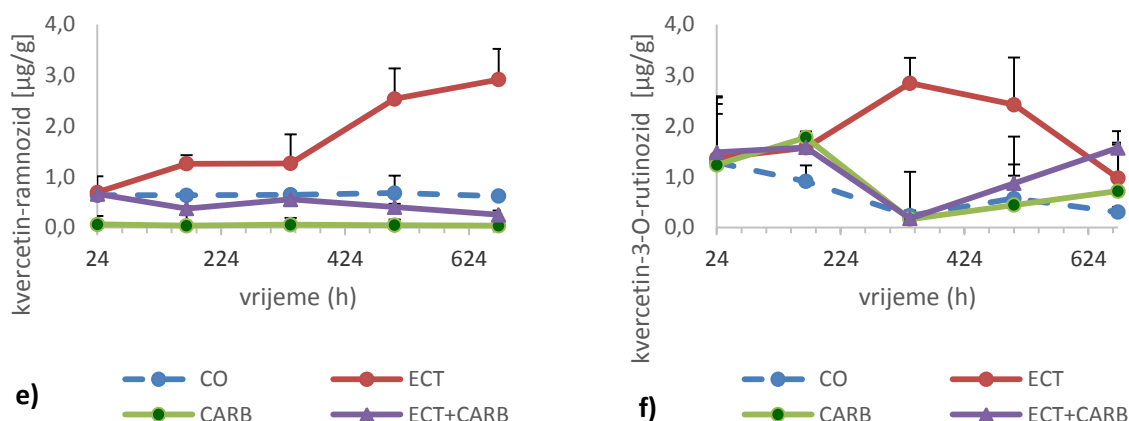
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i saharozom u dozi od 4 g/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Od kvercetinских spojeva u mozgu, najveće vrijednosti bioasporbiranih koncentracija u skupini ECT+CARB uočene su za spoj kvercetin-3-rutinozid i to od 1. do 14. dana obrade nakon čega mu se bioapsorpcija smanjuje, te od 21. do 28. dana gdje je uočen ponovni porast njegove bioapsorpcije. Vrijednosti bioasporbiranih koncentracija ostalih metabolita kvercetina bila je slična i kretala se unutar niskog raspona koncentracija, ali izrazito nižih vrijednosti u odnosu na ECT skupinu osim kvercetin-acetil-heksozida (Slika 90).

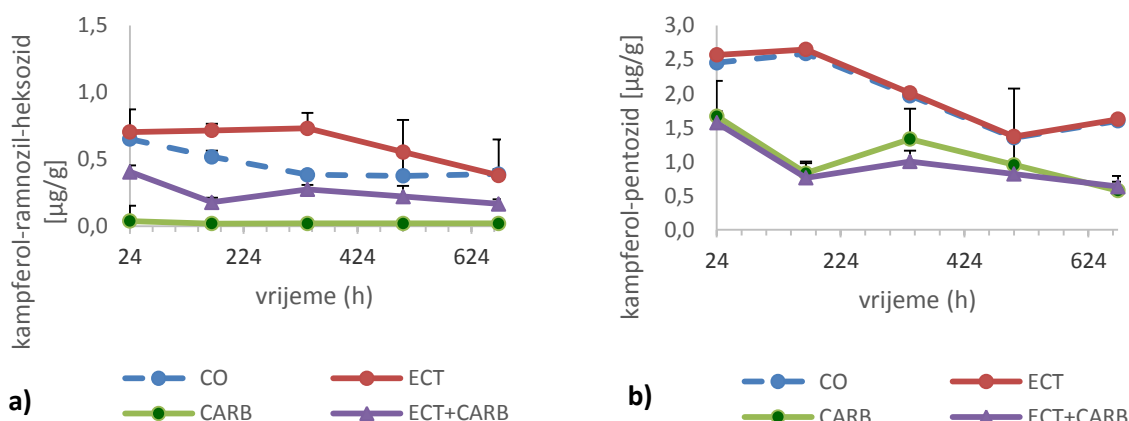


Slika 90. Farmakokinetika i koncentracije kvercetina: a) kvercetin-3-O-glukozida, b) kvercetin-pentozil-heksozida, c) kvercetin-acetil-heksozida, d) kvercetin-pentozida, e) kvercetin-ramnozida i f) kvercetin-3-O-rutinozida u mozgu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i saharoze (4 g/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 90. nastavak

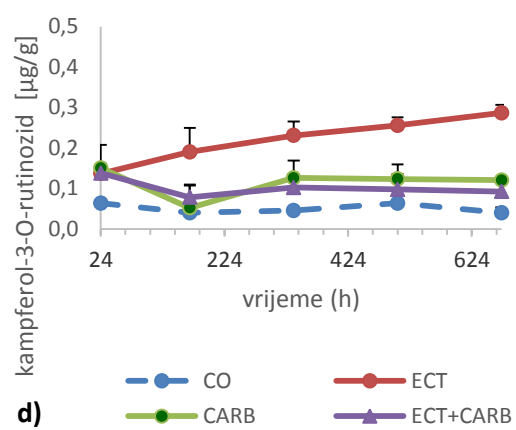
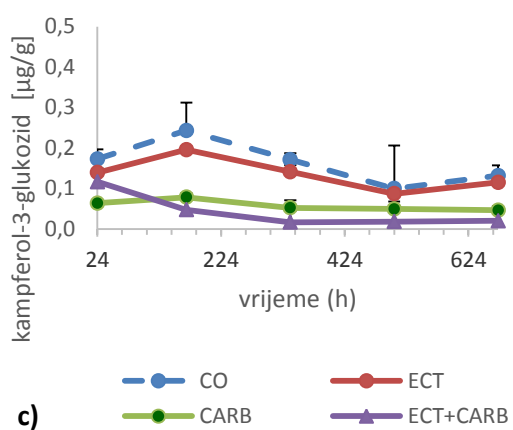


Među kampferolnim spojevima u skupini ECT+CARB, umjerene koncentracije uočene su za spoj kampferol-pentozid, dok se biodinamika i vrijednost bioapsorbiranih koncentracija ostalih spojeva kampferola u skupini ECT+CARB kretala unutar niskog raspona koncentracija i nižih vrijednosti u odnosu na ECT (Slika 91).



Slika 91. Farmakokinetika i koncentracije kampferola: a) kampferol-ramnozid-heksozida, b) kampferol-pentozida, c) kampferol-3-glukozida i d) kampferol-3-O-rutinozida u mozgu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i saharoze (4 g/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao  $\text{SV} \pm \text{SD}$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharozna, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 91. nastavak



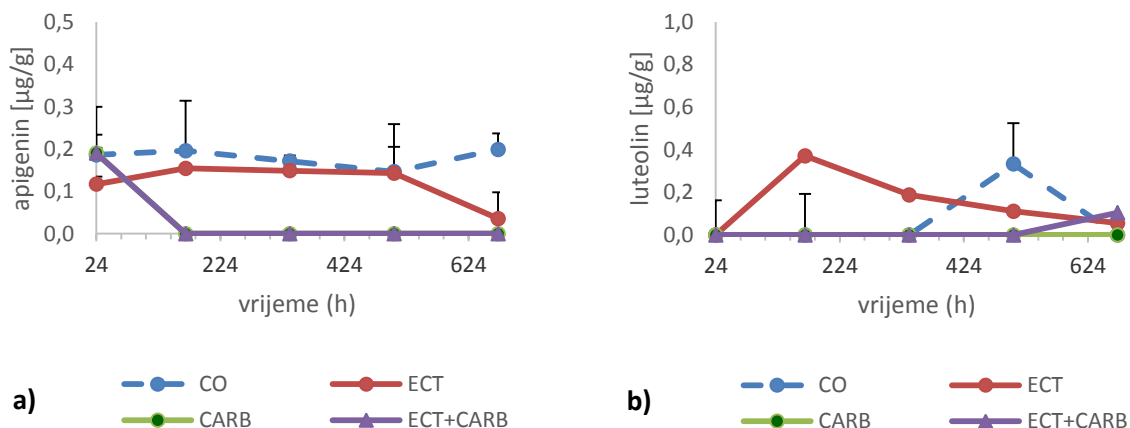
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u mozgu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i saharoze prikazani su u Tablici 81.

Tablica 81. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u mozgu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom ugljikohidratima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavona detektirani u mozgu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CARB			ECT+CARB		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
Apigenin	672±83	0,19±0,07	116±21,3	168±0	0,15±0,00	83,8±4,3	24±14	0,19±0,10	2,3±0,7	24±0	0,17±0,01	2,0±0,0 <sup>▲</sup>
Luteolin	504±83	0,33±0,03	27,9±3,4	168±0	0,37±0,00	109,8±0,0*	-	<LOD	-	672±0	0,10±0,00 <sup>▲</sup>	8,7±0,0 <sup>▲</sup>

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i saharozom u dozi od 4 g/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Za spojeve iz skupine flavona, u skupini ECT+CARB uočene su vrlo niske koncentracije bioasporpcije i to za apigenin gotovo do nule neposredno nakon 1. dana obrade i za luteolin, do 21. dana, a nakon toga vrijednost luteolina raste do 28. dana obrade (Slika 92).



Slika 92. Farmakokinetika i koncentracije flavona: a) apigenina, b) luteolina u mozgu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i saharoze (4 g/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

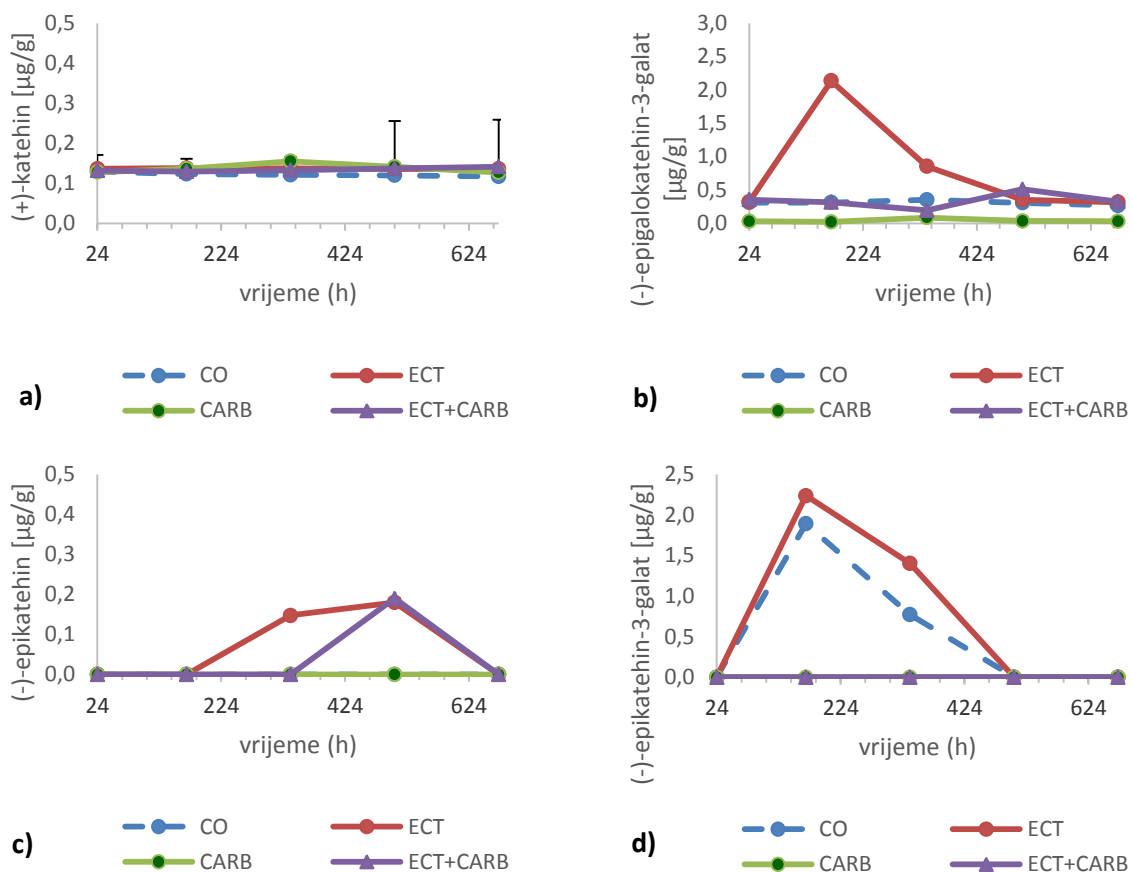
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u mozgu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i saharoze prikazani su u Tablici 82.

Tablica 82. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u mozgu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom ugljikohidratima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavan-3-ola detektirani u mozgu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CARB			ECT+CARB		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
(+)-katehin	24±374	0,12±0,05	80,4±1,1	168±37	0,13±0,00	90,3±1,17	336±0	0,15±0,00	92,4±1,25	672±291	0,14±0,00	88,5±0,0
(-)-epikatehin	-	<LOD	-	504±0	0,18±0,00	39,9±0,0*	-	<LOD	-	504±0	0,19±0,00	16,0±0,0 <sup>▲</sup>
(-)-epikatehin-3-galat	168±0	1,89±0,00	346,2±0,0	168±0	12,23±0,00	461,6±0,0	-	<LOD	-	-	LOD <sup>▲</sup>	-
(-)-epigalokatehin-3-galat	336±0	0,35±0,00	207,7±0,0	168±0	2,13±0,00	567,6±0,0*	336±0	0,08±0,00	28,1±0,0	504±0	0,51±0,00 <sup>▲</sup>	222,7±0,0 <sup>▲</sup>

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i saharozom u dozi od 4 g/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Koncentracije bioapsorpcije katehinskih spojeva u mozgu također su se u skupini ECT+CARB u odnosu na skupinu ECT kretale u vrlo niskom rasponu koncentracija. Od detektiranih katehinskih spojeva, najveće koncentracije u skupini ECT+CARB uočene su za spoj (-)-epigalokatehin-3-galat (Slika 93).



Slika 93. Farmakokinetika i koncentracije flavan-3-ola: a) (+)-katehina, b) (-)-epigalokatehin-3-galata, c) (-)-epikatehina i d) (-)-epikatehin-3-galata u mozgu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i saharoze (4 g/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD- standardna devijacija.

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u mozgu pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i saharoze prikazani su u Tablici 83.

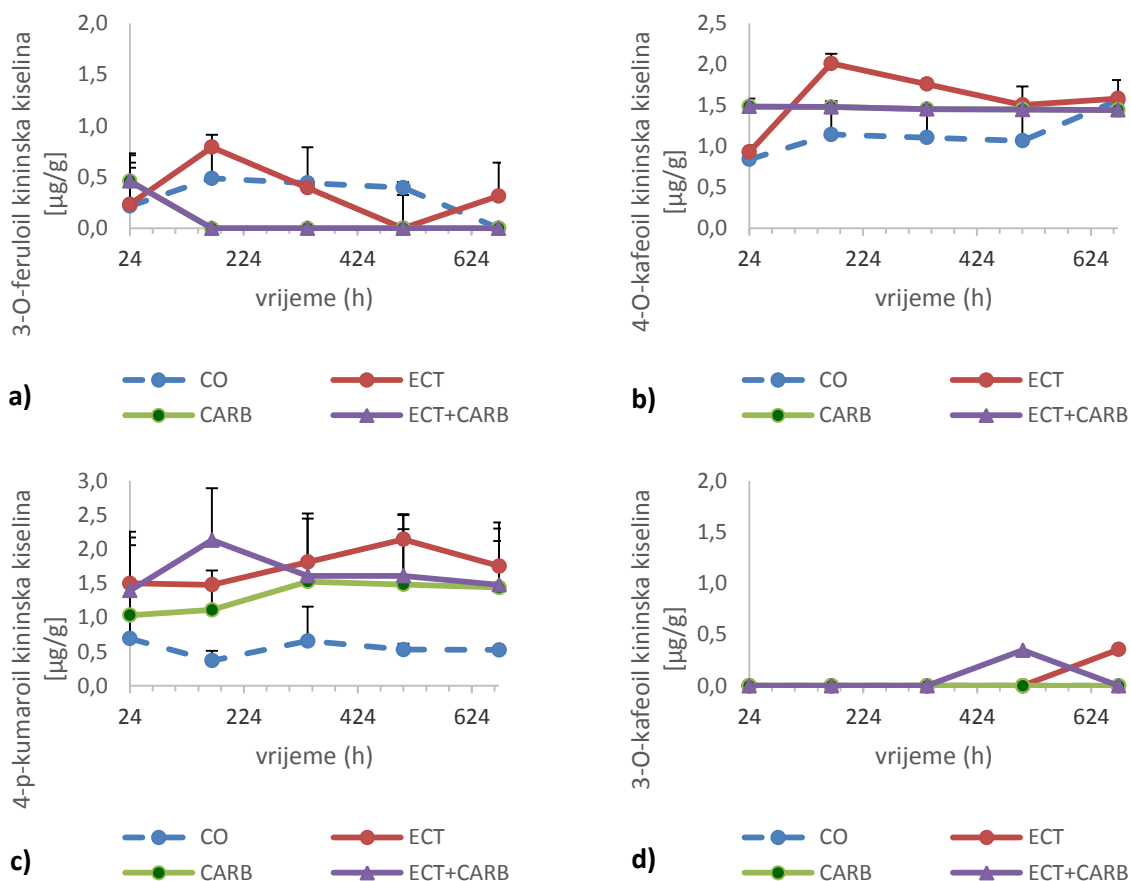


Tablica 83. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u mozgu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom ugljikohidratima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine fenolnih kiselina detektiranih u mozgu; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CARB			ECT+CARB		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
3- <i>O</i> -feruloil kininska kiselina	168±19	0,48±0,05	202,0±114,9	168±0	0,79±0,00*	232,0±53,7	24±14	0,46±0,27	5,5±1,9	24±14	0,28±0,25 <sup>▲</sup>	3,5±0,0 <sup>▲</sup>
4- <i>O</i> -kafeoil kininska kiselina	672±0	1,56±0,04	746,0±126,4	168±0	2,01±0,115	1072±43,3	24±8	1,48±0,05	964,1±15,6	168±19	1,51±0,23	979,3±0,0
4- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	24±3	0,69±0,25	356,0±153,6	504±0	2,14±0,05*	1166,0±47,9*	336±83	1,52±0,53	885,8±196,4	168±19	2,13±0,06	1112,0±0,0
ferulinska kiselina	168±0	1,52±0,00	856,4±0,0	504±0	1,64±0,00	929,6±0,0	672±0	1,64±0,00	919,0±0,0	24±0	1,15±0,00	717,2±0,0
galna kiselina	24±0	1,87±0,47	185,8±143,8	24±0	2,50±0,47	685,6±26,7*	168±97	0,45±0,26	33,0±6,3	24±9	0,25±0,04 <sup>▲</sup>	36,4±0,0 <sup>▲</sup>

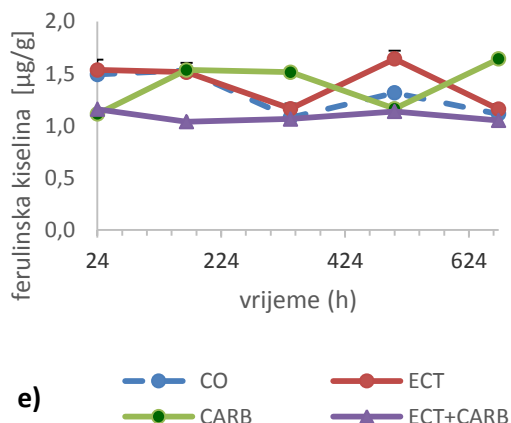
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i saharozom u dozi od 4 g/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Među fenolnim kiselinama, najveće bioapsorbirane koncentracije u umjerenom rasponu koncentracija i slična biodinamika u skupini ECT+CARB uočene su za 4-*O*-kafeoil kininsku, 4-*p*-kumaroil kininsku i ferulinsku kiselinu tijekom svih 28. dana obrade, dok se vrijednost 3-*O*-feruloil kininske kiseline kretala unutar niskom raspona koncentracija (Slika 94).



Slika 94. Farmakokinetika i koncentracije fenolnih kiselina: a) 3-*O*-feruloil kininske, b) 4-*O*-kafeoil kininske, c) 4-*p*-kumaroil kininske, d) 3-*O*-kafeoil kininske i e) ferulinske kiseline u mozgu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i saharoze (4 g/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 94. nastavak



Nakon subkroničnog doziranja ekstrakta cvijeta trnine i saharoze, u bubrezima je ukupno detektirano 31,25% ( $N=10/32$ ) polifenolnih spojeva od ukupnog broja polifenolnih spojeva koje nalazimo u čistom ekstraktu cvijeta trnine. Statistički značajno različit AUC i  $c_{\max}$  kod skupine ECT+CARB u usporedbi sa skupinom ECT uočen za 8 spojeva što čini 25,0% od ukupnih spojeva pronađenih u ekstraktu cvijeta trnine i 80% od ukupno detektiranih spojeva u bubrezima.

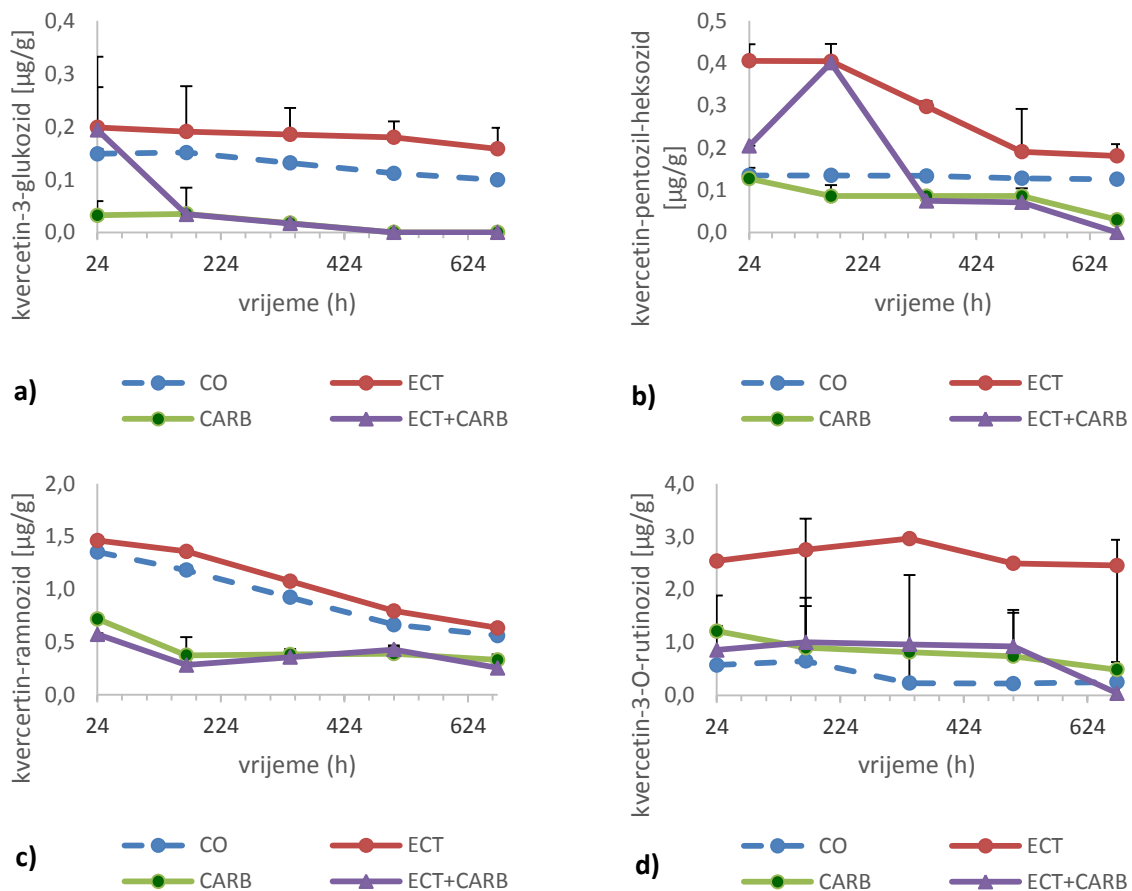
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u u bubrezima pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i saharoze prikazani su u Tablici 84.

Tablica 84. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavonola u bubrezima kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom ugljikohidratima tijekom 28 dana

Flavonoli detektirani u bubrezima; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CHOL			ECT+CHOL		
	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{max}$ (h)	$c_{max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
kampferol-pentozid	24±0	2,77±0,02	1317,0±14,7	24±0	2,94±0,03	1381,1±12,5	24±0	1,69±0,29	671,1±76,8	24±0	1,35±0,19 <sup>▲</sup>	544,7±0,0 <sup>▲</sup>
kvercetin-3-glukozid	168±83	0,15±0,00	85,1±1,0	24±0	0,20±0,00	121,0±0,6	168±83	0,03±0,00	9,5±1,2	24±8	0,19±0,14	19,7±0,0 <sup>▲</sup>
kvercetin-3-O-rutinozid (rutin)	168±19	0,65±0,35	240,1±100,8	336±0	2,96±0,02*	1764,0±6,7*	24±2	1,21±0,17	541,2±140,1	168±83	1,00±0,75 <sup>▲</sup>	514,9±0,0 <sup>▲</sup>
kvercetin-pentozil-heksozid	24±0	0,13±0,00	86,8±1,2	24±8	0,41±0,00*	193,2±1,1*	24±0	0,12±0,03	54,4±15,1	168±0	0,40±0,00	90,8±0,0 <sup>▲</sup>
kvercetin-ramnozid	24±0	1,35±0,02	609,0±12,7	24±0	1,46±0,00	699,5±1,0	24±0	0,71±0,03	273,3±45,9	24±0	0,57±0,01 <sup>▲</sup>	241,9±0,0 <sup>▲</sup>

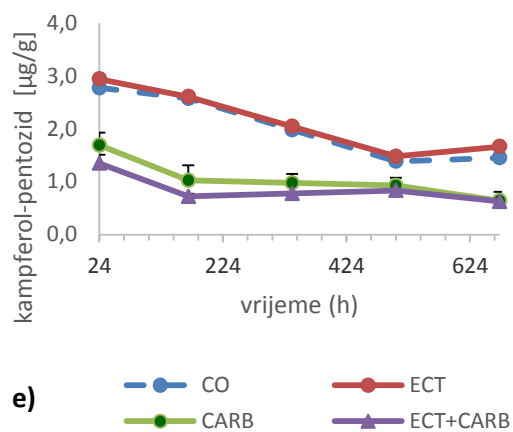
<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i saharozom u dozi od 4 g/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

U bubregu, slična vremenska biodinamika uočena je kod svih detektiranih spojeva iz skupine flavonola kako kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine, tako i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s s prehranom obogaćenom ugljikohidratima (Slika 95). Najistaknutije razlike u koncentraciji između skupina ECT i ECT+CARB uočene su za spojeve kampferol-pentozid, kvercetin-ramnozid i kvercetin-3-*O*-rutinozid čije su koncentracije u skupini ECT za razliku od skupine ECT+CARB utvrđene u relativno visokom i umjerenom rasponu koncentracija tijekom cijelog trajanja obrade.



Slika 95. Farmakokinetika i koncentracije metabolita flavonola: a) kvercetin-3-glukozida, b) kvercetin-pentozil-heksozida, c) kvercetin-ramnozida, d) kvercetin-3-*O*-rutinozida i e) kampferol-pentozida u bubregu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i saharoze (4 g/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV $\pm$ SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

Slika 95. nastavak



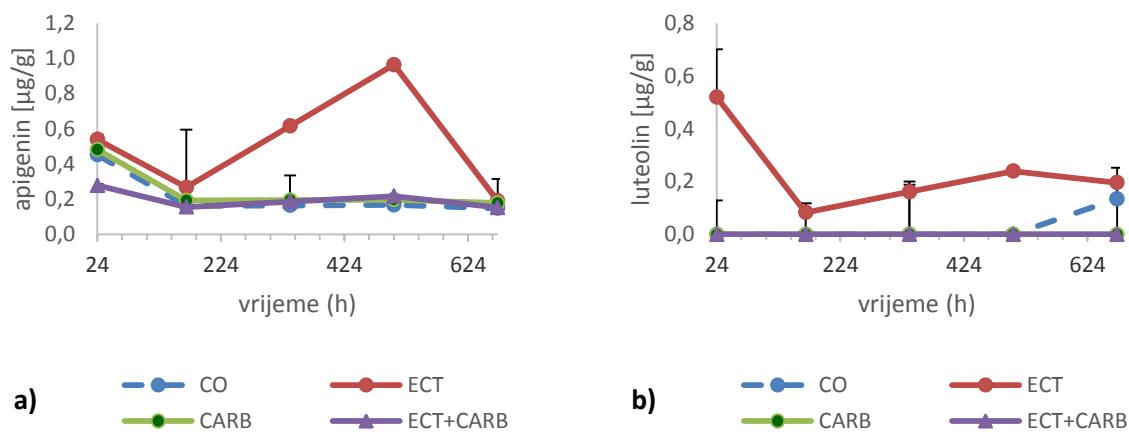
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavona u u bubrezima pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trine i saharoze prikazani su u Tablici 85.

Tablica 85. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri metabolita flavona u bubrezima kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom ugljikohidratima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavona detektirani u bubrezima; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CARB			ECT+CARB		
	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)
Apigenin	24±0	0,45±0,01	128,2±1,0	504±0	0,96±0,02*	349,2±2,6*	24±8	0,48±0,40	148,3±123,4	24±0	0,27±0,00 <sup>▲</sup>	127,1±0,0 <sup>▲</sup>
Luteolin	672±0	0,13±0,15	11,3±3,5	24±0	0,52±0,19*	131,2±13,7*	-	<LOD	-	-	<LOD <sup>▲</sup>	-

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i saharozom u dozi od 4 g/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Za razliku od skupine ECT, koncentracije bioapsorpcije apigenina su se u skupini ECT+CARB tijekom cijelog trajanja obrade kretale u ravnomjernim koncentracijama niskih vrijednosti. Kod skupine ECT+CARB, bioapsopcija luteolina je kroz cijeli tretman iznosila nula (Slika 96).



Slika 96. Farmakokinetika i koncentracije flavona: a) apigenina, b) luteolina u bubregu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i saharoze (4 g/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u u bubrezima pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnine i saharoze prikazani su u Tablici 86.

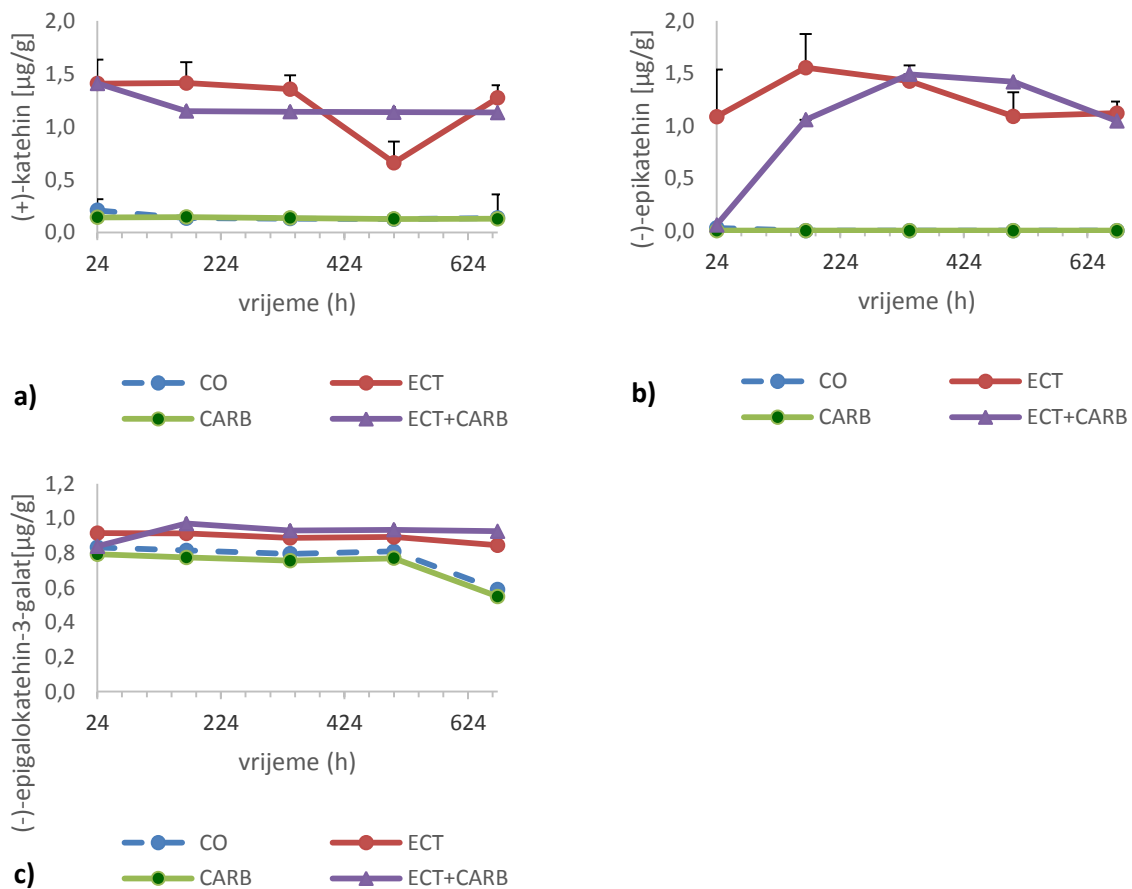


Tablica 86. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri flavan-3-ola u bubrezima kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom ugljikohidratima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine flavan-3-ola detektirani u bubrezima; subkronična doza (1.-28. dan)	Skupina											
	CO			ECT			CARB			ECT+CARB		
	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )	$t_{\max}$ (h)	$c_{\max}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	AUC ( $\text{h}\cdot\mu\text{g/g}$ )
(+)-katehin	24±0	0,21±0,00	92,9±0,0	168±0	1,41±0,01*	776,2±1,4*	168±25	0,14±0,01	89,8±13,5	24±3	1,40±0,42	774,4±0,0
(-)-epikatehin	24±0	0,03±0,00	0,3±0,0	168±0	1,55±0,00*	848,4±0,4*	-	<LOD	-	336±14	1,49±0,05	744,4±0,0
(-)-epigalokatehin-3-galat	24±0	0,83±0,00	514,9±0,0	24±0	0,91±0,00	589,1±0,0	24±3	0,79±0,15	488,4±13,3	168±0	0,97±0,00	612,6±0,0

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i saharozom u dozi od 4 g/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Za spojeve iz skupine flavan-3-ola utvrđena je slična biodinamika između skupine ECT i ECT+CARB (Slika 97). Najveće koncentracije u umjerenom rasponu koncentracija utvrđene su za (-)-epikatehin između 7. i 21. dana kod skupine ECT+CARB, te 1. i 14. dana kod skupine ECT, nakon čega se njegova koncentracija u obje skupine smanjuje. Koncentracija (+)-katehina i (-)-epigalokatehin-3-galata se tijekom cijelog obrade kretala također u umjerenom rasponu koncentracija, izuzev 14. i 21. dana za spoj (+)-katehin, gdje mu se koncentracija u tom vremenskom periodu u skupini ECT smanjila do niskih koncentracija.



Slika 97. Farmakokinetika i koncentracije flavan-ola: a) (+)-katehina, b) (-)-epikatehina i c) (-)-epigalokatehin-3-galata u bubregu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnina (25 mg/kg tj. m.) i saharoze (4 g/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnina, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

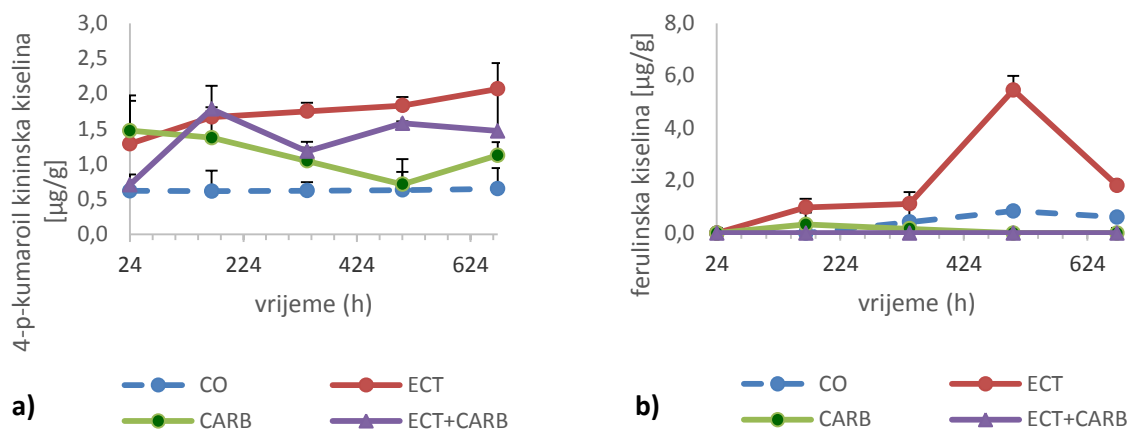
UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u u bubrezima pokusnih životinja nakon subkronične primjene vodenog ekstrakta cvijeta trnina i saharoze prikazani su u Tablici 87.

Tablica 87. UPLC analiza i osnovni farmakokinetički parametri fenolnih kiselina u bubrezima kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom ugljikohidratima tijekom 28 dana

Spojevi iz skupine fenolnih kiselina detektiranih u bubrezima; subkronična doza (1.-28. dan) <sup>a</sup>	Skupina											
	CO			ECT			CARB			ECT+CARB		
	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)	<i>t</i> <sub>max</sub> (h)	<i>c</i> <sub>max</sub> (µg/g)	AUC (h·µg/g)
4- <i>p</i> -kumaroil kininska kiselina	672±291	0,65±0,03	412,3±11,1	672±291	0,65±0,03	412,3±11,1	24±0	1,47±0,00	724±0,0	168±0	1,78±0,00	919,9±0,0
ferulinska kiselina	504±277	0,84±0,56	261,6±212,7	504±277	0,84±0,56	261,6±212,79	168±97	0,32±0,05	62,9±13,5	-	LOD <sup>▲</sup>	-

<sup>a</sup>Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan i saharozom u dozi od 4 g/kg/dan. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, <LOD-ispod granice detekcije.

Od fenolnih kiselina, koncentracija ferulinske kiseline je za razliku od skupine ECT kod skupine ECT+CARB tijekom cijelog trajanja obrade iznosila nula. Za 4-*p*-kumaroil kininsku kiselinu je između skupine ECT i ECT+CARB utvrđena slična vremenska biodinamika kao i umjereni raspon koncentracija tijekom svih 28 dana obrade (Slika 98).

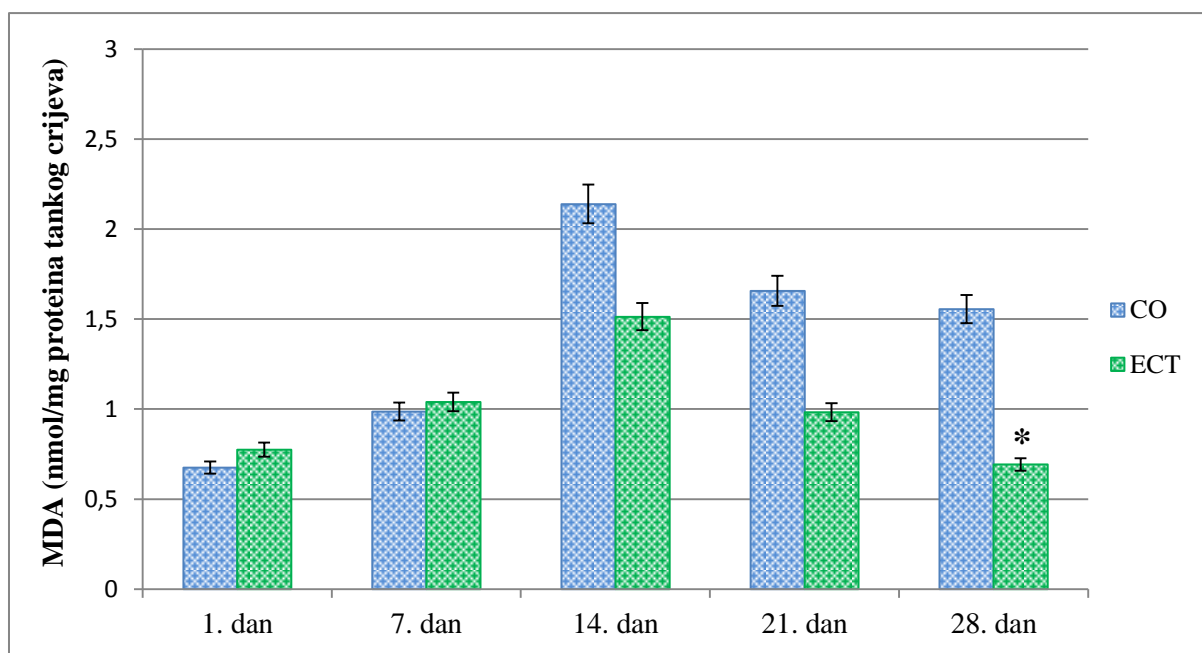


Slika 98. Farmakokinetika i koncentracije fenolnih kiselina: a) 4-*p*-kumaroil kininske, b) ferulinske kiseline u bubregu C57BL/6 miša nakon intragastrične primjene ekstrakta cvijeta trnine (25 mg/kg tj. m.) i saharoze (4 g/kg tj. m.) jednom dnevno tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SD. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, CARB – saharoza, SV- srednja vrijednost, SD-standardna devijacija.

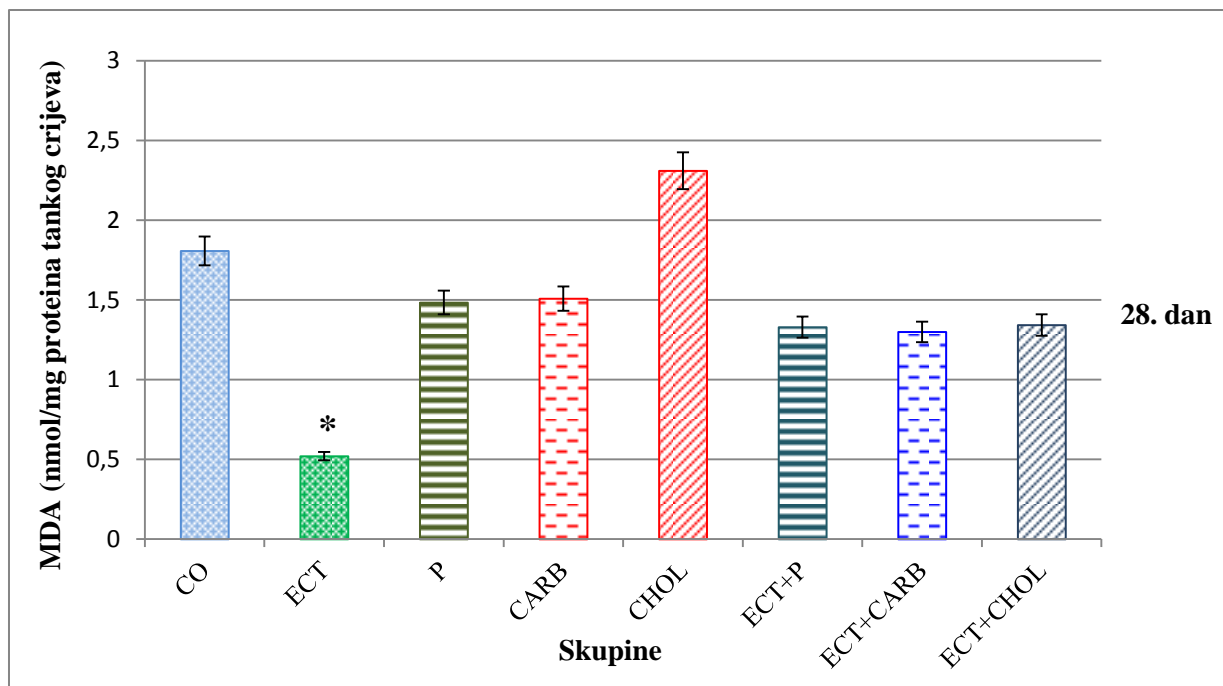
#### 4.4. ANTIOKSIDACIJSKI UČINAK POLIFENOLA NA AKTIVNOST BILJEGA OKSIDACIJSKOG STRESA U ORGANIMA MIŠA C57BL/6

##### 4.4.1. Vrijednosti lipidne peroksidacije (MDA) tankog crijeva, jetre, mozga i bubrega

Analizom koncentracije MDA u tankom crijevu (Slika 99) zapažena je statistički značajno manja vrijednost kod skupine ECT u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu 28. dana obrade ( $P < 0,05$ ). Prilikom usporedbe koncentracije MDA u tankom crijevu 28. dana obrade (Slika 100) između ostalih skupina nisu dobivene statistički značajne razlike ( $P > 0,05$ ).

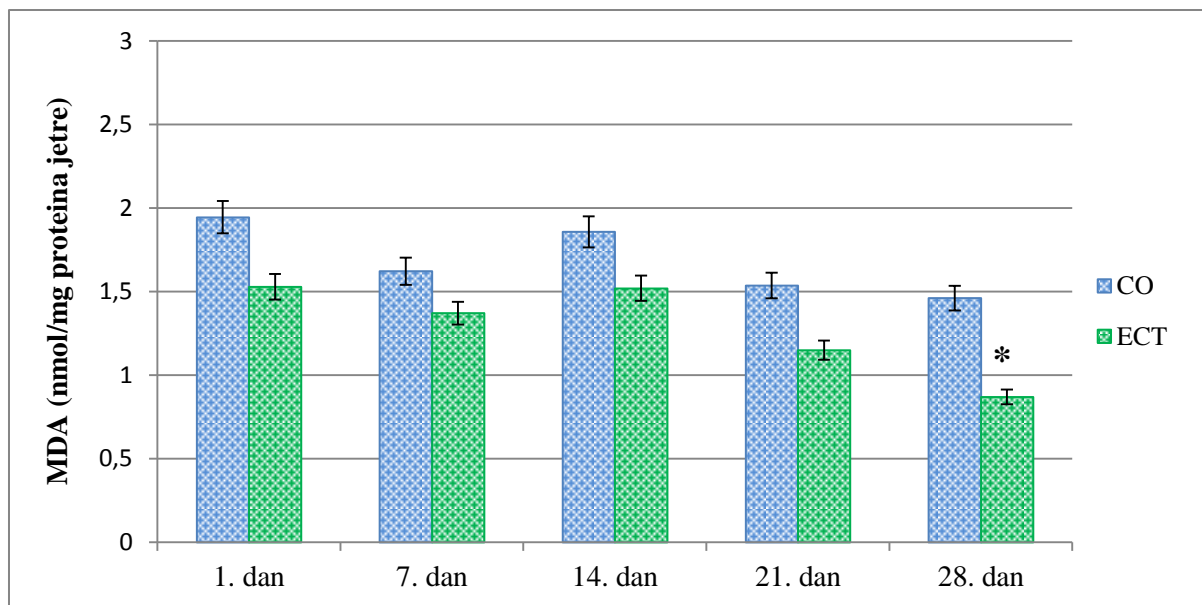


Slika 99. Koncentracija malondialdehida (MDA) u uzorcima tkiva tankog crijeva miševa obrađenih ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana. Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

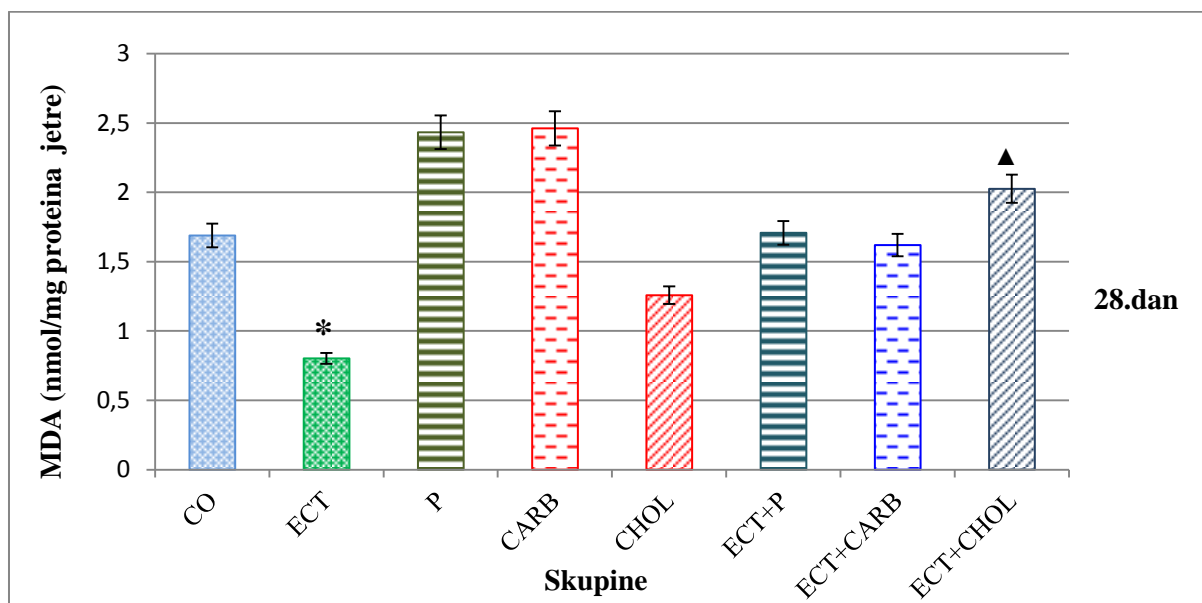


Slika 100. Koncentracija malondialdehida (MDA) u homogenatima tkiva tankog crijeva kod kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

Analizom podataka zapaženo je statistički značajno smanjenje koncentracije MDA (ANOVA,  $P<0,05$ ) u tkivu jetre 28. dana obrade kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (CO) (Slika 101). Također je zapažena statistički značajno povišena vrijednost ( $P<0,05$ ) MDA u tkivu jetre 28. dana obrade kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s kolesterolom (ECT+CHOL) u odnosu na skupinu obrađenu ekstraktom cvijeta trnine (ECT) (Slika 102).

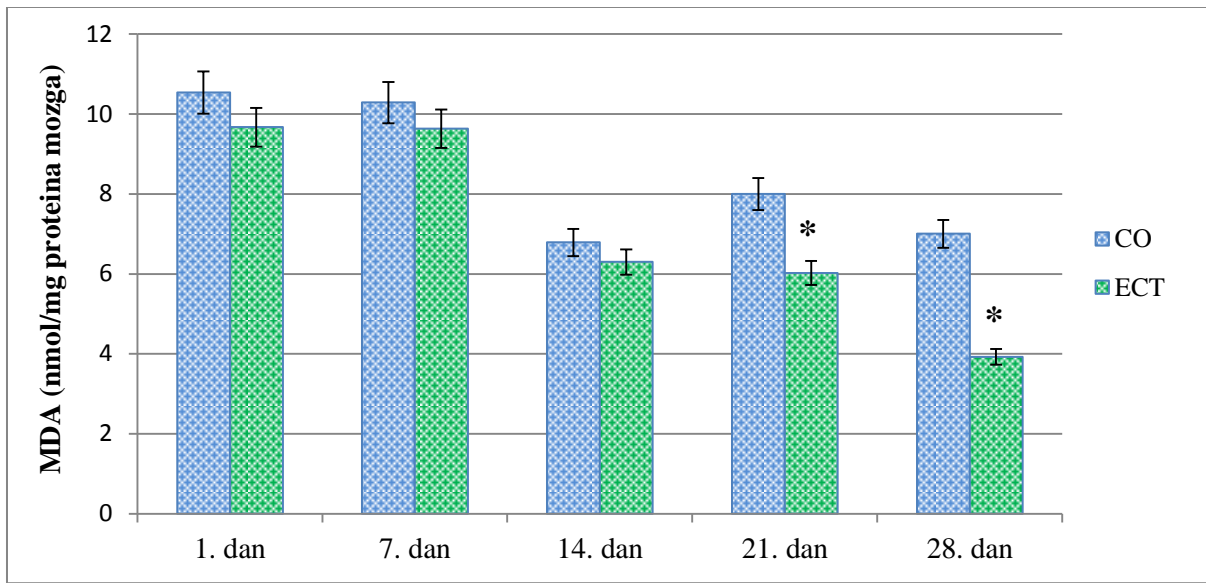


Slika 101. Koncentracija malondialdehida (MDA) u homogenatima tkiva jetre miševa obrađenih ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana. Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.



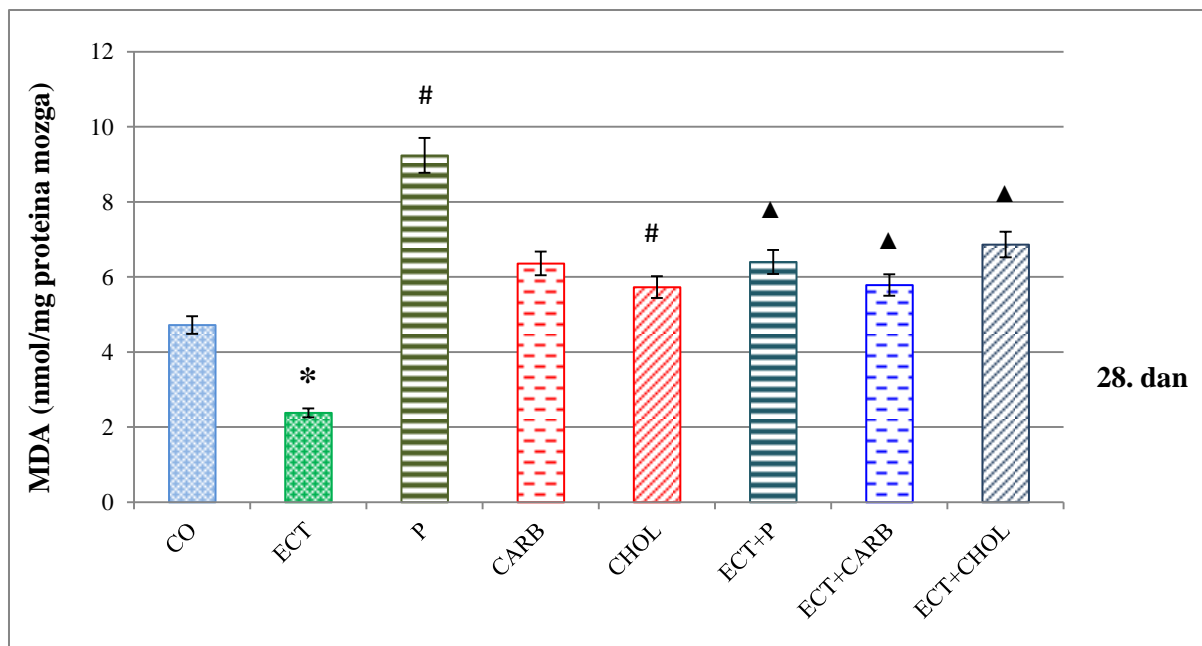
Slika 102. Koncentracija malondialdehida (MDA) u homogenatima tkiva jetre kod kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>^</sup>statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

Analizom koncentracije MDA u mozgu (Slika 103) zapaženo je statistički značajno smanjenje MDA kod ECT skupine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu 21. i 28. dana obrade ( $P<0,05$ ). U odnosu na skupinu ECT, statistički značajno povećana koncentracija MDA u mozgu 28. dana obrade (Slika 104), uočena je u skupinama ECT+P, ECT+CHOL i ECT+CARB ( $P<0,05$ ). Statistički značajno povećana koncentracija MDA utvrđena je i u skupini obrađenoj proteini sirutkema u odnosu na skupinu ECT+P ( $P<0,05$ ).



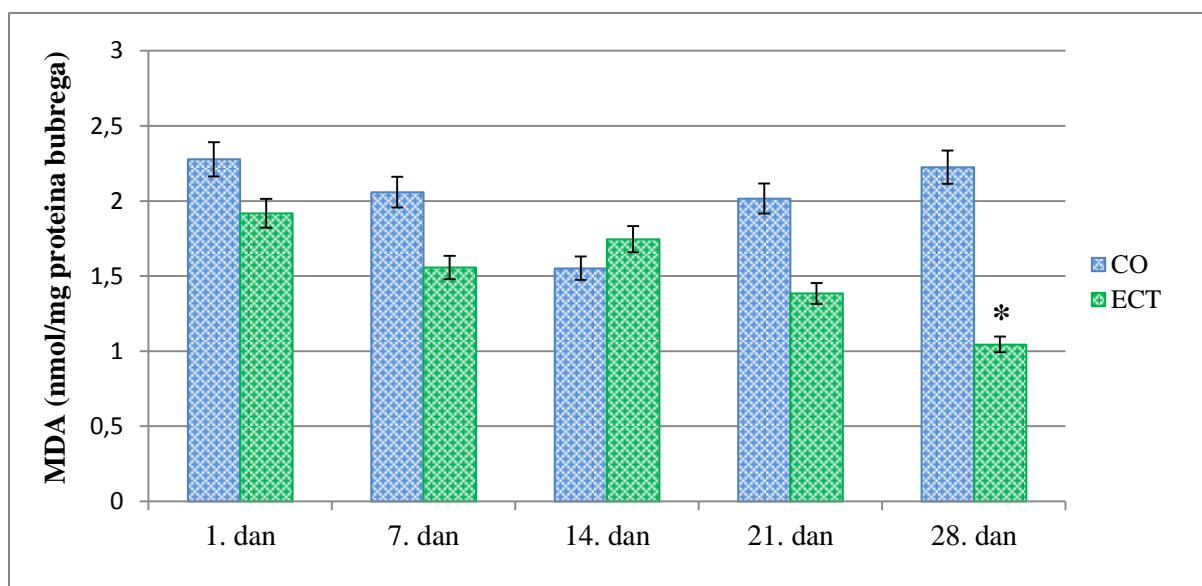
Slika 103. Koncentracija malondialdehida (MDA) u homogenatima tkiva mozga miševa obrađenih ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana. Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.



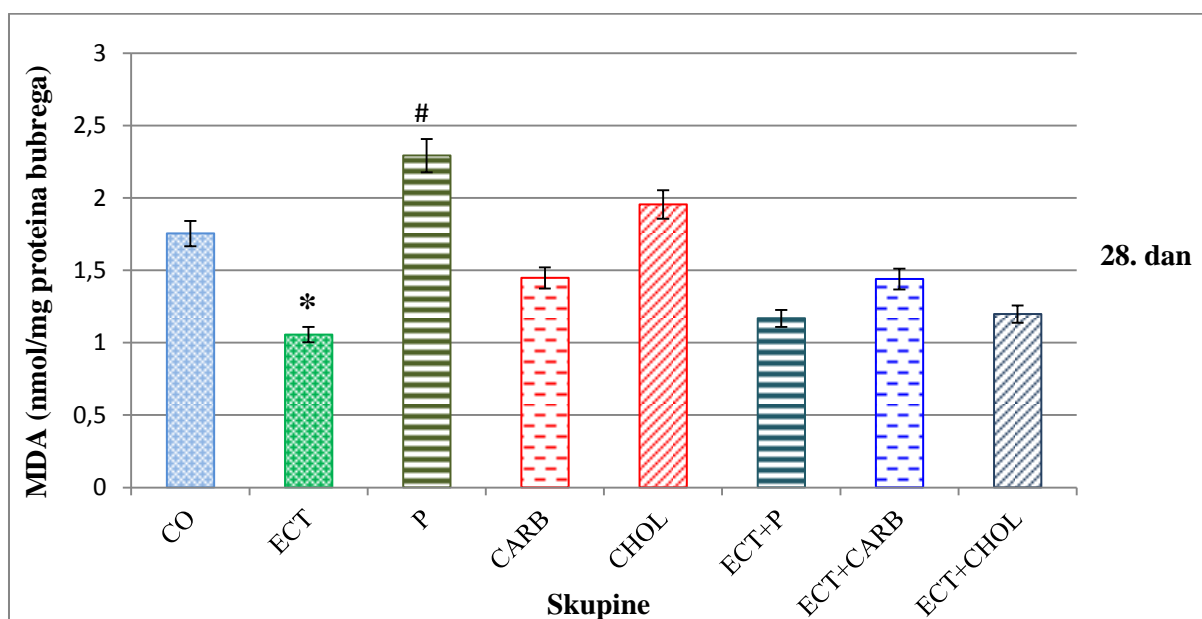


Slika 104. Koncentracija malondialdehida (MDA) u homogenatima tkiva mozga kod kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). ▲statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). # statistički značajno različito u odnosu na kombinaciju s ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

U bubregu (Slika 105) obrađenih životinja zapaženo je statistički značajno smanjenje MDA kod ECT skupine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ) 28. dana obrade. Također kod skupine obrađene proteini sirutkema (P) utvrđena je povećana koncentracija MDA u odnosu na skupinu ECT+P ( $P<0,05$ ). Usporedbom koncentracije MDA u bubregu 28. dana obrade kod skupina ECT+P, ECT+CHOL i ECT+CARB u odnosu na skupinu ECT (Slika 106) nisu dobivene statistički značajne razlike ( $P>0,05$ ).



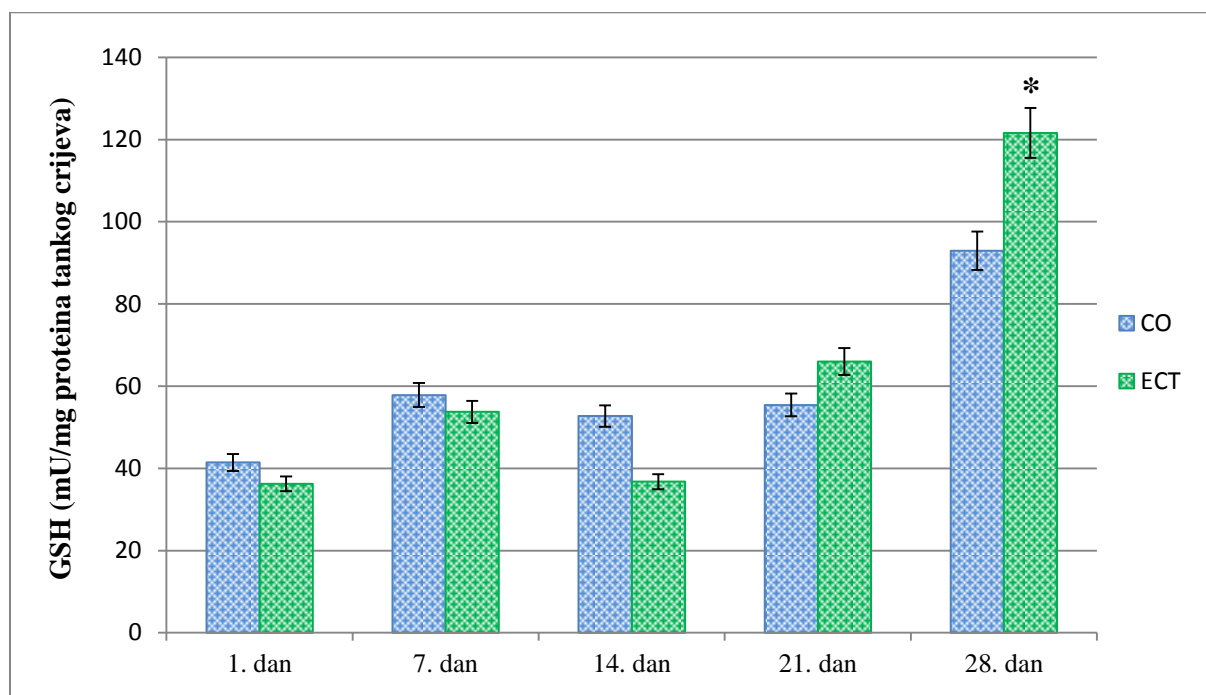
Slika 105. Koncentracija malondialdehida (MDA) u homogenatima tkiva bubrega miševa obrađenih ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana. Miševi su obrađeni intragastrično s vodenim ekstraktom cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg/dan tijekom 28 dana. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.



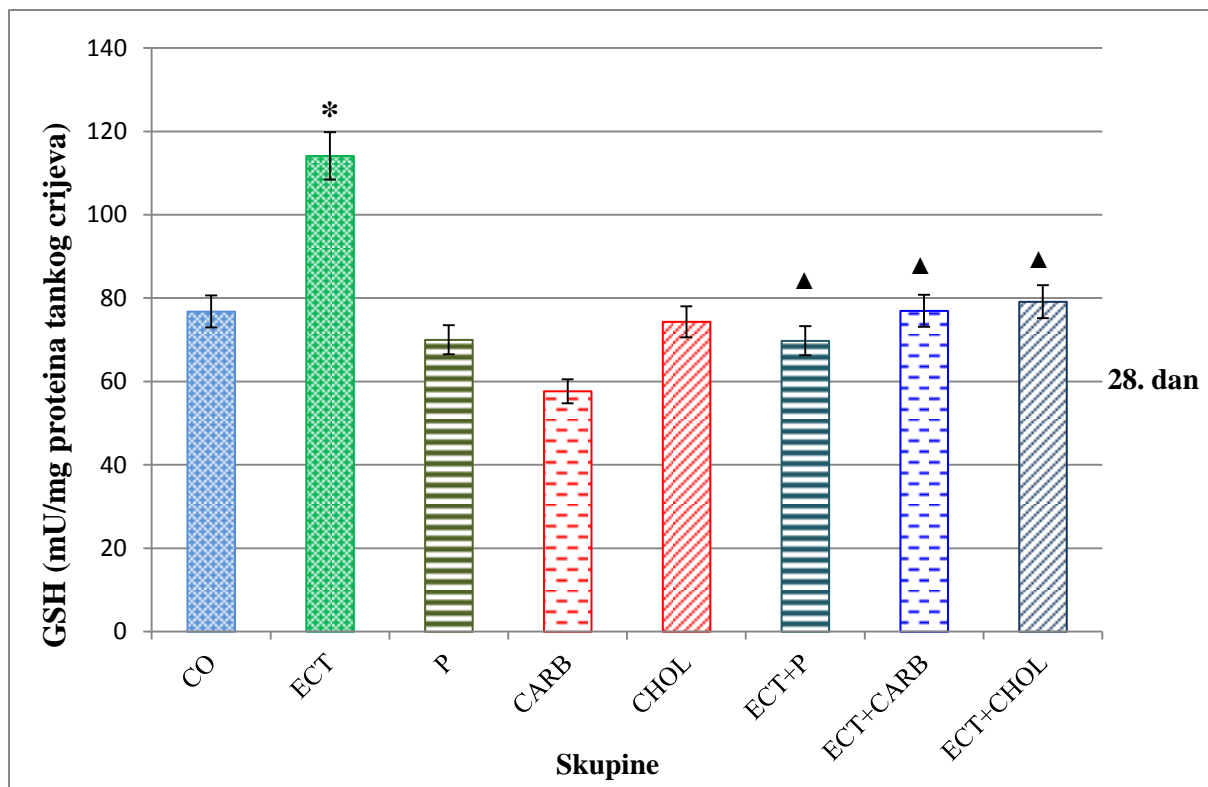
Slika 106. Koncentracija malondialdehida (MDA) u homogenatima tkiva bubrega kod kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). # statistički značajno različito u odnosu na skupinu u kombinaciji s ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

#### 4.4.2. Vrijednosti ukupnog glutationa (GSH) tankog crijeva, jetre, mozga i bubrega

Statistički značajno viša koncentracija GSH zapažena je analizom podataka dobivenih iz uzoraka tankog crijeva (Slika 107) kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu 28. dana obrade ( $P<0,05$ ). U odnosu na skupinu ECT, statistički značajno smanjena koncentracija GSH u uzorcima tankog crijeva (Slika 108), uočena je u skupinama ECT+P, ECT+CHOL i ECT+CARB 28. dana obrade ( $P<0,05$ ).

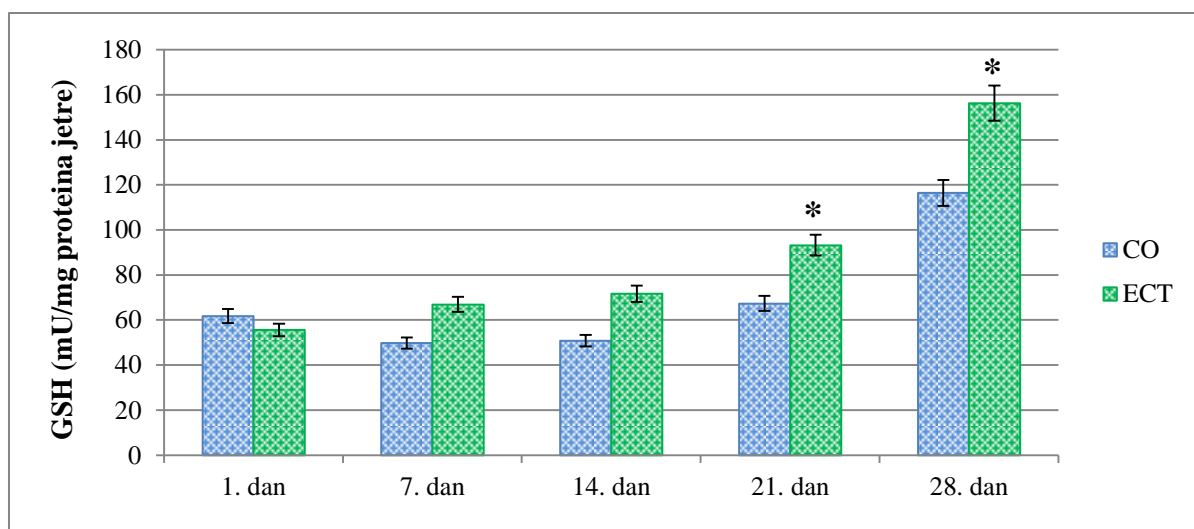


Slika 107. Koncentracija ukupnog glutationa (GSH) u homogenatima tkiva tankog crijeva kod kontrolne skupine i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

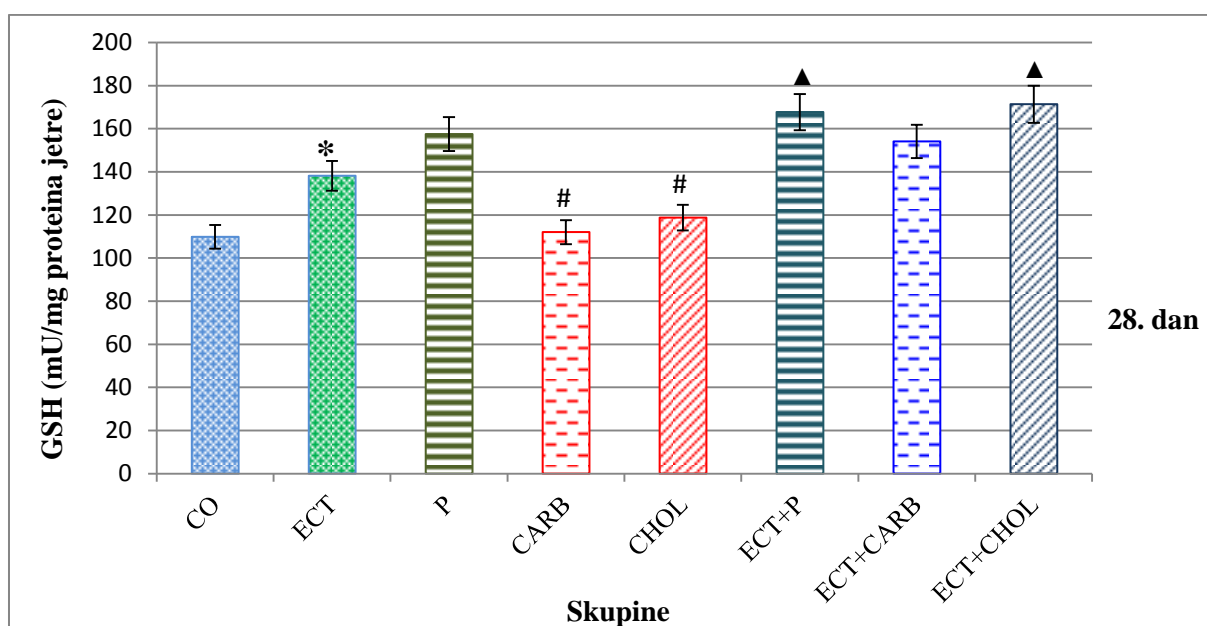


Slika 108. Koncentracija ukupnog glutationa (GSH) u homogenatima tkiva tankog crijeva kod kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). ▲statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

Analizom koncentracije glutationa (GSH) u jetri obrađenih životinja vidljiva je statistički značajno povećana vrijednost GSH kod ECT skupine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu 21. i 28. dana obrade ( $P<0,05$ ) (Slika 109). U odnosu na skupinu ECT, statistički značajno povećana koncentracija GSH u jetri, uočena je u skupinama ECT+P i ECT+CHOL ( $P<0,05$ ) 28. dana obrade (Slika 110). Usporedbom koncentracija GSH kod skupina CHOL i CARB dobivene su statistički značajno manje koncentracije GSH u odnosu na skupine ECT+CHOL i ECT+CARB ( $P<0,05$ ).

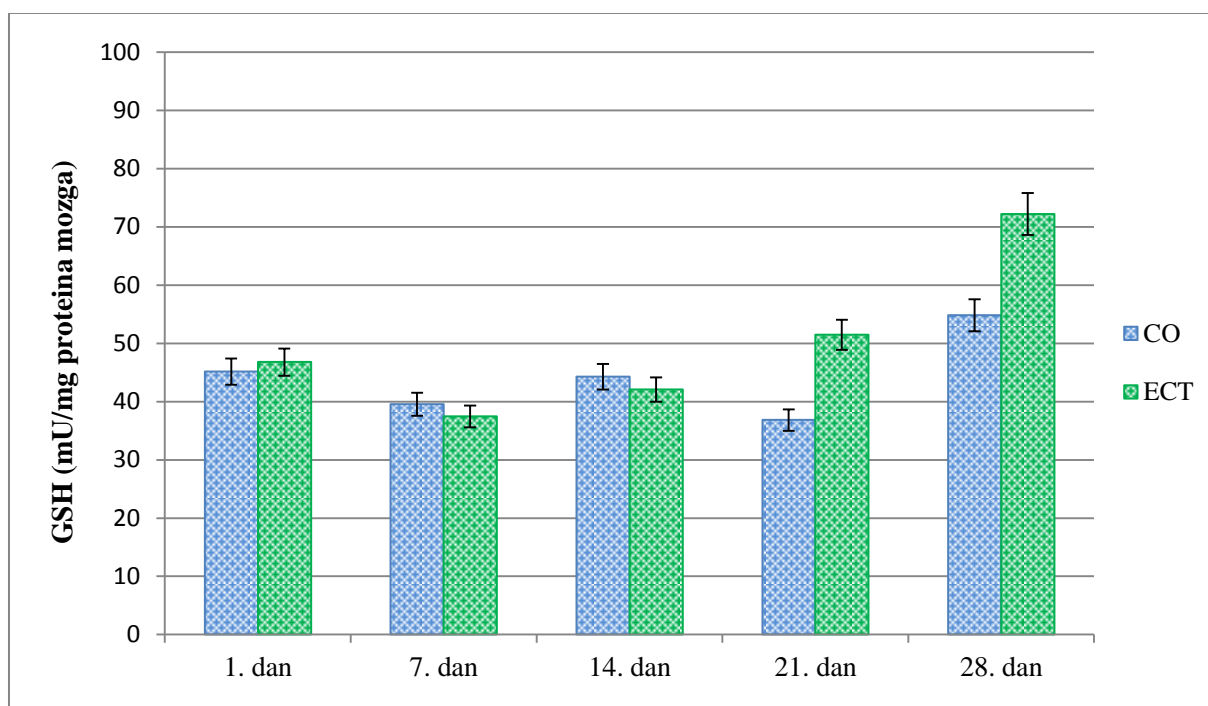


Slika 109. Koncentracija ukupnog glutationa (GSH) u homogenatima tkiva jetre kod kontrolne skupine i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

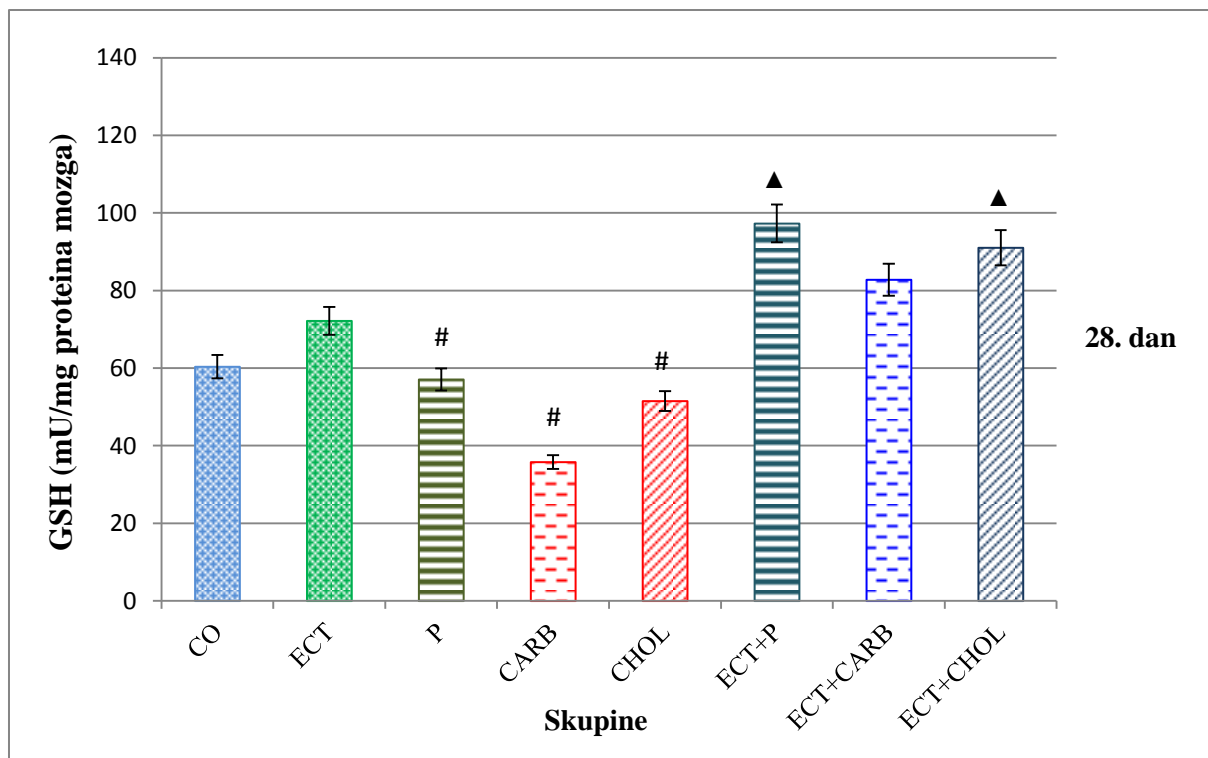


Slika 110. Koncentracija ukupnog glutationa (GSH) u homogenatima tkiva jetre kod kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). #statistički značajno različito u odnosu na kombinaciju s ECT ( $P<0,05$ ). ^statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

Analizom koncentracije GSH u mozgu (Slika 111) nisu zapažene statistički značajne razlike između skupine obrađene ekstraktom cvijeta trine i zdrave kontrolne skupine ( $P>0,05$ ). U odnosu na skupinu ECT, statistički značajno povećana koncentracija GSH u mozgu (Slika 112), uočena je u skupinama ECT+P i ECT+CHOL ( $P<0,05$ ). Usporedbom koncentracija GSH kod skupina CHOL, P i CARB dobivene su statistički značajno manje vrijednosti koncentracija GSH u odnosu na skupine ECT+CHOL, ECT+CARB i ECT+P ( $P<0,05$ ).

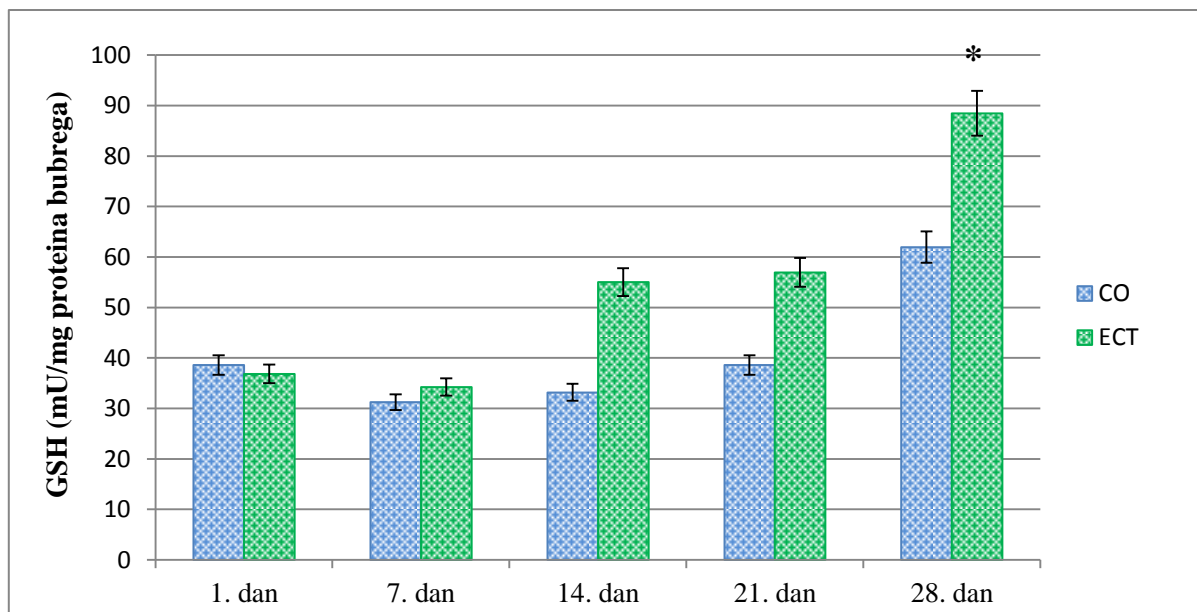


Slika 111. Koncentracija ukupnog glutationa (GSH) u homogenatima tkiva mozga kod kontrolne skupine i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini ( $n=6$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

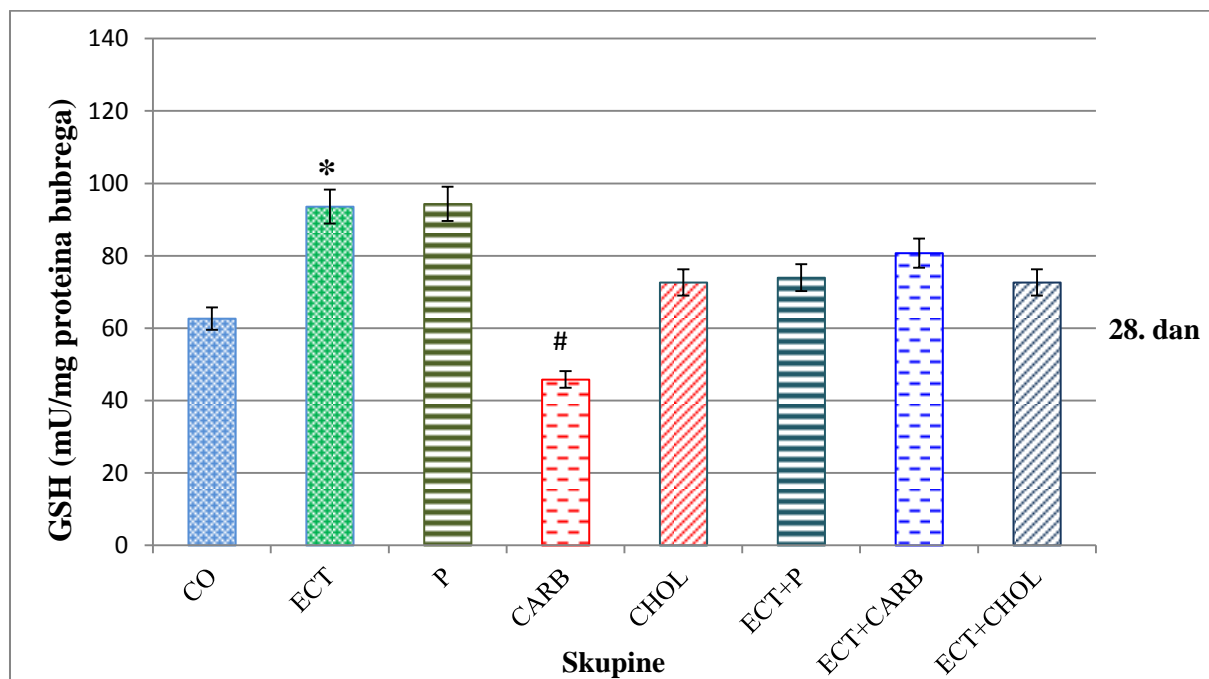


Slika 112. Koncentracija ukupnog glutationa (GSH) u homogenatima tkiva mozga kod kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). ▲statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). #statistički značajno različito u odnosu na kombinaciju s ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SP. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

Podatci dobiveni analizom bubrega pokazuju statistički značajno višu koncentraciju GSH kod ECT skupine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ) 28. dana obrade (Slika 113). Također kod skupine CARB u odnosu na skupinu ECT+CARB zapažena je statistički niža vrijednost GSH ( $P<0,05$ ). Usporedbom koncentracije GSH u bubregu (Slika) kod skupina ECT+P, ECT+CHOL i ECT+CARB u odnosu na skupinu ECT (Slika 114) nisu dobivene statistički značajne razlike 28. dana obrade ( $P>0,05$ ).



Slika 113. Koncentracija ukupnog glutationa (GSH) u homogenatima tkiva bubrega kod kontrolne skupine i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

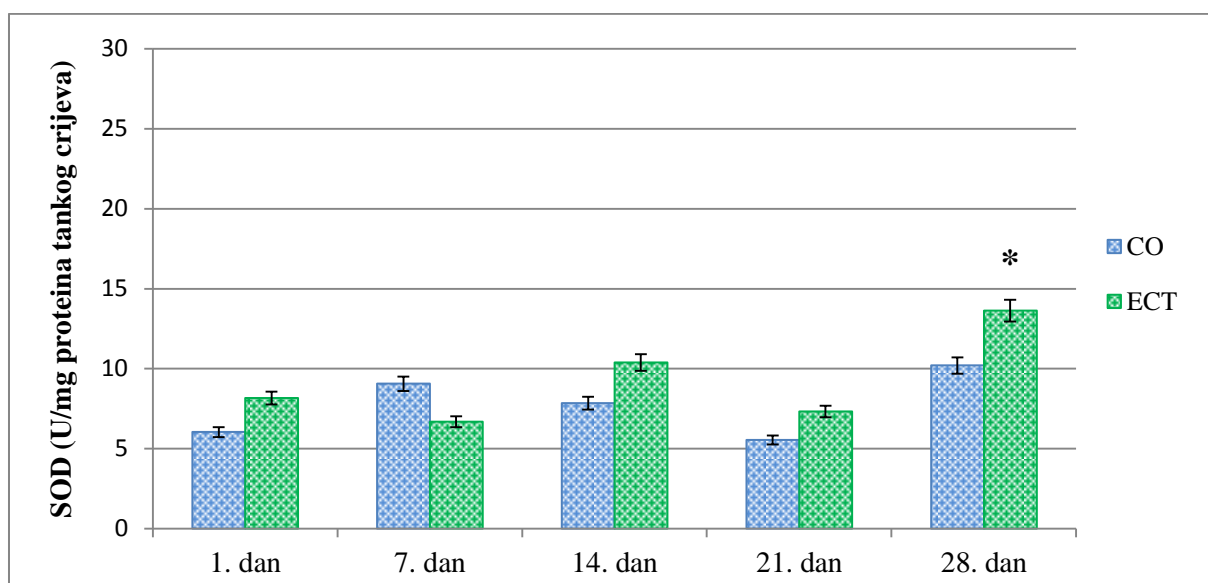


Slika 114. Koncentracija ukupnog glutationa (GSH) u homogenatima tkiva bubrega kod kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). #statistički značajno različito u odnosu na kombinaciju s ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

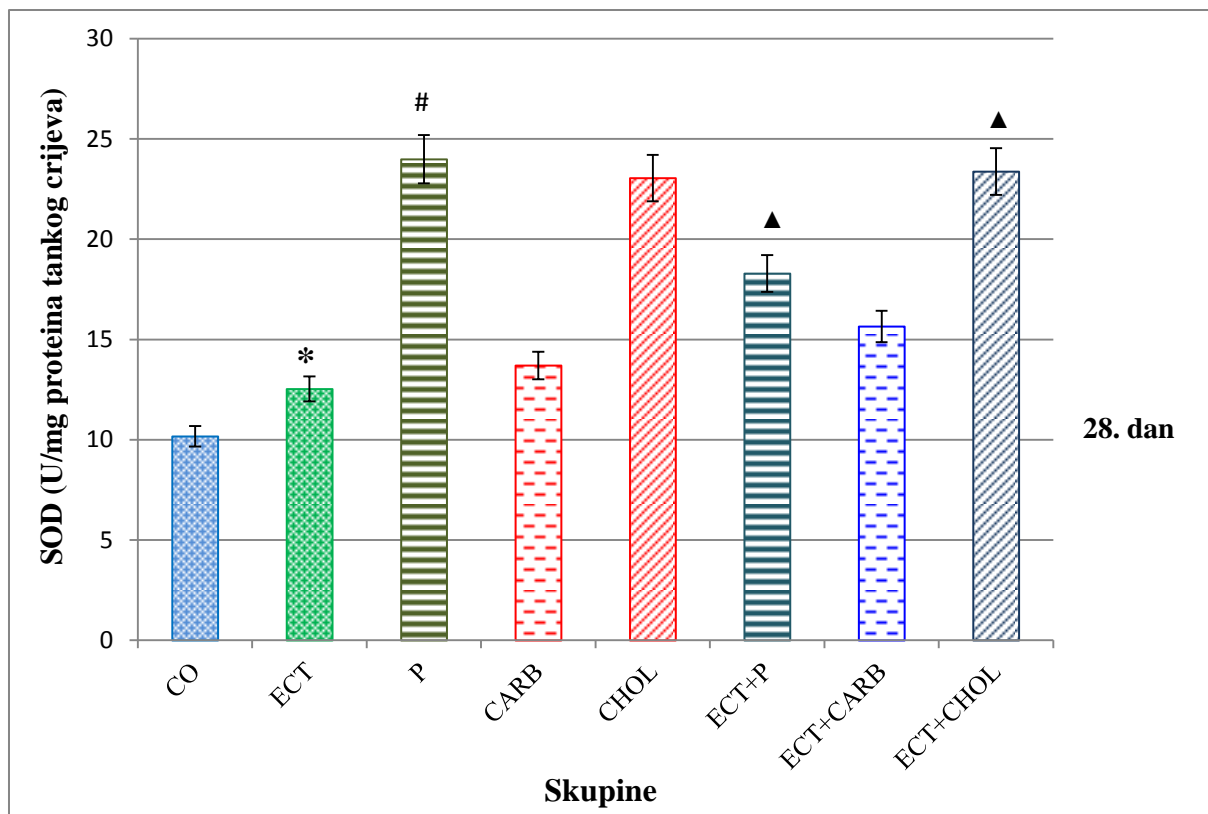


#### 4.4.3. Vrijednosti enzimске aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) jetre, bubrega, mozga i tankog crijeva

Analizom podataka uzoraka tankog crijeva (Slika 115) utvrđen je statistički značajan porast enzimске aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) kod skupine koja je primala ekstrakt cvijeta trnine (ECT) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (CO) 28. dana obrade ( $P<0,05$ ). Također je utvrđen statistički značajan porast enzimске aktivnosti superoksid dismutaze kod skupina ECT+P i ECT+CHOL (Slika 116) u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Statistički značajan porast enzimске aktivnost utvrđena je u skupini P u odnosu na skupinu ECT+P ( $P<0,05$ ).

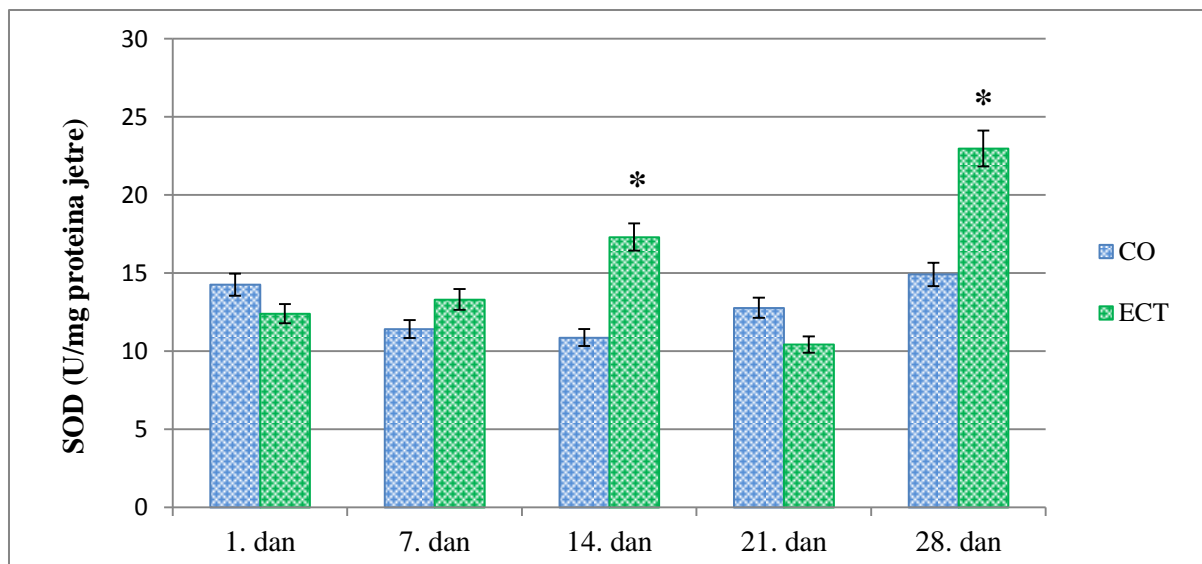


Slika 115. Enzimska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u homogenatima tkiva tankog crijeva kod kontrolne skupine i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

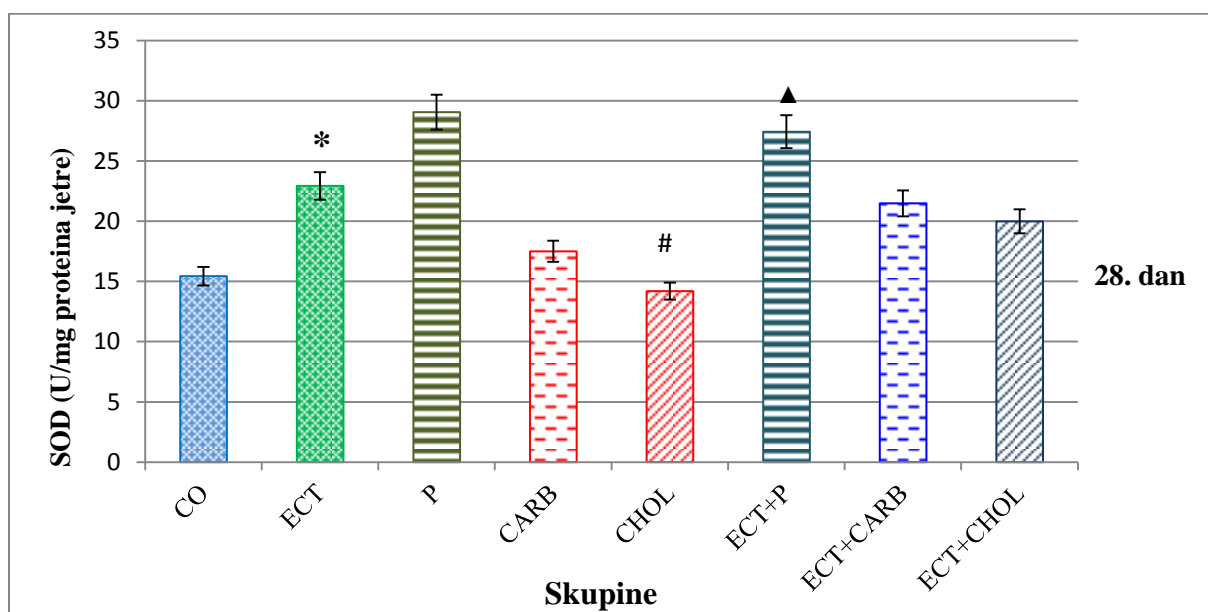


Slika 116. Enzimska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u homogenatima tkiva tankog crijeva kod kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). ▲statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

Analizom podataka uzoraka jetre (Slika 117) utvrđen je statistički značajan porast enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) kod skupine koja je primala ekstrakt cvijeta trnine (ECT) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (CO) 14. i 28. dana obrade ( $P<0,05$ ). Također je vidljiv statistički značajan porast enzimske aktivnosti kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s proteini sirutkema (ECT+P) u odnosu na skupinu ECT 28. dana obrade ( $P<0,05$ ) (Slika 118). Statistički značajno niža enzimska aktivnost superoksid dismutaze zapažena je kod skupine CHOL u odnosu na skupinu ECT+CHOL ( $P<0,05$ ).

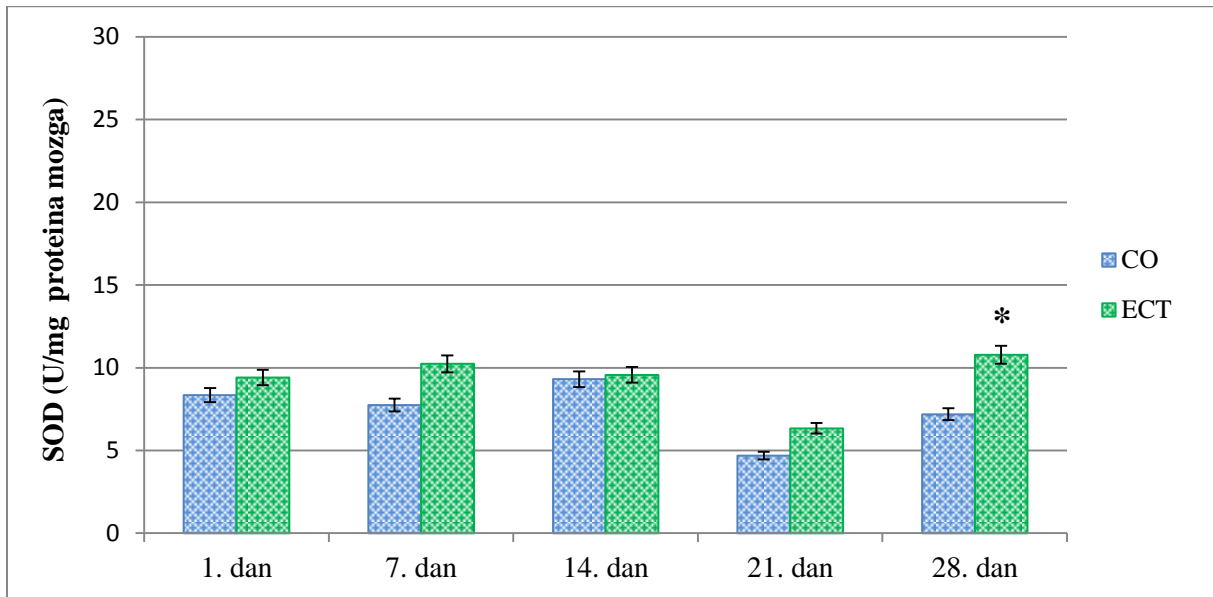


Slika 117. Enzimska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u homogenatima tkiva jetre kod kontrolne skupine i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

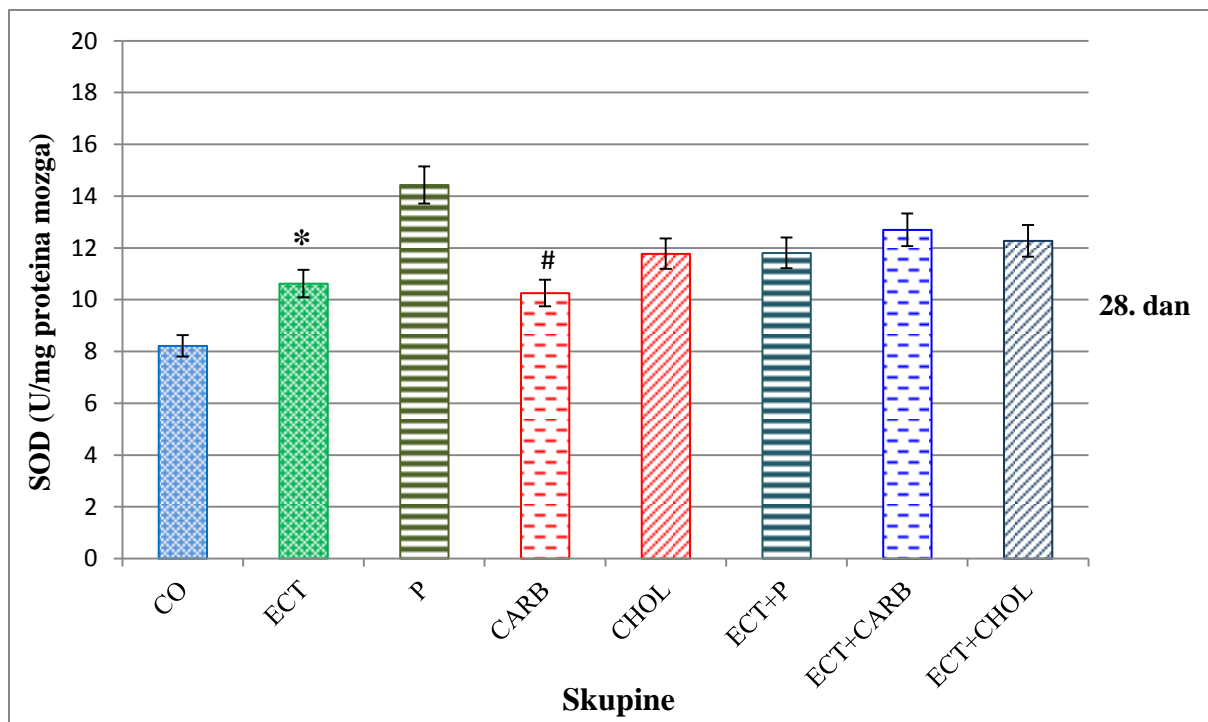


Slika 118. Enzimska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u homogenatima tkiva jetre kod kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \* statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). <sup>▲</sup> statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). # statistički značajno različito u odnosu na kombinaciju s ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

Analizom podataka enzimске aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) uzoraka mozga (Slika 119) utvrđen je statistički značajan porast enzimске aktivnosti kod skupine koja je primala ekstrakt cvijeta trnine (ECT) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (CO) 28. dana obrade ( $P<0,05$ ). Statistički značajno manja enzimска aktivnost enzima utvrđena je u skupini CARB u odnosu na skupinu ECT+CARB ( $P<0,05$ ). Kod skupina ECT+P, ECT+CHOL i ECT+CARB (Slika 120) nema vidljive statistički značajne razlike u enzimskoj aktivnosti u odnosu na skupinu ECT 28. dana obrade ( $P>0,05$ ).

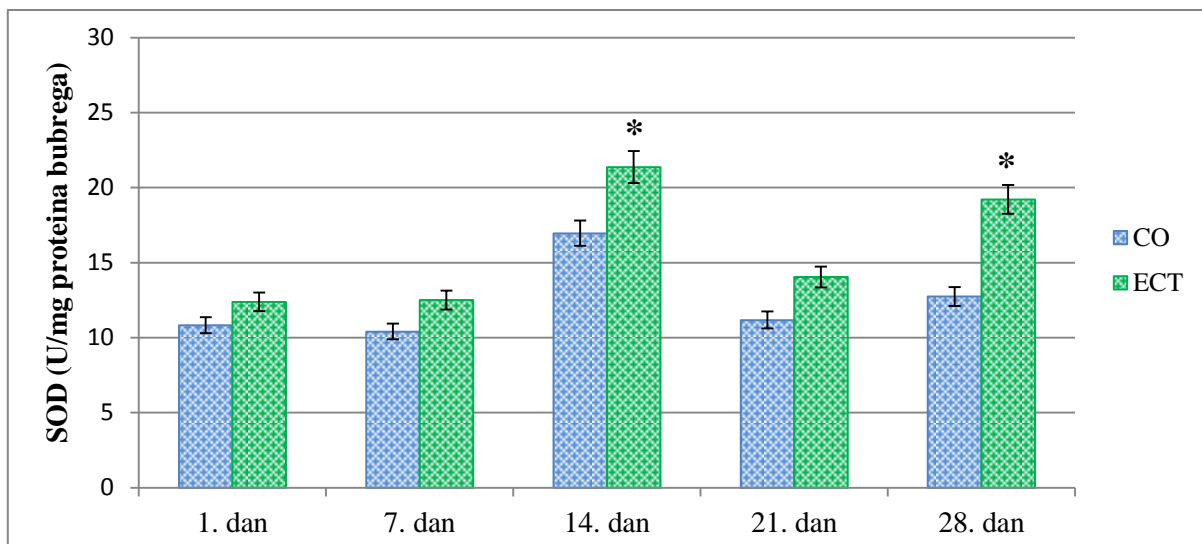


Slika 119. Enzimска aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u homogenatima tkiva mozga kod kontrolne skupine i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevnе obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SP. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

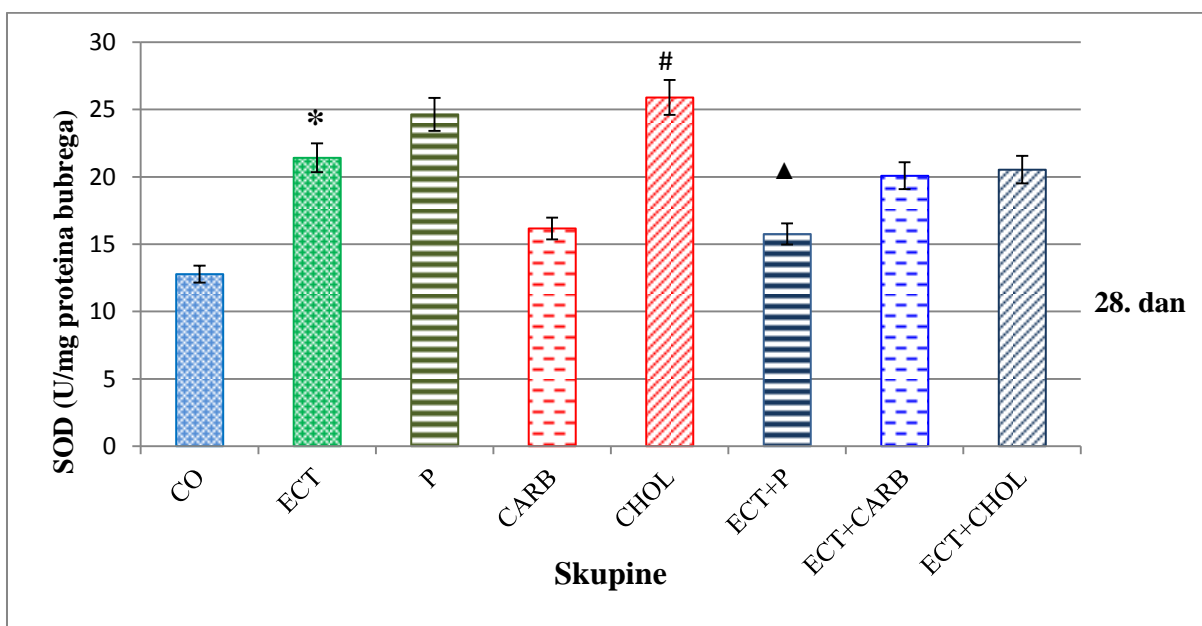


Slika 120. Enzimska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u homogenatima tkiva mozga kod kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL/6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). # statistički značajno različito u odnosu na kombinaciju s ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

Analizom podataka enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) uzoraka bubrega (Slika 121) utvrđen je statistički značajan porast enzimske aktivnosti kod skupine koja je primala ekstrakt cvijeta trnine (ECT) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (CO) 14. i 28. dana obrade ( $P<0,05$ ). Statistički značajan porast enzimske aktivnosti zapažen je i kod skupine CHOL u odnosu na skupinu ECT+CHOL ( $P<0,05$ ). Kod skupina ECT+P, ECT+CHOL i ECT+CARB (Slika 122) nema vidljive statistički značajne razlike u enzimskoj aktivnosti u odnosu na skupinu ECT 28. dana obrade ( $P>0,05$ ).



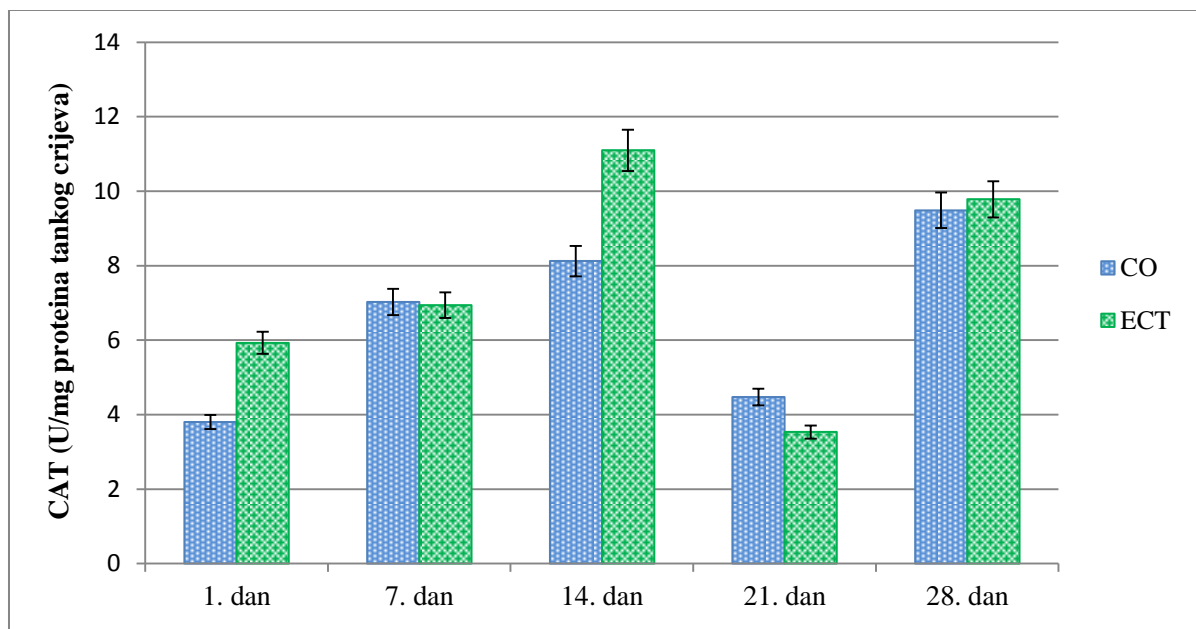
Slika 121. Enzimska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u homogenatima tkiva bubrega kod kontrolne skupine i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.



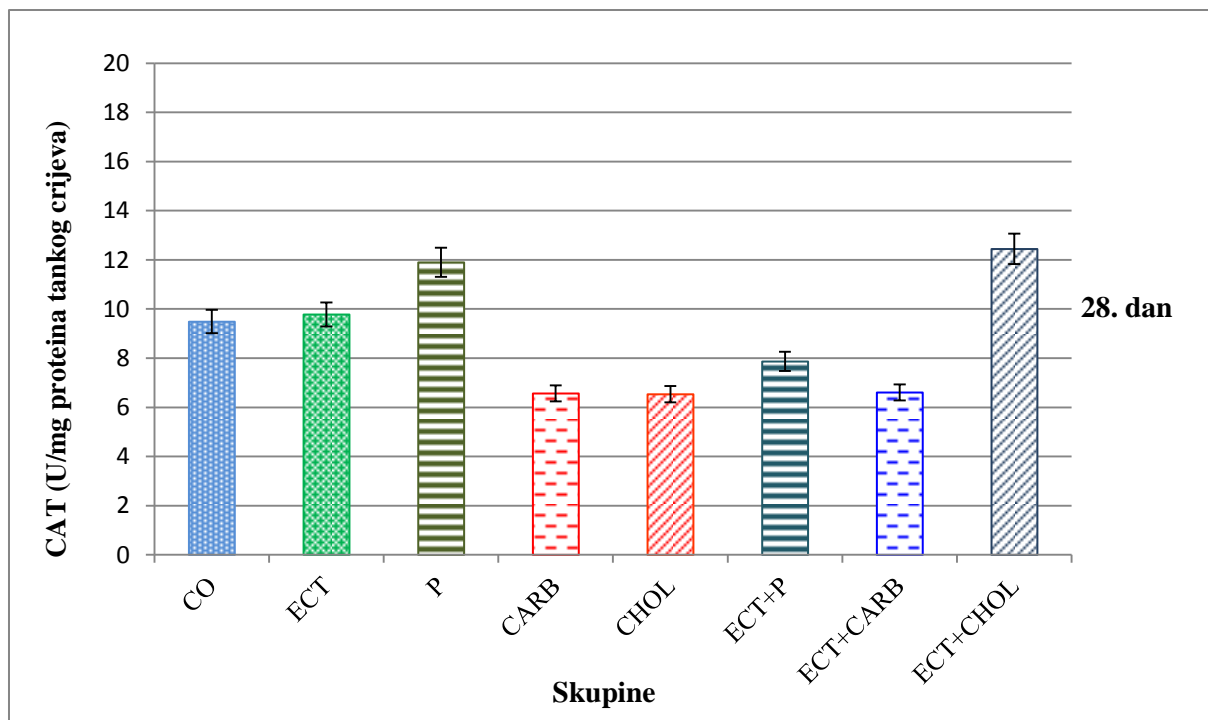
Slika 122. Enzimska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u homogenatima tkiva bubrega kod kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ). ▲ statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P < 0,05$ ). # statistički značajno različito u odnosu na kombinaciju s ECT ( $P < 0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

#### 4.4.4. Vrijednosti enzimske aktivnosti katalaze (CAT) jetre, bubrega, mozga i tankog crijeva

Analizom podataka enzimske aktivnosti katalaze uzoraka tankog crijeva nisu uočene statistički značajne razlike u enzimskoj aktivnosti među skupinama (Slika 123 i 124).



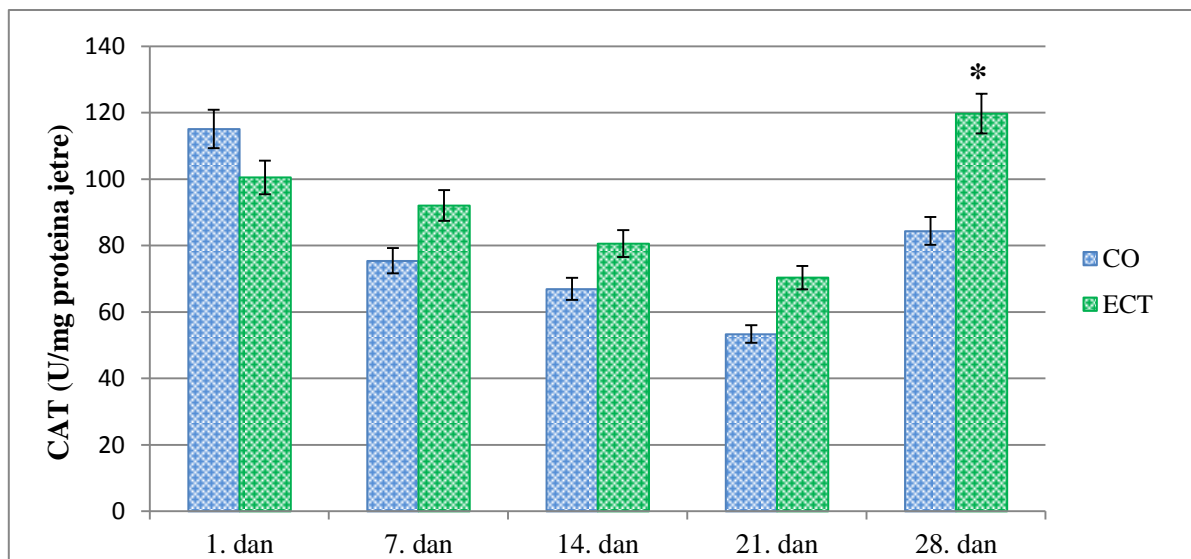
Slika 123. Enzimska aktivnost katalaze (CAT) u homogenatima tkiva tankog crijeva kod kontrolne skupine i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SP. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.



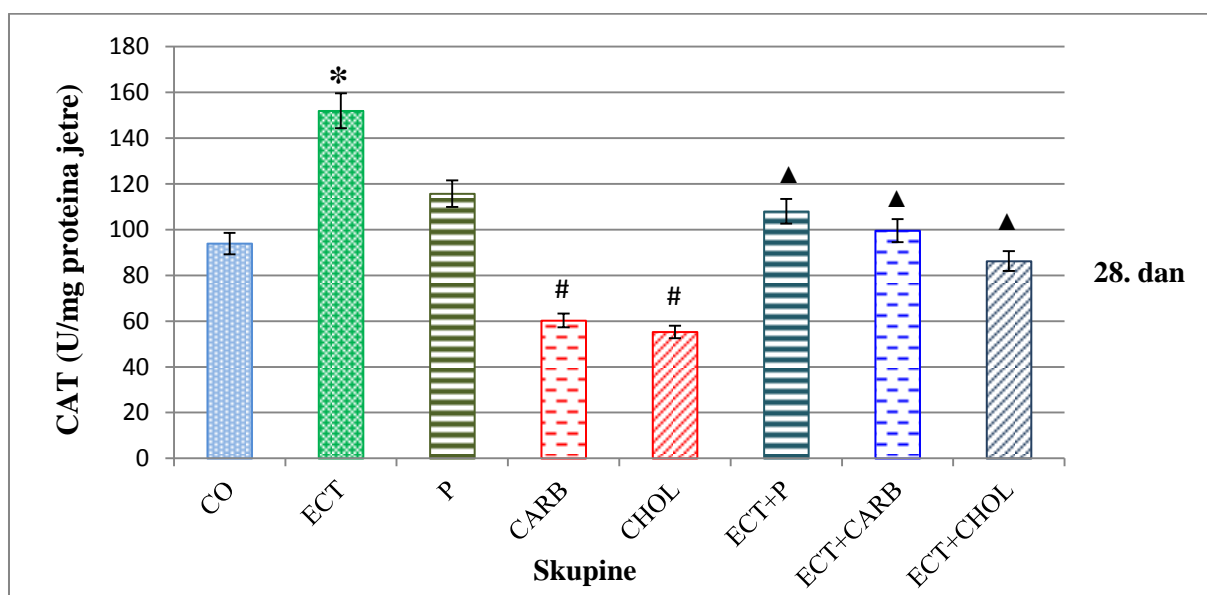
Slika 124. Enzimska aktivnost katalaze (CAT) u homogenatima tkiva tankog crijeva kod kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SP. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

Analizom podataka uzoraka jetre (Slika 125) utvrđen je statistički značajan porast enzimske aktivnosti katalaze (CAT) kod skupine koja je primala ekstrakt cvijeta trnine (ECT) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (CO) 28. dana obrade ( $P < 0,05$ ). Kod skupina CARB i CHOL zapažena je statistički značajno smanjena enzimska aktivnost katalaze u odnosu na skupine ECT+CARB i ECT+CHOL ( $P < 0,05$ ). Također je zapaženo statistički značajno smanjenje enzimske aktivnosti katalaze (Slika 126) kod skupina ECT+P, ECT+CHOL i ECT+CARB u odnosu na ECT skupinu 28. dana obrade ( $P < 0,05$ ).



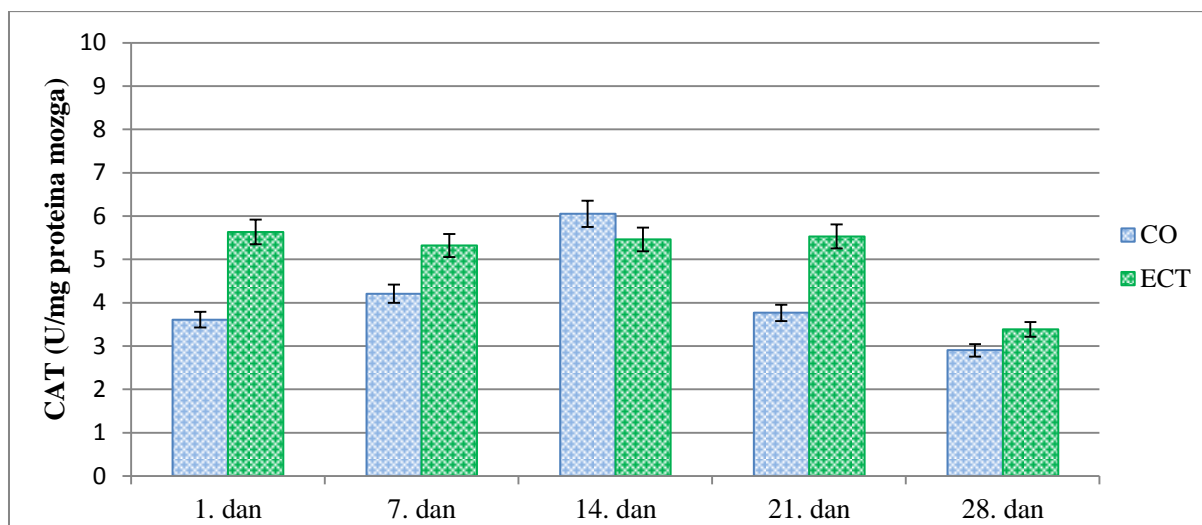


Slika 125. Enzimska aktivnost katalaze (CAT) u homogenatima tkiva jetre kod kontrolne skupine i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

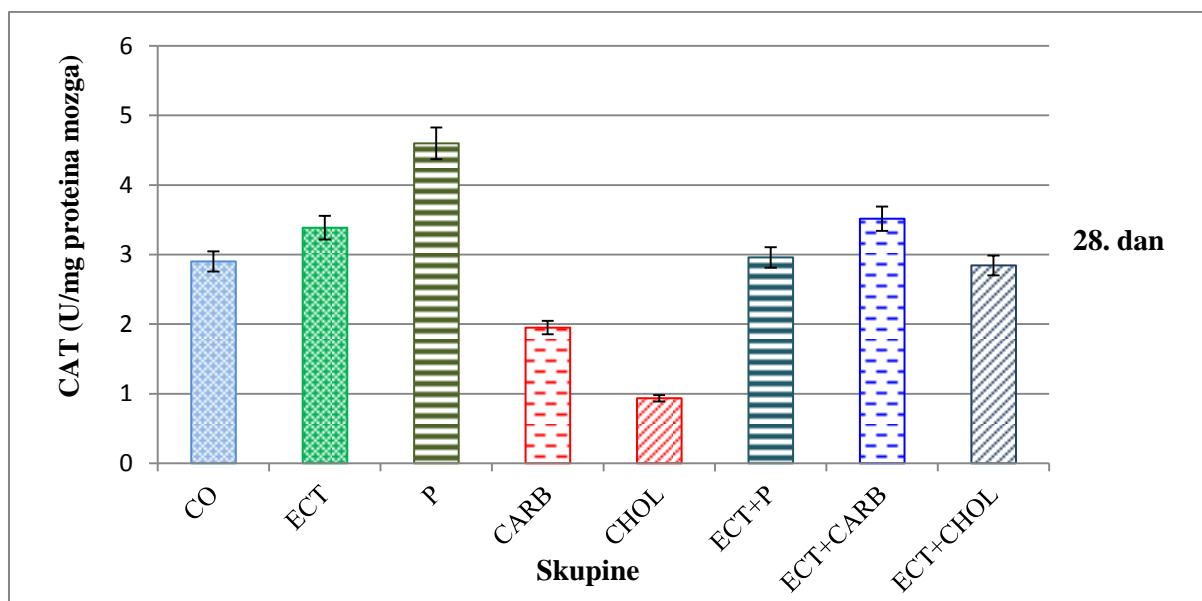


Slika 126. Enzimska aktivnost katalaze (CAT) u homogenatima tkiva jetre kod kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \* statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). ▲ statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). # statistički značajno različito u odnosu na kombinaciju s ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

Analizom podataka enzimске aktivnosti katalaze uzoraka mozga nisu uočene statistički značajne razlike u enzimskoj aktivnosti među skupinama (Slika 127 i 128).

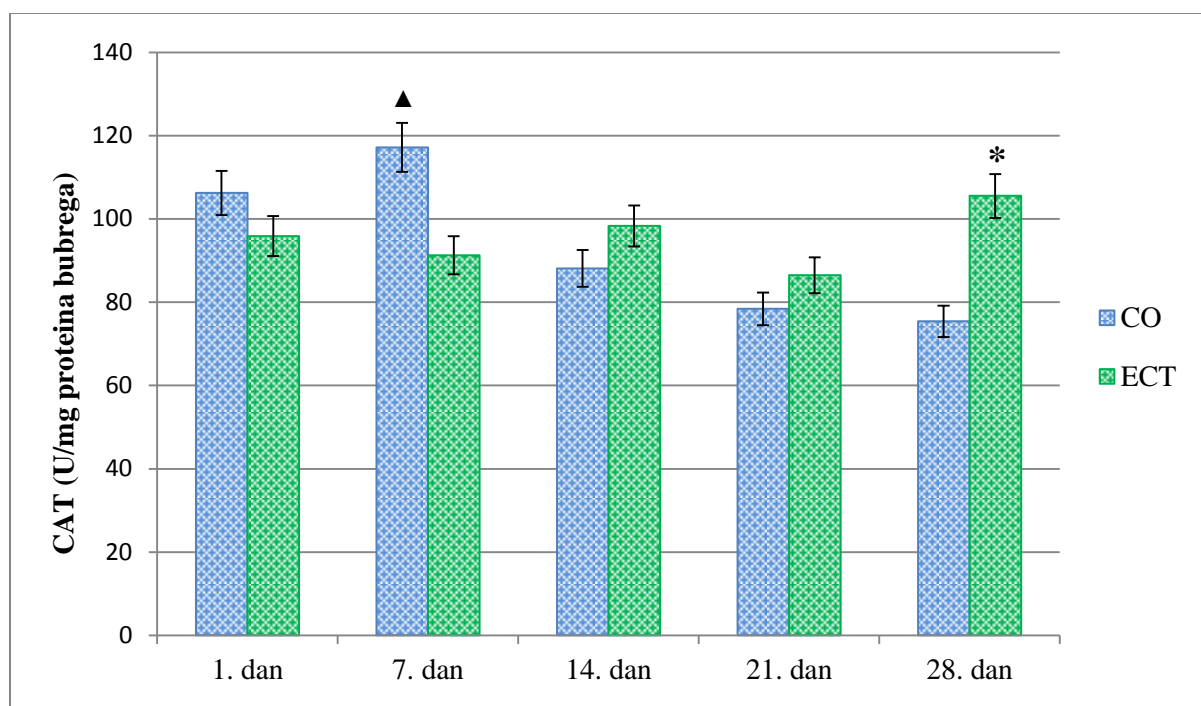


Slika 127. Enzimska aktivnost katalaze (CAT) u homogenatima tkiva mozga kod kontrolne skupine i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SP. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

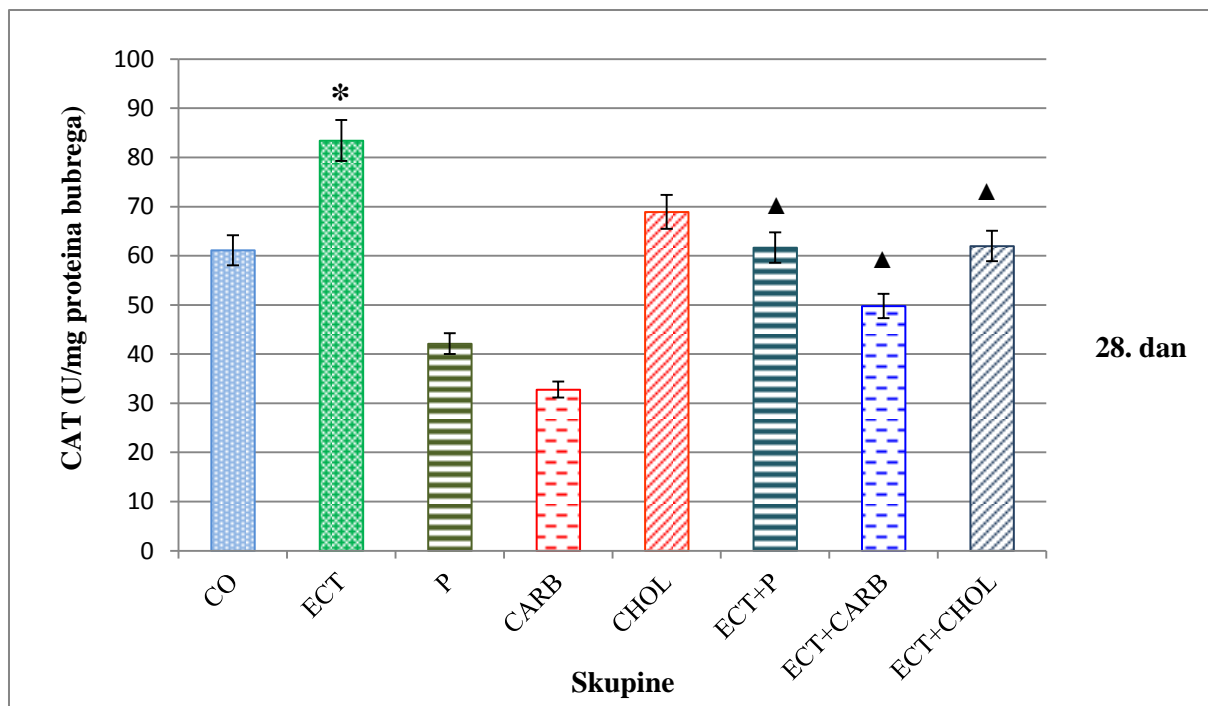


Slika 128. Enzimska aktivnost katalaze (CAT) u homogenatima tkiva mozga kod kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SP. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

Analizom podataka uzoraka bubrega (Slika 129) utvrđen je statistički značajan porast enzimske aktivnosti katalaze (CAT) kod kontrolne skupine (CO) u odnosu na skupinu koja je primala ekstrakt cvijeta trnine (ECT) 7. dana obrade, te statistički značajan porast kod skupine ECT u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu 28. dana obrade ( $P<0,05$ ). Također je zapaženo statistički značajno smanjenje enzimske aktivnosti katalaze (Slika 130) kod skupina ECT+P, ECT+CHOL i ECT+CARB u odnosu na skupinu ECT 28. dana obrade ( $P<0,05$ ).



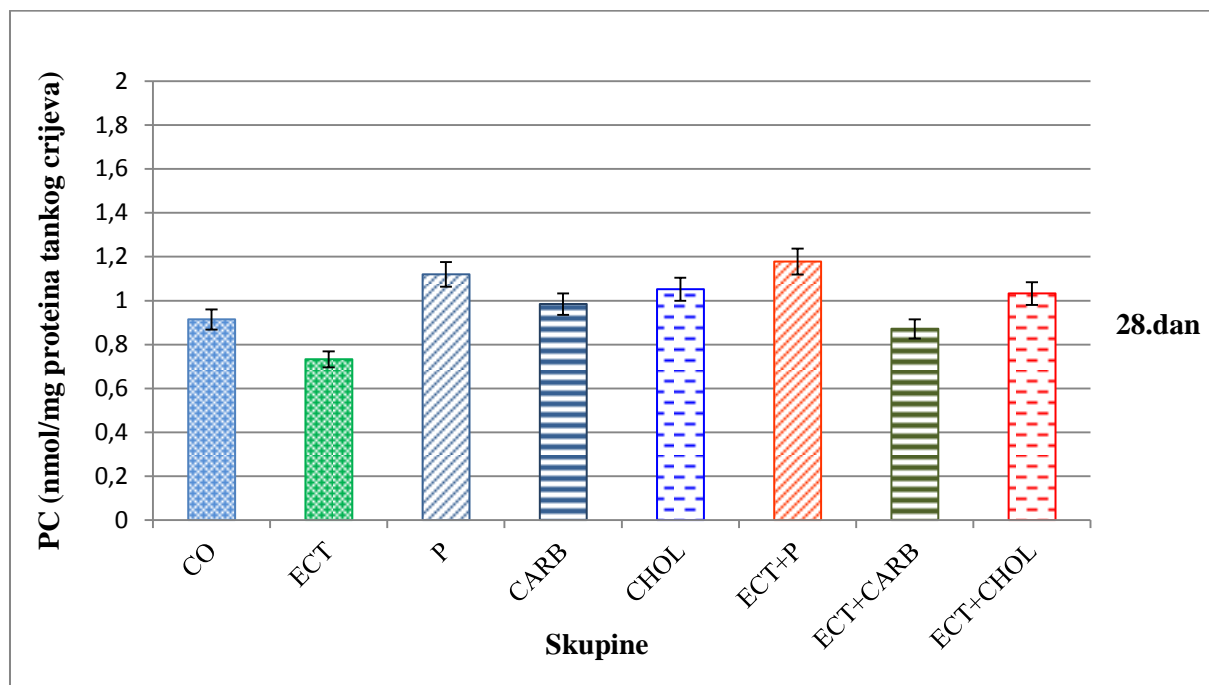
Slika 129. Enzimska aktivnost katalaze (CAT) u homogenatima tkiva bubrega kod kontrolne skupine i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). ▲statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SP. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.



Slika 130. Enzimska aktivnost katalaze (CAT) u homogenatima tkiva bubrega kod kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). ▲ statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

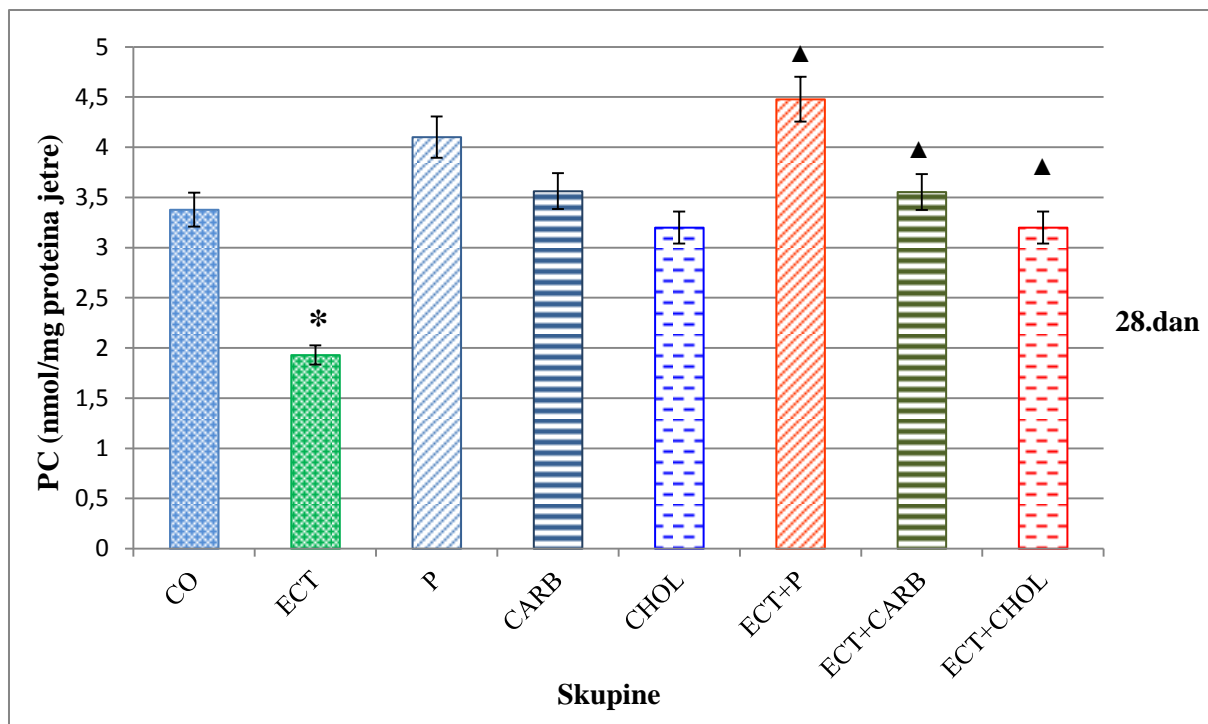
#### 4.4.5. Vrijednosti karboliniranih proteina (PC) tankog crijeva, jetre, mozga i bubrega

Prilikom usporedbe koncentracija karboliniranih proteina u tankom crijevu (Slika 131) nisu dobivene statistički značajne razlike između istraživanih skupina ( $P < 0,05$ ).



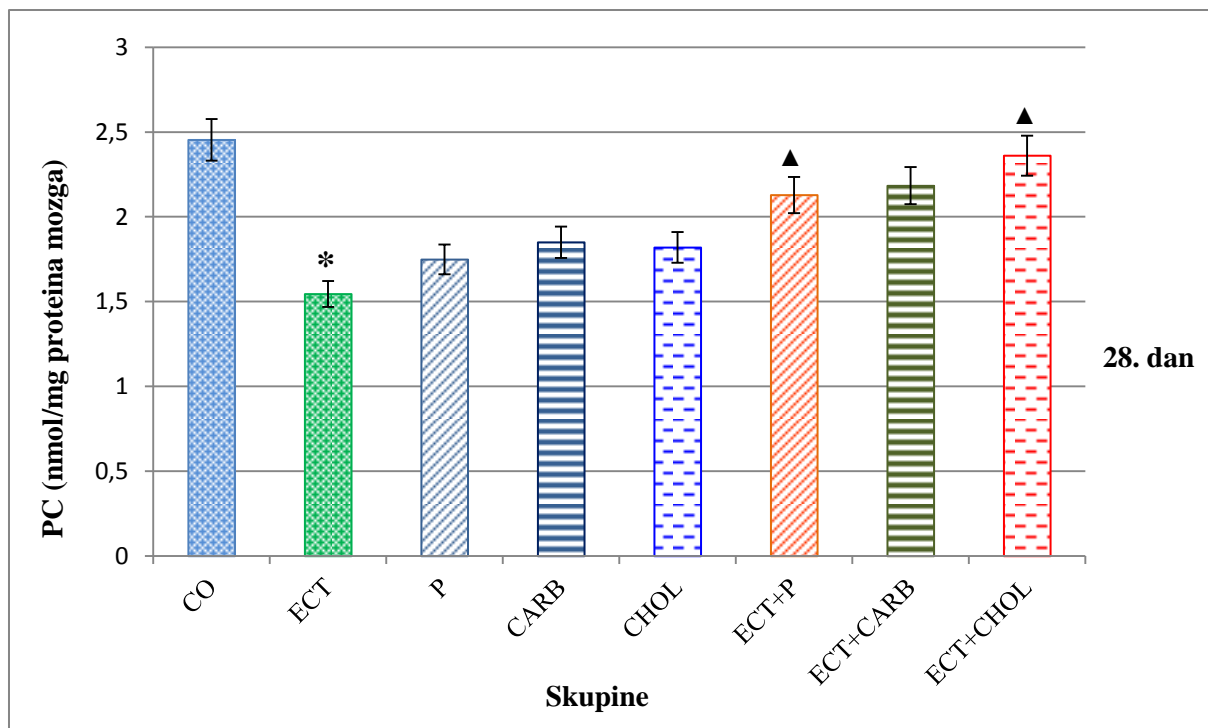
Slika 131. Koncentracija karboliniranih proteina (PC) u homogenatima tkiva tankog crijeva kod kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL/6 miša. Broj životinja po skupini ( $n=6$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

Analizirajući koncentraciju karboliniranih proteina (PC) u jetri (Slika 132) vidljivo je statistički značajno smanjenje karboliniranih proteina ( $P < 0,05$ ) u skupini koja je obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na zdravu kontrolu skupinu. U odnosu na ECT, statistički značajno povišena koncentracija karboliniranih proteina uočena je u skupinama ECT+P, ECT+CHOL i ECT+CARB ( $P < 0,05$ ). Također kod skupine CHOL uočena je statistički snižena koncentracija karboliniranih proteina u odnosu na skupinu ECT+CARB ( $P < 0,05$ ).



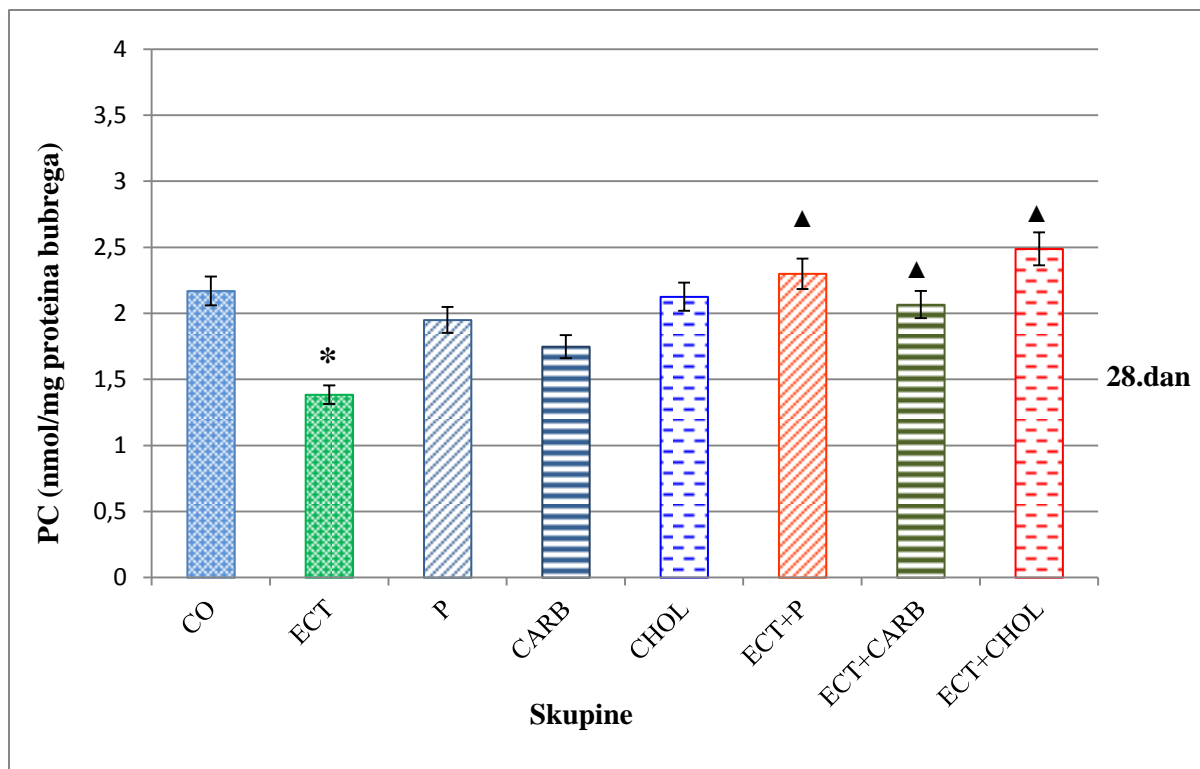
Slika 132. Koncentracija karboliniranih proteina (PC) u homogenatima tkiva jetre kod kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). ▲ statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). # statistički značajno različito u odnosu na kombinaciju s ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

Analizirajući koncentraciju karboniliranih proteina (PC) u mozgu (Slika 133) vidljivo je statistički značajno smanjenje karboniliranih proteina ( $P<0,05$ ) u skupini koja je obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na kontrolnu skupinu. U odnosu na ECT, statistički značajno povišena koncentracija karboniliranih proteina uočena je u skupinama ECT+CHOL i ECT+CARB ( $P<0,05$ ). Kod skupina CARB, P i CHOL nisu uočene statistički značajne vrijednosti karboniliranih proteina u odnosu na njihovu kombinaciju s ECT ( $P>0,05$ ).



Slika 133. Koncentracija karboliniranih proteina (PC) u homogenatima tkiva mozga kod kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). ▲ statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). # statistički značajno različito u odnosu na kombinaciju s ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SP. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

Uspoređujući koncentraciju karboniliranih proteina (PC) u bubregu (Slika 134) vidljivo je statistički značajno smanjenje karboniliranih proteina ( $P<0,05$ ) u skupini koja je obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na kontrolnu skupinu. U odnosu na ECT, statistički značajno povišena koncentracija karboniliranih proteina uočena je u skupinama ECT+P, ECT+CHOL i ECT+CARB ( $P<0,05$ ).



Slika 134. Koncentracija karboliniranih proteina (PC) u homogenatima tkiva bubrega kod kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \* statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). ▲ statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

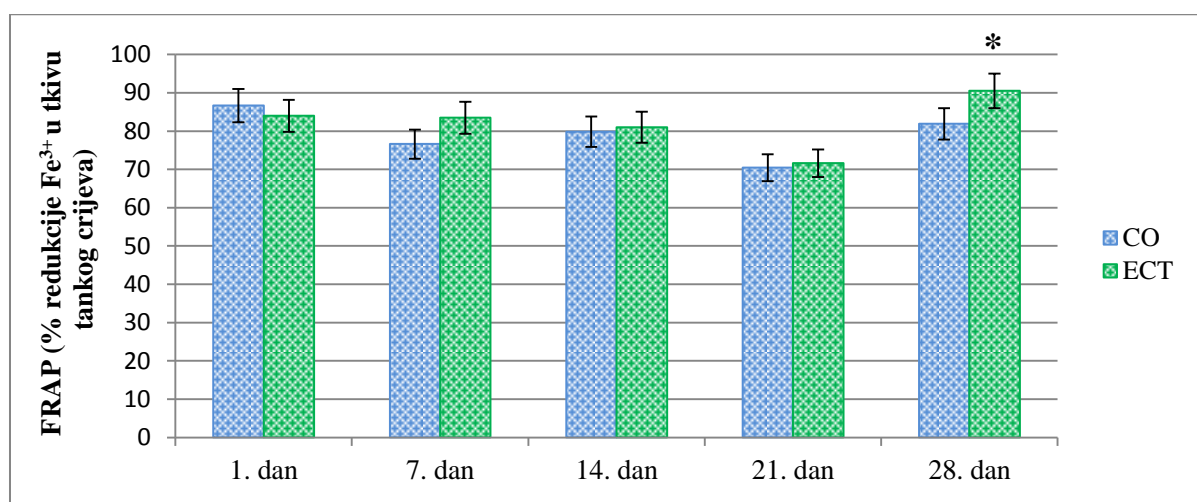


## 4.1. REZULTATI MJERENJA ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA

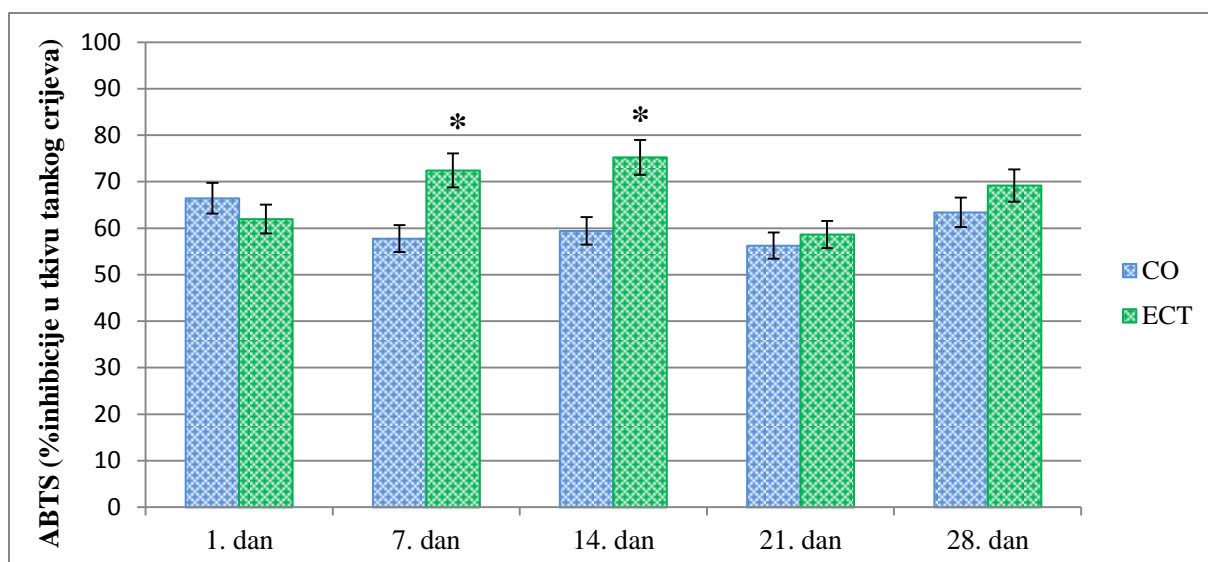
### 4.1.1. Vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta tkiva jetre, bubrega, mozga i tankog crijeva FRAP i ABTS metodom

Iz rezultata dobivenih mjerenjem antioksidacijskog kapaciteta homogenata tkiva tankog crijeva utvrđena je statistički značajno povećana vrijednost ( $P<0,05$ ) antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na kontrolnu skupinu (CO) 28. dana obrade (Slika 135). Statistički značajno povećana vrijednost ( $P<0,05$ ) utvrđena je i ABTS metodom kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na kontrolnu skupinu (CO) 7. i 14. dana obrade (Slika 136).

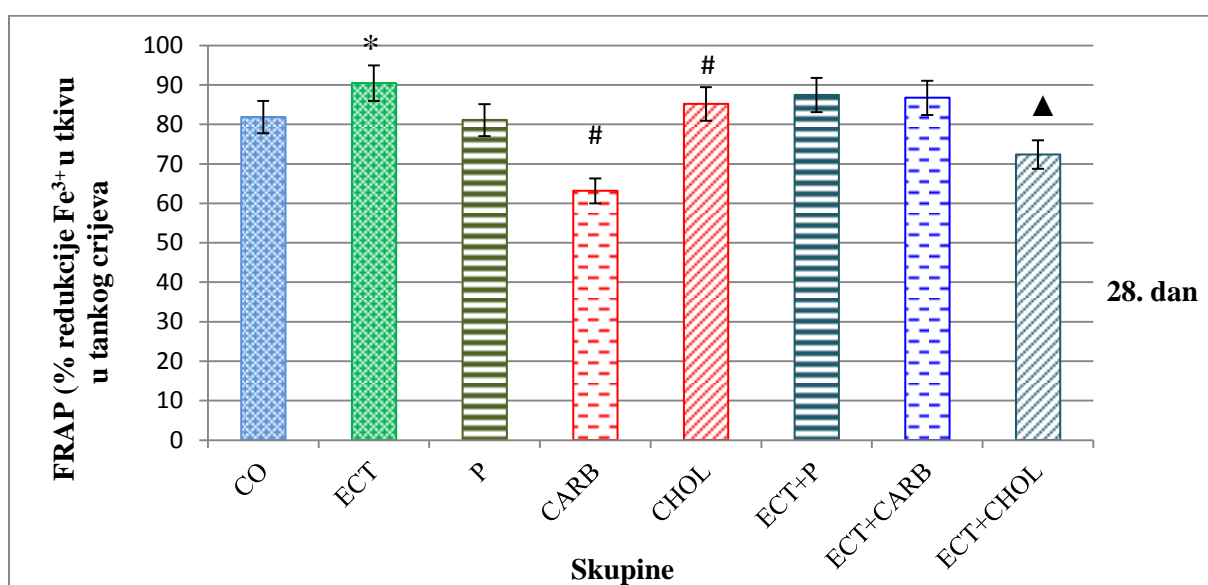
U odnosu na skupinu ECT, statistički značajno smanjena vrijednost antioksidacijskog kapaciteta u homogenatima tkiva tankog crijeva nakon 28. dana obrade uočena je u skupini ECT+CHOL metodom FRAP ( $P<0,05$ ). Prilikom usporedbe antioksidacijske aktivnosti skupina P, CHOL i CARB u odnosu na kombinaciju s ekstraktom cvijeta trnine, kod skupine ECT+CHOL uočena je statistički značajno povišena antioksidacijska aktivnost, dok je kod skupine CARB zabilježena statistički značajno manja vrijednost ( $P<0,05$ ) (Slika 137). Između istraživanih skupina ABTS metodom 28. dana obrade nisu uočene statistički značajne razlike (Slika 138).



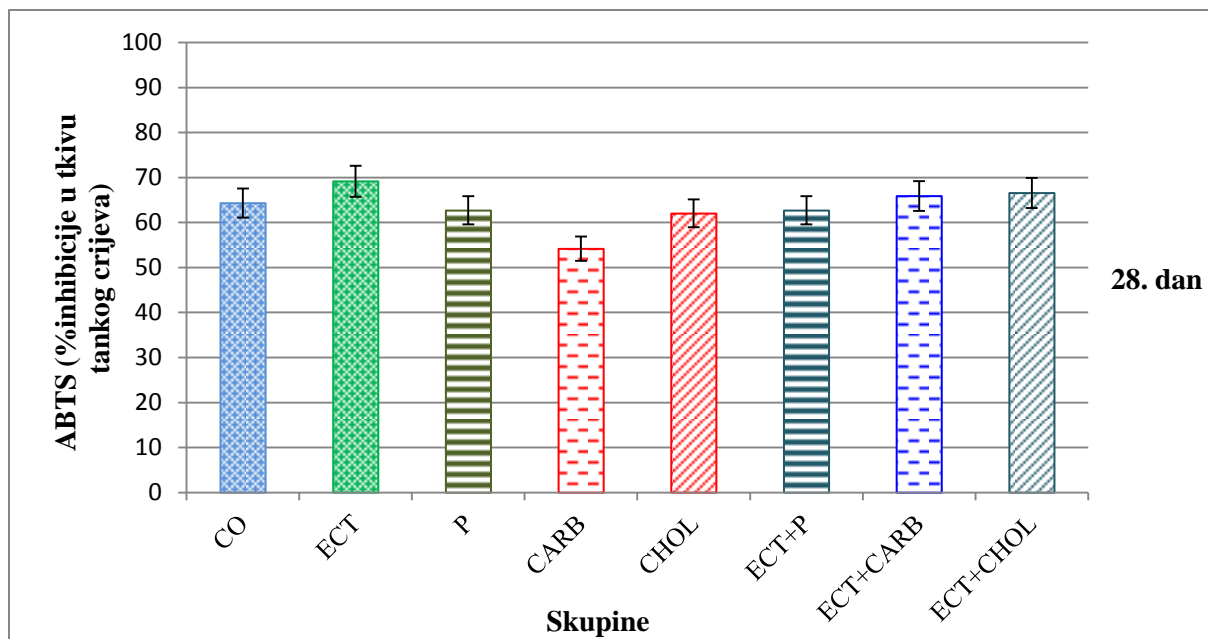
Slika 135. Antioksidacijski kapacitet homogenata tkiva tankog crijeva izmjeren metodom FRAP u kontrolne skupine i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \* statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SP. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.



Slika 136. Antioksidacijski kapacitet homogenata tkiva tankog crijeva izmjeren metodom ABTS u kontrolne skupine i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevnne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SP. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.



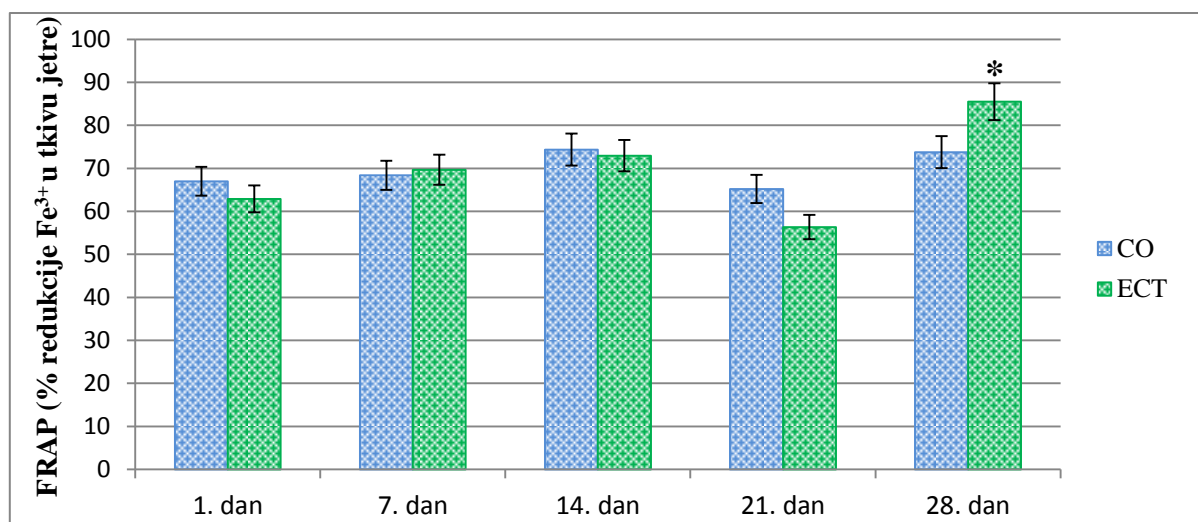
Slika 137. Antioksidacijski kapacitet homogenata tkiva tankog crijeva izmjeren metodom FRAP u kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevnne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \* statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). ▲ statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). # statistički značajno različito u odnosu na kombinaciju s ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SP. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.



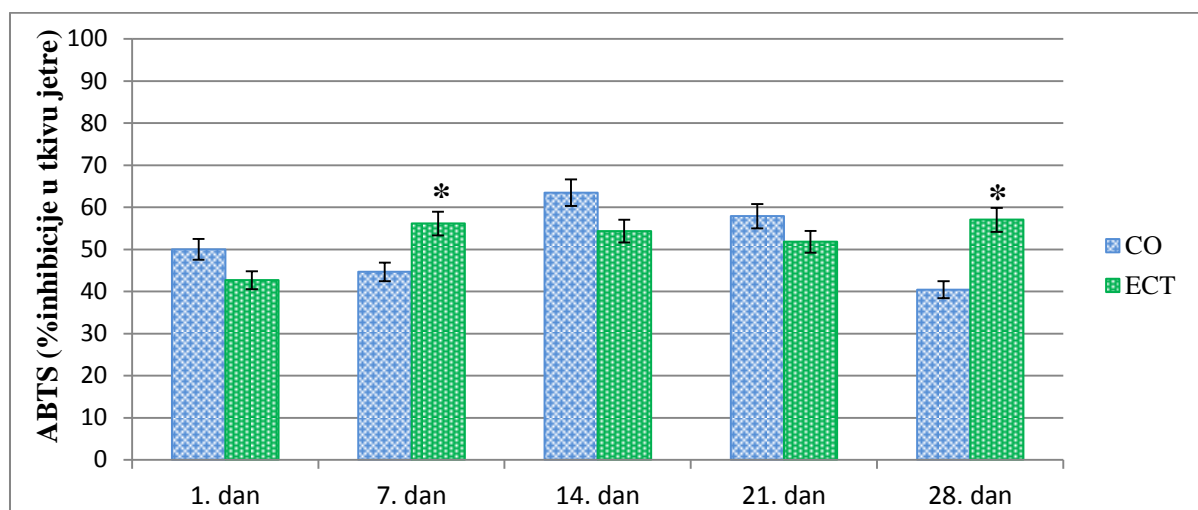
Slika 138. Antioksidacijski kapacitet homogenata tkiva tankog crijeva izmjeren metodom ABTS u kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SP. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

Iz rezultata dobivenih mjerenjem antioksidacijskog kapaciteta homogenata tkiva jetre utvrđena je statistički značajno povećana vrijednost ( $P < 0,05$ ) antioksidacijskog kapaciteta metodom FRAP 28. dana obrade kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na kontrolnu skupinu (CO) (Slika). Statistički značajno povećana vrijednost ( $P < 0,05$ ) utvrđena je i ABTS metodom kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na kontrolnu skupinu (CO) 14. i 28. dana obrade (Slika 139, 140).

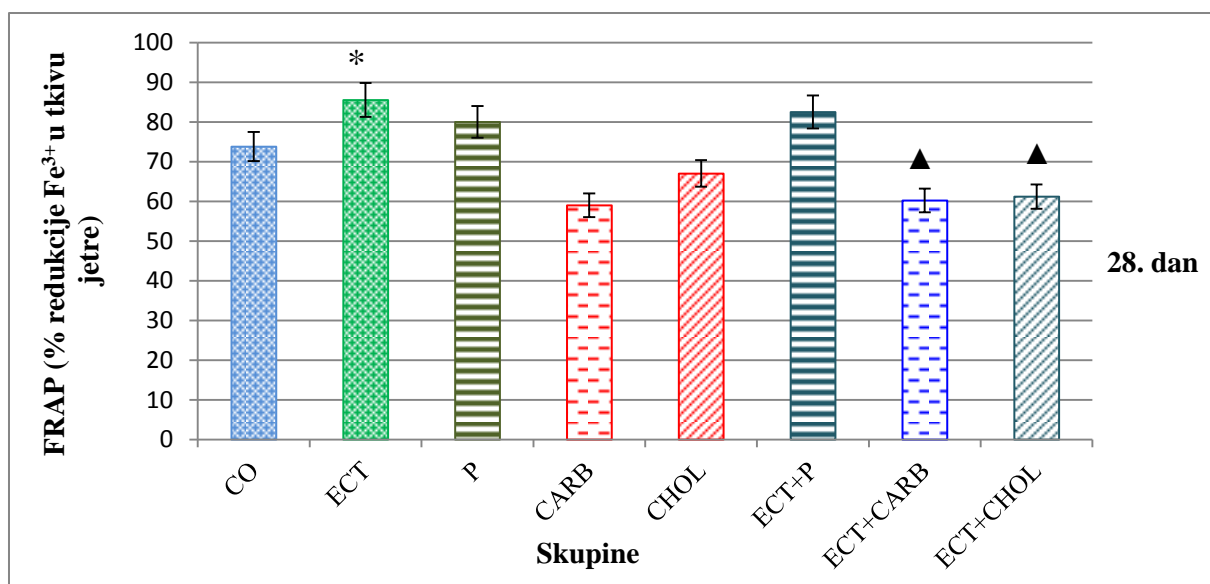
U odnosu na skupinu ECT, statistički značajno smanjena vrijednost antioksidacijskog kapaciteta u homogenatima tkiva jetre nakon 28. dana obrade uočena je u skupinama ECT+CHOL i ECT+CARB metodom FRAP ( $P < 0,05$ ). Također, u odnosu na skupinu ECT, statistički značajno manja vrijednost ( $P < 0,05$ ) antioksidacijskog kapaciteta u homogenatima tkiva jetre nakon 28. dana obrade utvrđena je i metodom ABTS u odnosu na skupine ECT+CHOL, ECT+CARB i ECT+P. Prilikom usporedbe antioksidacijske aktivnosti skupina P, CHOL i CARB u odnosu na kombinaciju s ekstraktom cvijeta trnine (ECT+CHOL, ECT+CARB, ECT+P) nisu dobivene statistički značajne razlike ( $P > 0,05$ ) (Slika 141, 142).



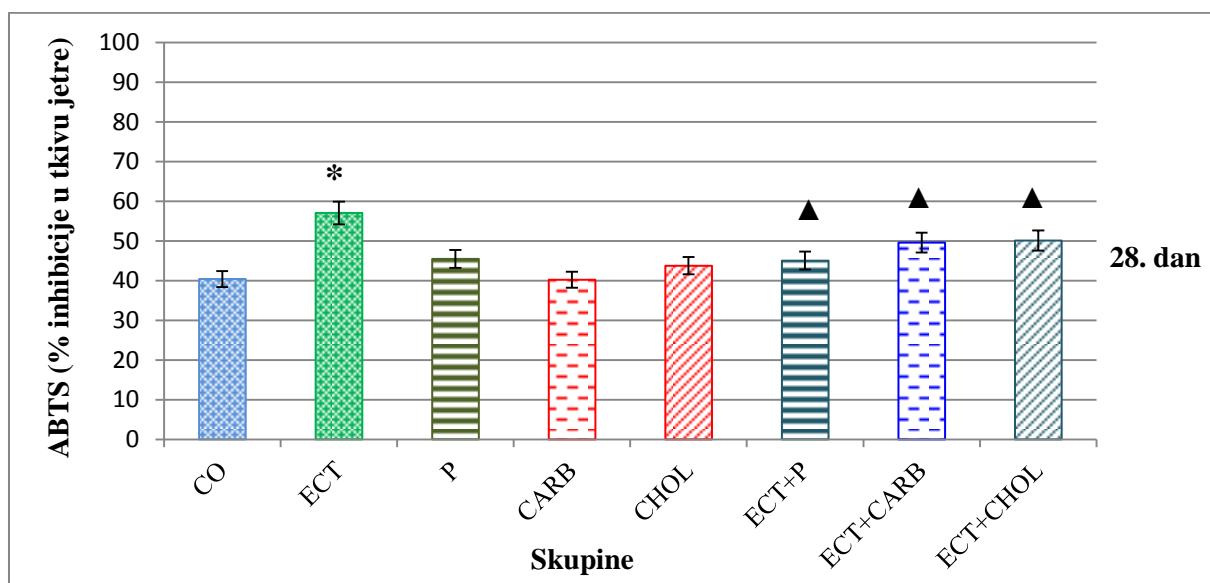
Slika 139. Antioksidacijski kapacitet homogenata tkiva jetre izmjeren metodom FRAP u kontrolne skupine i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.



Slika 140. Antioksidacijski kapacitet homogenata tkiva jetre izmjeren metodom ABTS u kontrolne skupine i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

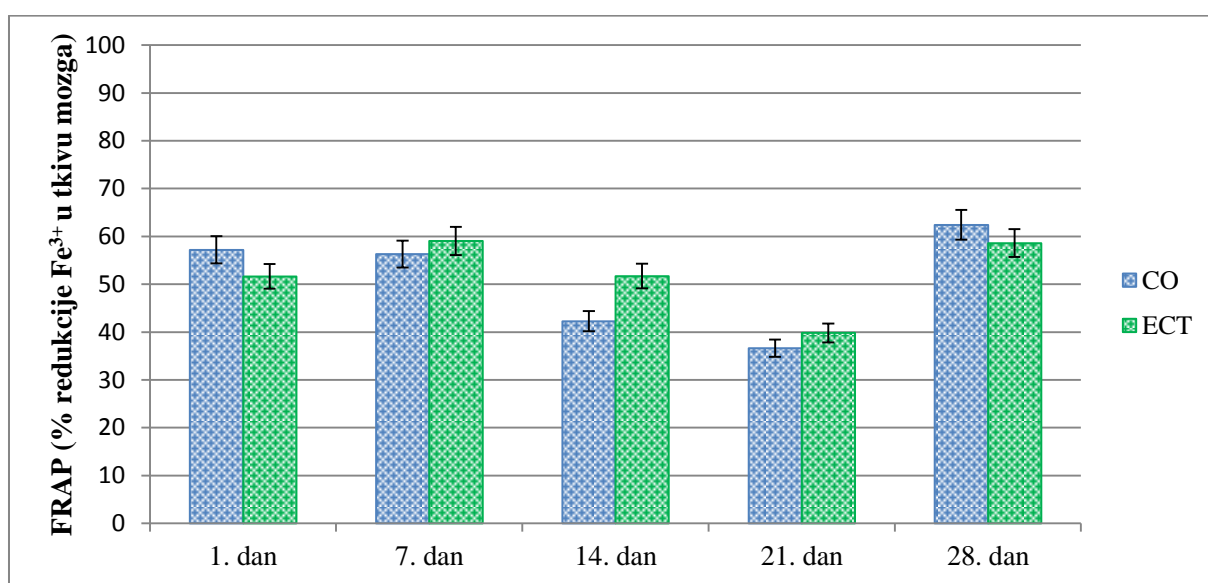


Slika 141. Antioksidacijski kapacitet homogenata tkiva jetre izmjeren metodom FRAP u kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \* statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). ▲ statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). # statistički značajno različito u odnosu na kombinaciju s ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SP. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

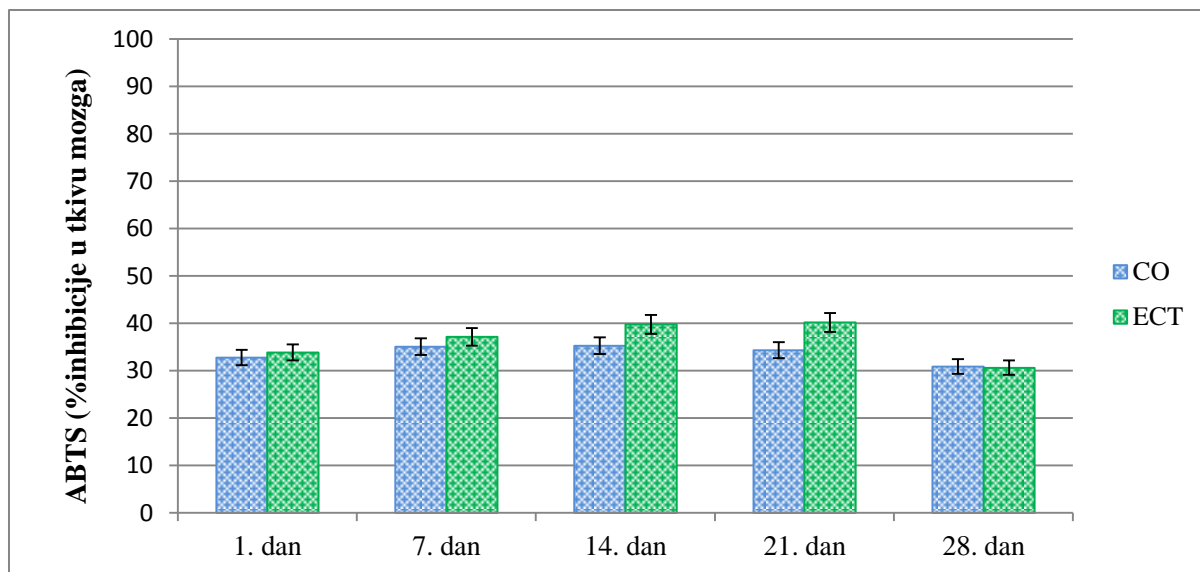


Slika 142. Antioksidacijski kapacitet homogenata tkiva jetre izmjeren metodom ABTS u kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \* statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). ▲ statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SP. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

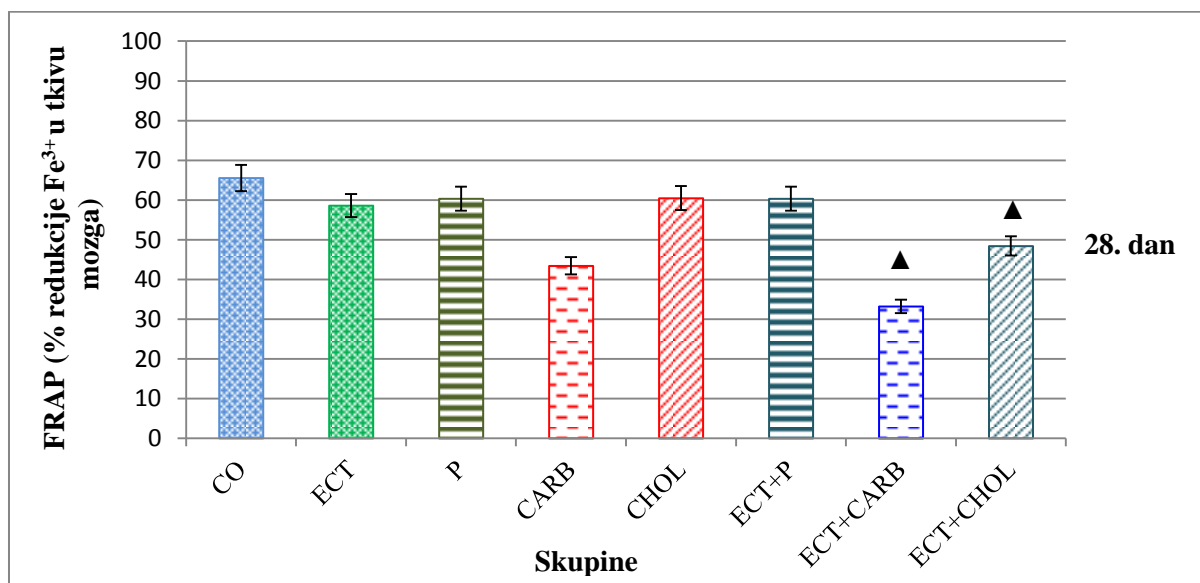
Analizom rezultata antioksidacijskog kapaciteta u homogenatima tkiva mozga mjerenih FRAP i ABTS metodom 1., 7., 14., 21. i 28. dana nije uočena statistički značajna razlika u skupini obrađenoj ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 143, 144). Statistički značajno smanjenje ( $P<0,05$ ) antioksidacijskog kapaciteta 28. dana obrade metodom FRAP, utvrđeno je kod skupina ECT+CARB i ECT+CHOL u odnosu na skupinu ECT. Iz rezultata antioksidacijskog kapaciteta metodom ABTS uočeno je statistički značajno povećanje ( $P<0,05$ ) antioksidacijskog kapaciteta kod skupine ECT+P u odnosu na skupinu ECT, dok je kod skupine P u odnosu na skupinu ECT+P zapažena statistički značajno niža vrijednost ( $P<0,05$ ) antioksidacijskog kapaciteta (Slika 145, 146).



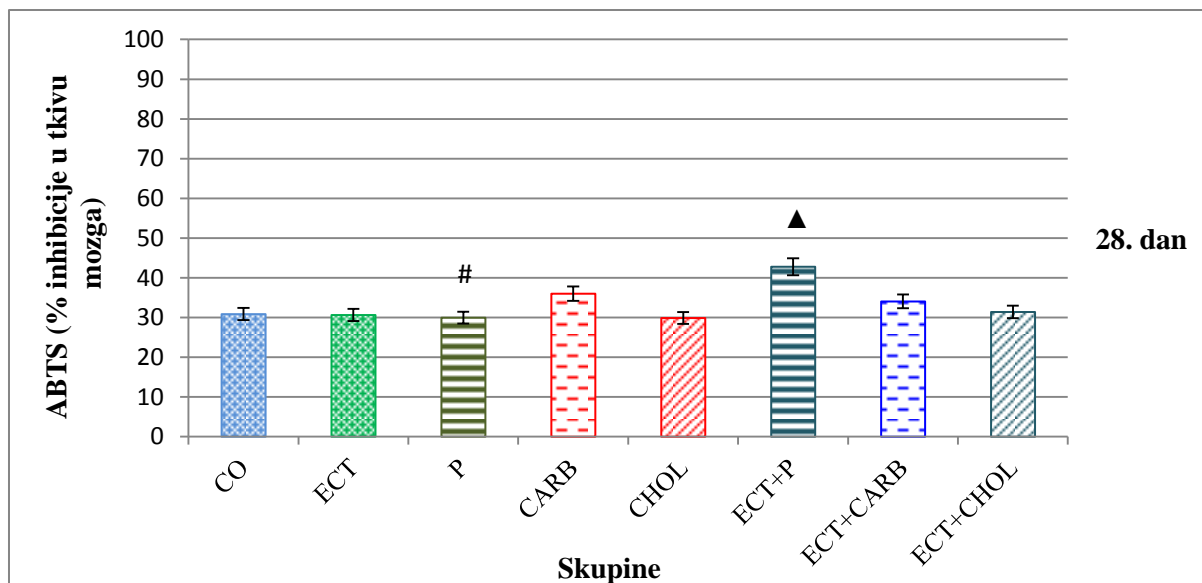
Slika 143. Antioksidacijski kapacitet homogenata tkiva mozga izmjeren metodom FRAP u kontrolne skupine i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevnne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SP. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.



Slika 144. Antioksidacijski kapacitet homogenata tkiva mozga izmjeren metodom ABTS u kontrolne skupine i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao SV±SP. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.



Slika 145. Antioksidacijski kapacitet homogenata tkiva mozga izmjeren metodom FRAP u kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). ▲ statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SP. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

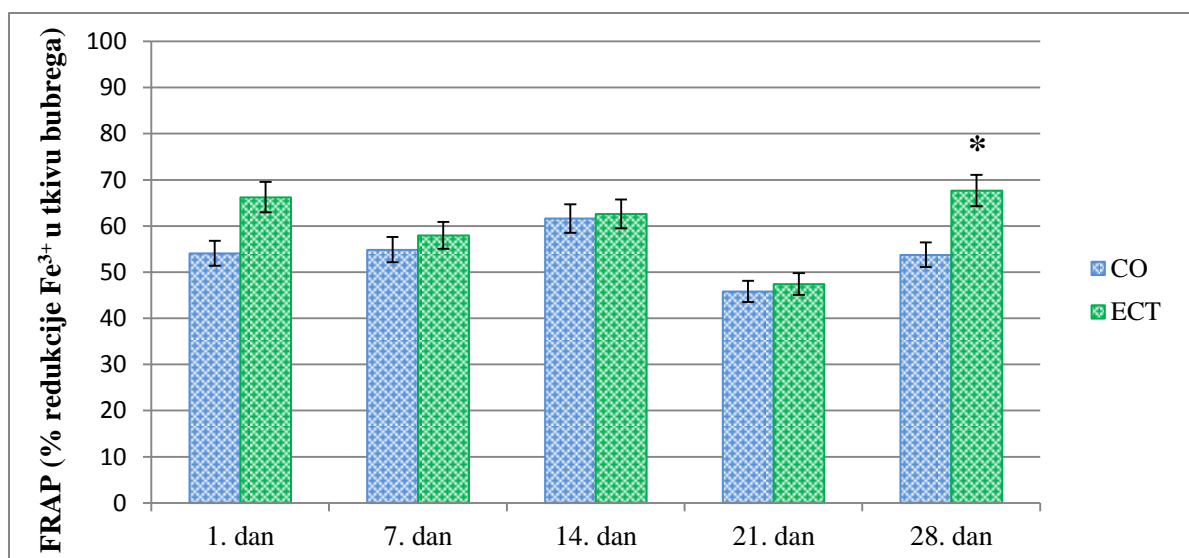


Slika 146. Antioksidacijski kapacitet homogenata tkiva mozga izmjeren metodom ABTS kod kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). ▲ statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). # statistički značajno različito u odnosu na kombinaciju s ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

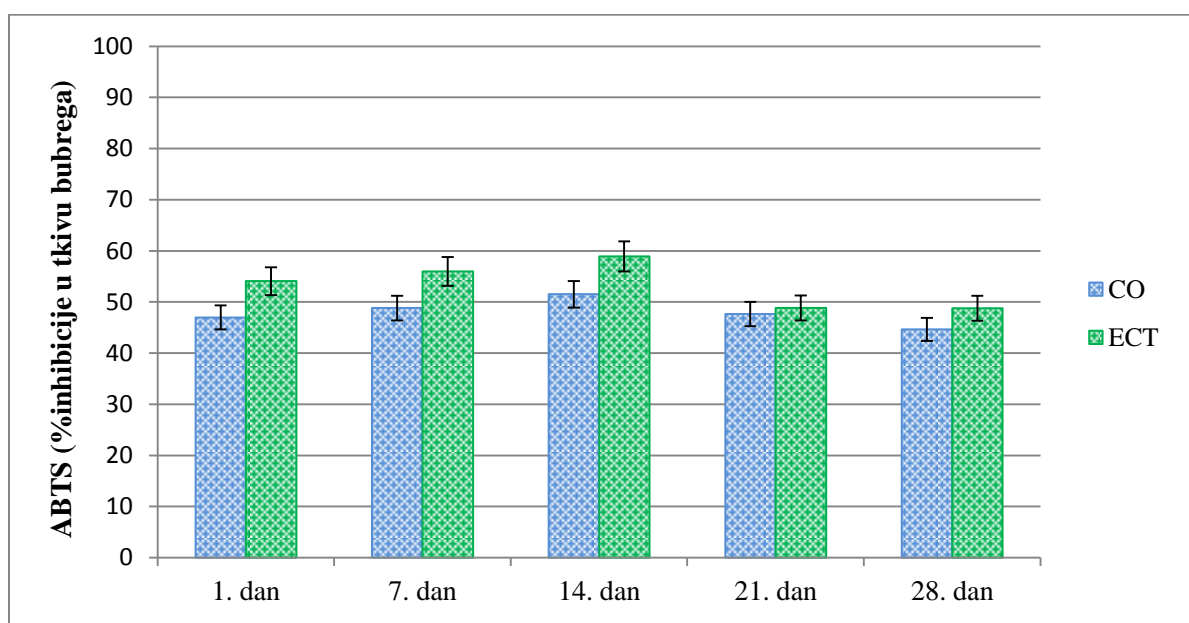
Iz rezultata antioksidacijskog kapaciteta mjenog FRAP metodom u homogenatu tkiva bubrega vidljiv je statistički značajni porast ( $P<0,05$ ) u skupini koja je obrađena ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na kontrolnu skupinu 28. dana obrade (Slika 147). Povećana vrijednost vidljiva je i iz rezultata mjerenja ABTS metodom bez statistički značajne razlike (Slika 148). U odnosu na skupinu ECT, metodom FRAP utvrđena je statistički značajno povišena vrijednost antioksidacijskog kapaciteta kod skupine ECT+P ( $P<0,05$ ), dok ABTS metodom nisu uočene statistički značajne razlike.

Statistički značajno smanjenje antioksidacijske aktivnosti ( $P<0,05$ ) u odnosu na odgovarajuću kombinaciju s ekstraktom cvijeta trnine zabilježeno je u skupini CARB metodom ABTS i FRAP. Nadalje, statistički značajno povećana antioksidacijska aktivnosti ( $P<0,05$ ) u odnosu na odgovarajuću kombinaciju s ekstraktom cvijeta trnine metodom FRAP i ABTS utvrđena je u skupini CHOL. Također statistički značajno smanjenja antioksidacijska aktivnost ( $P<0,05$ ) FRAP metodom utvrđena je i u skupini P u odnosu na skupinu ECT+P (Slika 149,150).

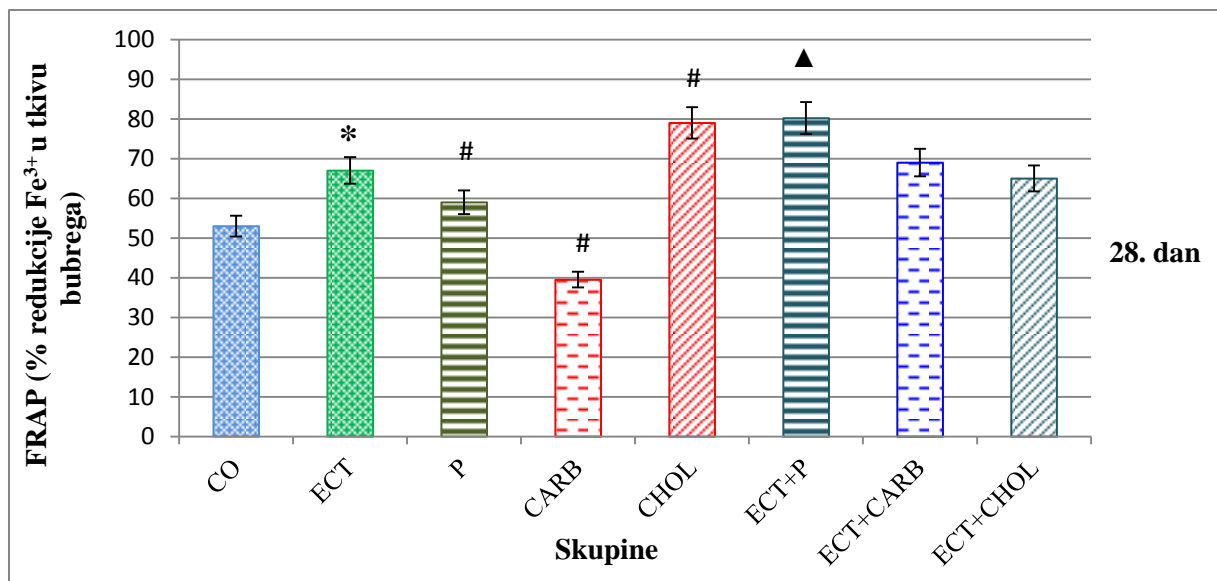




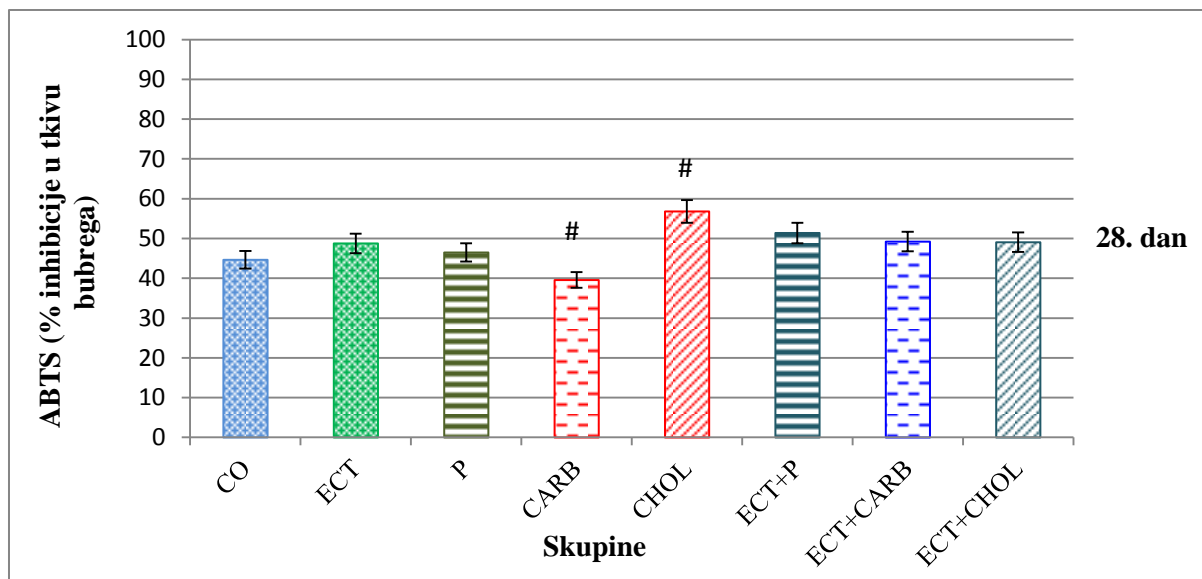
Slika 147. Antioksidacijski kapacitet homogenata tkiva bubrega izmjeren metodom FRAP u kontrolne skupine i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.



Slika 148. Antioksidacijski kapacitet homogenata tkiva bubrega izmjeren metodom ABTS u kontrolne skupine i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). Rezultati su prikazani kao  $SV\pm SP$ . Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.



Slika 149. Antioksidacijski kapacitet homogenata tkiva bubrega izmjeren metodom FRAP u kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). \*statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P<0,05$ ). ^ statistički značajno različito u odnosu na skupinu ECT ( $P<0,05$ ). # statistički značajno različito u odnosu na kombinaciju s ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SP. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.



Slika 150. Antioksidacijski kapacitet homogenata tkiva bubrega izmjeren metodom ABTS u kontrolne skupine i obrađenih skupina nakon 28 dana svakodnevne obrade u C57BL6 miša. Broj životinja po skupini (n=6). # statistički značajno različito u odnosu na kombinaciju s ECT ( $P<0,05$ ). Rezultati su prikazani kao SV±SP. Kratice: CO – kontrola, ECT – ekstrakt cvijeta trnine, P – proteini sirutke, CHOL – kolesterol, CARB – saharoza, SV – srednja vrijednost, SP – standardna pogreška.

## 5. RASPRAVA

U ovom istraživanju istražena je *in vivo* apsorpcija, metabolizam i raspodjela tj. bioraspoloživost pojedinih skupina polifenola nakon intragastričnog unosa ekstrakta cvijeta trnina (*Prunus spinosa* L.), tijekom vremena u tankom crijevu, jetri, mozgu i bubrezima miša C57BL/6. Također je istražena razlika u bioraspoloživosti pojedinih molekula polifenola iz ekstrakta cvijeta trnina u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima, mastima i ugljikohidratima. Sastav pojedinih polifenolnih skupina, tj. bioraspoloživost i metabolizam polifenola u organima miša provedena je pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti povezane sa spektrometrom masa (UPLC MS/MS). Antioksidacijska djelotvornost polifenola iz vodenog ekstrakta cvijeta trnina kao i polifenola iz vodenog ekstrakta u kombinaciji s proteinima sirutke, kolesterolom i saharozom praćena je preko enzima oksidacijskog stresa u tankom crijevu, jetri, bubrezima i mozgu, u kojima su određivane razine lipidne preoksidacije (MDA), koncentracije karboniliranih proteina (PC), koncentracije ukupnog glutationa (GSH), razine enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) i enzimske aktivnosti katalaze (CAT). Utvrđen je i antioksidacijski kapacitet navedenih tkiva izmjeren FRAP i ABTS metodom. Također je istražena poveznica između bioraspoloživosti pojedine vrste molekula polifenola s aktivacijom antioksidacijskog sustava obrane u organskim sustavima miša.

### 5.1. Bioraspoloživost polifenola iz ekstrakta cvijeta trnina u različitim organima miša

#### 5.1.1. Bioraspoloživost polifenola iz ekstrakta cvijeta trnina u različitim organima miša i njihova usporedba s kontrolnom skupinom

Većina istraživanja o bioraspoloživosti polifenola opisuje bioraspoloživost polifenola nakon akutne obrade i to uglavnom u serumu, rijetko organima. Nadalje, do sada objavljeni podatci o apsorpciji, raspodjeli, metabolizmu i ekskreciji (ADME), kao i koncentracijama apsorbiranih polifenolnih molekula uglavnom opisuju bioraspoloživost pojedinih molekula ili ograničene skupine polifenola u pojedinim organima, a nema podataka o istovremenom učinku ili farmakokinetici ovih molekula iz prirodnih biljnih ekstrakata koji prate dinamiku apsorpcije ili promjene više različitih skupina polifenolnih molekula istovremeno. Iz tog razloga važnost ovog istraživanja proizlazi iz sveukupne usporedbe farmakokinetike i bioakumulacije polifenola kojim je dokazan pozitivan potencijal raspodjele polifenolnih molekula unutar organizma, te značajan postotak raspodjele unesenih polifenola nakon akutne i subkronične primjene prirodnog ekstrakta kao izvora složene smjese polifenola.

U ovom radu, akutnom i subkroničnom primjenom intragastrične doze vodenog ekstrakta cvijeta trnine utvrđena je razlika u broju ( $N$ ) bioakumuliranih polifenolnih spojeva.

Primjenom akutne doze (0-24 h), od ukupno 32 polifenolna spoja pronađenih u ekstraktu cvijeta trnine, u tankom crijevu je ukupno detektirano 31,25% ( $N=10/32$ ), jetri 18,75% ( $N=6/32$ ), mozgu 43,75% ( $N=14/32$ ) i bubregu 25% ( $N=8/32$ ). Statistički značajno različit i veći AUC ili  $c_{\max}$  ( $P < 0,05$ ) u skupini obrađenoj ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na kontrolnu skupinu (CO), u tankom crijevu, utvrđen je za 6 spojeva (18,7% od ukupnih spojeva pronađenih u ECT i 60% od ukupno detektiranih spojeva u tankom crijevu) (Tablica 9, 11, 13), jetri 2 (6,25% od ukupnih spojeva pronađenih u ECT i 33,3% od ukupno detektiranih spojeva u jetri) (Tablica 17, 22), mozgu 8 (25,0% od ukupnih spojeva pronađenih u ECT i 57,14% od ukupno detektiranih spojeva u mozgu) (Tablica 24, 26, 28, 30) i bubregu 4 (12,5% od ukupnih spojeva pronađenih u ECT i 50,0% od ukupno detektiranih spojeva u bubregu) (Tablica 32, 34, 36, 38).

Subkroničnim doziranjem (1.-28.dana) utvrđena je veća bioakumulacija polifenolnih spojeva unutar organa. Na ovaj zaključak ukazuju rezultati mjerenja koncentracija nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana pri čemu je povećan broj detektiranih polifenolnih spojeva u svim organima. Subkroničnim doziranjem, u tankom crijevu je ukupno detektirano 84,37% ( $N=27/32$ ), jetri 81,25% ( $N=26/32$ ), mozgu 68,75% ( $N=22/32$ ) i bubregu 37,5% ( $N=12/32$ ). Statistički značajno različit i veći AUC ili  $c_{\max}$  ( $P < 0,05$ ) u skupini obrađenoj ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na kontrolnu skupinu (CO), u tankom crijevu, utvrđen je za 18 spojeva (56,25% od ukupnih spojeva pronađenih u ECT i 66,6% od ukupno detektiranih spojeva u tankom crijevu) (Tablica 10, 12, 14, 16), jetri 16 (50% od ukupnih spojeva pronađenih u ECT i 69,56% od ukupno detektiranih spojeva u jetri) (Tablica 18, 19, 21, 23) mozgu 11 (34,37% od ukupnih spojeva pronađenih u ECT i 50,0% od ukupno detektiranih spojeva u mozgu) (Tablica 25, 27, 29, 31) i bubregu 8 (25% od ukupnih spojeva pronađenih u ECT i 66,6% od ukupno detektiranih spojeva u bubregu) (Tablica 33, 35, 37, 39).

Na temelju rezultata i razlike u broju detektiranih spojeva u tankom crijevu, jetri, mozgu i bubrezima nakon akutne i kronične obrade vidljivo je da svi navedeni organi posjeduju određeni bioakumulacijski potencijal za polifenole. Bioakumulacijski potencijal se povećava ponovljenim doziranjem, a broj detektiranih spojeva se subkroničnom obradom za razliku od akutne obrade povećava za 53% u tankom crijevu, 63% u jetri, 25% u mozgu i 12,5% u bubrezima. Nadalje, dobiveni rezultati zajedno s postignutim maksimalnim koncentracijama

pojedinih polifenola u tankom crijevu, jetri, bubrezima, te mozgu unatoč dobroj zaštiti putem krvno-moždane barijere ukazuju na relativno dobar apsorpcijski potencijal polifenola. Rezultati ovog istraživanja su poučni s obzirom da većina istraživanja o bioraspoloživosti polifenola ukazuje na njihovu nisku bioraspoloživost u serumu ili pojedinim organima, osobito nakon akutnog izlaganja u organizama polifenolima.

Većina istraživanja procjenjuje unos polifenola tj. njihovu bioraspoloživost na temelju flavonoida i to: flavonola (kampferola, miricetina i kvercetina), flavona (apigenina i luteolina) i flavan-3-ola, uključujući (-)-epikatehin, (-)-epigalokatehin i (-)-epigalokatehin-3-galat (Chen, 2013). Vodeni ekstrakt cvijeta trnine korišten u ovom istraživanju također sadrži navedene skupine flavonoida, uključujući i fenolne kiseline. Istraživanja o bioraspoloživosti često napominju izlučivanje velikog broja unesenih flavonoida preko fecesa, bez apsorpcije u tankom crijevu ili njihovu daljnju razgradnju pomoću crijevnih bakterija koja dovodi do nastanka velikog broja različitih metabolita u debelom crijevu (Chen, 2013). Nadalje pretpostavlja se da je učinkovitost bioakumulacije polifenola znatno niža od bioakumulacije drugih bioaktivnih molekula, primjerice antioksidacijskih vitamina/provitamina, čak i onda kada je njihova konzumirana koncentracija veća od unosa vitamina/provitamina u hrani. Sukladno navedenom, pojedini istraživači smatraju da unos velikih doza polifenola u organizam sisavaca dovodi do štetnih učinaka i kao takva je njihova apsorpcija ograničena kao evolucijska prilagodba kako bi se izbjegli neželjeni učinci biljnih (nešto nepovoljnijih) ksenobiotika (Terao 2017). Međutim, pregledom dosadašnjih istraživanja utvrđeno je da se određene vrste polifenola koji se nisu apsorbirali u tankom crijevu mogu dodatno podvrgnuti enzimskoj razgradnji u debelom crijevu, što dovodi do njihove razgradnje na manje produkte, tj. nastanka velikog broja novih metabolita (druga faza metabolizma). Na taj način metaboliti polifenola ulaze u sistemski optok krvi (Teng i Chen, 2018) gdje se putem portalne vene transportiraju do ostalih tkiva i organa kao što je prikazano i u rezultatima ovog istraživanja ili se izlučuju u urin.

U ovom istraživanju, iz rezultata detektiranih polifenolnih spojeva u tankom crijevu i jetri nakon subkroničnog doziranja, uočava se da tanko crijevo i jetra imaju sličan omjer apsorpcije, tj. da se kvalitativno i kvantitativno razlikuju u pojedinim polifenolnim spojevima. Naime, apsorpcija polifenola i njihovi fiziološki učinci ovise o njihovoj konzumiranoj količini, bioraspoloživosti u gastrointestinalnom sustavu, te metabolizmu pomoću crijevnih bakterija (Cardona *i sur.*, 2013; Pichichero *i sur.*, 2009; Selma *i sur.*, 2009). Iz tog razloga, tanko crijevo u ovom istraživanju predstavlja primarni organ kako bi se procijenila

bioakumulacija, apsorpcija, raspodjela i metabolička konverzija tj. bioraspoloživosti polifenola unesenih putem ekstrakta cvijeta trnine.

Statistički značajno povećane vrijednosti farmakokinetičkih parametara ( $c_{\max}$ /AUC) nakon akutnog doziranja u tankom crijevu kod skupine ECT u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ), uočene su za spojeve: kvercetin-3-glukozid, kvercetin-ramnozid, kvercetin-rutinozid, apigenin, (+)-katehin i (-)-epikatehin. Nakon subkroničnog doziranja, broj detektiranih polifenolnih spojeva se povećava za 53,12%, a statistički značajno povećane vrijednosti farmakokinetičkih parametara ( $c_{\max}$ , AUC) kod skupine ECT u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ), uočene su za spojeve: kvercetin-3-glukozid, kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-ramnozid, kvercetin-pentozid, kampferol-3-glukozid, kampferol-pentozil-heksozid, kampferol-pentozid, luteonin, apigenin, (-)-epigalokatehin-3-galat, te kafeinsku, *p*-kumarinsku, ferulinsku, 3-*O*-feruloil kininsku i galnu kiselinu.

Na temelju navedenih polifenolnih spojeva čije su farmakokinetičke vrijednosti u tankom crijevu statistički značajno povećane u odnosu na kontrolnu skupinu, može se uočiti da su to uglavnom polifenolni spojevi čiji je postotak ujedno i najveći u prethodno utvrđenom sastavu ekstrakta cvijeta trnine. Nadalje, s obzirom na prethodno provedenu UPLC MS/MS kvalitativnu i kvantitativnu analizu vodenog ekstrakta cvijeta trnine, ovi podaci također upućuju da u kiselim uvjetima želudca prije dolaska u tanko crijevo ne dolazi do značajnih promjena u metabolizmu navedenih polifenola što je u skladu s dosad objavljenim istraživanjima (Wang *i sur.*, 2016b).

Statistički značajno povećana vrijednosti farmakokinetičkih parametara ( $c_{\max}$ , AUC) nakon akutnog doziranja u jetri kod skupine ECT u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ), uočena je za kvercetin-3-rutinozid i 4-*p*-kumaroil kininsku kiselinu. Nakon subkroničnog doziranja, broj detektiranih polifenolnih spojeva se povećava za 62,5%, a statistički značajno povećane vrijednosti farmakokinetičkih parametara ( $c_{\max}$ , AUC) kod skupine ECT u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ), uočene su za spojeve: kvercetin-3-glukozid, kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-ramnozid, kvercetin-pentozid, kampferol-3-*O*-ramnozid, kampferol-pentozil-heksozid, kampferol-rutinozid, luteonin, (-)-epigalokatehin-3-galat, te kafeinsku, *p*-kumarinsku, 3-*p*-kumaroil kininsku, 4-*p*-kumaroil kininsku i galnu kiselinu.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je se broj detektiranih polifenolnih spojeva u jetri u odnosu na broj detektiranih spojeva u tankom crijevu nakon akutne obrade smanjuje za dva spoja (kvercetin-3-glukozid i kvercetin-3-ramnozid), dok se nakon subkronične obrade

smanjuje za jedan spoj (kampferol-heksozid-pentozil). Usporedimo li vrijednosti maksimalnih koncentracija ( $c_{\max}$ ) istih spojeva detektiranih u tankom crijevu i jetri nakon subkronične primjene ekstrakta cvijeta trine, vidljivo je da su maksimalno postignute koncentracije za većinu spojeva u jetri manje, izuzev kafeinske kiseline koja dostiže pet puta veću koncentraciju u jetri u odnosu na tanko crijevo. Kao jedan od mogućih razloga većih koncentracija polifenola u tankom crijevu u odnosu na jetru možemo pripisati mikrobiološkoj biotransformaciji i unosu većeg broja polifenola ponovljenim (subkroničnim) doziranjem.

Brojna istraživanja pokušala su opisati mehanizme apsorpcije i povećanje apsorpcije polifenola u tankom crijevu. U jednom od istraživanja korištene su Caco-2- stanice, stanični modeli za simulaciju crijevne permeabilnosti flavonoida (Barrington *i sur.*, 2009; Tammela *i sur.*, 2004; Tian *i sur.*, 2006b). U *in vitro* dobivenim rezultatima na Caco-2 stanicama, dokazano je da se hidrofobni flavonoidi bolje apsorbiraju, što se može objasniti poboljšanom propusnošću kroz fosfolipidni dvosloj stanične membrane. Nadalje, također je dokazano da se flavonoidni glikozidi slabo apsorbiraju kroz modele crijevnih stanica zbog prisutnosti šećernih skupina, što povećava hidrofilnost, čime se smanjuje propustljivost stanične membrane (Dai *i sur.*, 2008). Suprotno navedenim *in vitro* istraživanjima, u *in vivo* istraživanjima, utvrđeno je da se određeni flavonoidni glukozidi apsorbiraju učinkovitije od njihovih aglikonskih oblika. Tako je dokazano da se kvercetinški glukozidi u ljudi apsorbiraju dvostruko više od odgovarajućih aglikona (Petersen *i sur.*, 2016; Hollman i Arts, 2000). Slični rezultati dobiveni su i u pokusima na svinjama (Cermak *i sur.*, 2003), štakorima (Morand *i sur.*, 2000) i psima (Reinboth *i sur.*, 2010). Nekoliko pretpostavki objašnjava bolju apsorpciju glukozida u odnosu na aglikon. Prije svega, na osnovi nižeg koeficijenta raspodjele u sustavu oktanol-voda, dokazano je da glukozidni kvercetin ima bolju topljivost u vodi u odnosu na kvercetin aglikon (Rothwell *i sur.*, 2015). Nadalje, iako su polifenolni glukozidi općenito preniske lipofilnosti da bi mogli pasivno difundirati kroz biološke membrane poput aglikona, dva su mehanizma koja objašnjavaju bolju apsorpciju kvercetin-glukozida u odnosu na aglikon kvercetin. U prvi je uključen membranski prijenosnik SGLT-1 (o natriju ovisan glukozni prijenosnik), a mjesto i način kojim se kvercetinški glukozid apsorbira ovisi o njegovoj kemijskog strukturi (Guo i Bruno, 2015). Njime se glukozidi transportiraju u lumen enterocita gdje su potom supstrati za citosolnu-glukozidazu (CBG) široke specifičnosti. U drugi mehanizam uključena je laktaza-florizin hidrolaza (LPH) smještena na membrani enterocita s aktivnim mjestom okrenutim prema lumenu crijeva koja svojom aktivnošću otpušta aglikone koji potom mogu pasivno difundirati preko membrane (Bondonno *i sur.*,

2016; Lesjak *i sur.*, 2014; Arts *i Hollman*, 2005; Nemath *i sur.*, 2003; Day *i sur.*, 2003). Prema tome, pretpostavka bolje apsorpcije pripisuje se učinkovitijoj deglikolizaciji bakterijama i enzimima epitelnih stanica (Cermak *i sur.*, 2003). Nadalje, gastrointestinalni sustav zaštićen je i slojem sluzi (90-98% sadržaja vode) koji omogućuje unos hranjivih tvari. Kako bi se flavonoidi mogli apsorbirati, moraju proći kroz sloj crijevne sluzi (Georgiades *i sur.*, 2014), međutim učinak crijevne sluzi na apsorpciju polifenola i dalje je nepoznat. Pretpostavlja se da hidrofobna priroda aglikonskih oblika polifenola ograničava ulazak u epitelne stanice, to jest smatra se da glikozidirani polifenoli imaju bolju mogućnost prolaska kroz sloj crijevne sluzi, nakon čega se deglikoliziraju na površini stanica, što dovodi do bolje apsorpcije. Većina istraživača smatra da upravo navedeni opis objašnjava razlog povećane apsorpcije flavonoidnih glukozida u *in vivo* nego u *in vitro* uvjetima (Béduneau *i sur.*, 2014). Nadalje, istraživanjem međureakcije izoliranih crijevnih mucina i flavan-3-ola izoliranih iz čaja u *in vitro* uvjetima utvrđeno je da se flavan-3-oli, osobito epigalokatehin-3-galat (EGCG), vežu na mucine što dovodi do umrežavanja i agregacije čime se ograničava bioraspoloživost flavan-3-ola (Georgiades *i sur.*, 2014).

Istraživanja o apsorpciji i bioraspoloživosti flavonola uglavnom su istraživana na flavonolu kvercetin (Guo i Bruno, 2015). U biljnim se stanicama flavonoli pojavljuju gotovo isključivo kao glikozidi. Tako su u sjemenkama bilja najveće koncentracije uočene za kvercetin-3-glukozid (izokvercetin), dok se u jabukama i čajevima nalaze velike koncentracije kvercetin-rutinozida (rutina) (Heim *i sur.*, 2002; Yoo *i sur.*, 2010). Većina istraživanja o bioraspoloživosti kvercetina navodi da apsorpcija kvercetina ovisi stupnju glikolizacije i tipu šećerne jedinice koja je vezana za molekulu aglikona (Hollman *i sur.*, 1997a; Hollman *i sur.*, 1997b; Olthof *i sur.*, 2000; Scholz i Williamson, 2007; Crozier *i sur.*, 2010; Lee i Mitchell, 2012). U *in vivo* istraživanjima u ljudi, Lee i Mitchell (2012), utvrdili su da kvercetin-3-glukozid iz luka ima bolju apsorpciju u usporedbi s kvercetin-ramnozidom i kvercetin-galaktozidom iz jabuka.  $AUC_{0-24h}$  i  $c_{max}$  vrijednosti kvercetin-3-glukozida u ljudskoj plazmi bile su tri puta veće u odnosu na kvercetin-ramnozid i kvercetin-galaktozid.  $T_{max}$  vrijednost navedenih metabolita kvercetina se nije razlikovala, ali je  $t_{1/2}$  kvercetin-ramnozida i kvercetin-galaktozida bila četiri puta manja u odnosu na kvercetin-3-glukozid. Na temelju dobivenih parametara, istraživači su ustanovili da kvercetin-3-glukozid ima bolju bioraspoloživost zbog veće apsorpcije (Lee i Mitchell, 2012). Slična rezultati dobiveni su i u istraživanjima u životinja (Manach *i sur.*, 2004; Wang *i sur.*, 2016a). U literaturi se navodi da se kvercetin-ramnozid, galaktozid i rutinozid za razliku od kvercetin-glukozida apsorbiraju u debelom



crijevu nakon mikrobne deglikolizacije posredovane  $\beta$ -glukozidazama i  $\beta$ -ramnozidazama što dovodi do nastanka enterohepatičkog kruženja i produljenja vremenskog zadržavanja polifenola u organizmu (Day *i sur.*, 2003; Jaganath *i sur.*, 2006; Kim *i sur.*, 2008; Lee *i sur.*, 2017). U rezultatima ovog istraživanja također je uočeno da kvercetin-ramnozid i kvercetin-3-rutinozid u odnosu na kvercetin-3-glukozid, u tankom crijevu nakon akutne i subkronične obrade imaju veću AUC vrijednost što upućuje na njihovo produljenje vremenskog izlaganja u organizmu i deglikolizaciju pomoću crijevne mikroflore. Sličan učinak uočen je i za kampferol-pentozid i kampferol-3-glukozid. Ovi rezultati su u skladu s prethodno navedenim istraživanjima.

Apsorpcija oralno unesenih *O*-glikozida flavona i njihovih aglikona istražena je na velikom broju životinja, posebice štakora. Većina istraživanja dokazuje da se apigenin i luteolin, te njihovi jednostavni glukozidi brzo apsorbiraju. Vrijeme njihove maksimalne koncentracije postiže se za manje od 1 h s maksimalnim koncentracijama u plazmi u vrijednostima od 1-100  $\mu\text{mol/L}$ , a vrijednost  $c_{\text{max}}$  je ovisna o dozi i međureakcijama s matricama iz hrane (Zhou *i sur.*, 2008; Sarawek *i sur.*, 2008; Hanske *i sur.*, 2009). Najkraće  $T_{\text{max}}$  vrijednosti utvrđene su za čisto aplicirani luteolin što upućuje da brzina apsorpcije luteolina ovisi o međureakcijama luteolina i matricama u hrani (Shimoi *i sur.*, 1998; Zhou *i sur.*, 2008; Sarawek *i sur.*, 2008). Duži  $T_{\text{max}}$  uočen je za luteolin i apigenin iz ekstrakta biljke sporiša (*Verbena officinalis* L.). Iako oblik flavona nije specificiran, prirodni oblici flavona su -mono i -diglukuronidi koji se hidroliziraju u aglikone prije apsorpcije (McNally *i sur.*, 2003; Bilia *i sur.*, 2008). Najdulji  $T_{\text{max}}$  i najveći  $c_{\text{max}}$  uočeni su u plazmi štakora hranjenih radioaktivno obilježnim apigeninom u kojem su vrijednosti farmakokinetičkih parametara uključivale sve metabolite apigenina (Gradolatto *i sur.*, 2005). Pojedina istraživanja procijenila su apsorpciju flavona i u miševa. U svrhu kemopreventivnog djelovanja flavona, Cai *i sur.* (2007) proveli su istraživanje o metabolizmu i raspodjeli triacina i apigenina u C57BL/6J miševa. Miševi su obrađeni kroz 7 dana prehranom koja je sadržavala 0,9 mmol/kg triacina i 1,1 mmol/kg apigenina. Koncentracija triacina i apigenina izmjerena je u krvnoj plazmi, tkivu jetre i mukozi tankog crijeva primjenom HPLC metode uz UV detekciju. Izmjerene koncentracije apigenina u  $\mu\text{g/g}$  iznosile su:  $0,024 \pm 0,08$  u krvnoj plazmi,  $0,405 \pm 1,0$  u tkivu jetre, te  $2,32 \pm 47$  u mukozi tankog crijeva. U ovom istraživanju, nakon subkronične obrade, također je utvrđena statistički značajno veća vrijednost farmakokinetičkih parametara flavona apigenina u jetri ( $c_{\text{max}} = 0,33 \mu\text{g/g}$ ,  $T_{\text{max}} = 168 \text{ h}$ ) i tankom crijevu ( $c_{\text{max}} = 2,5 \mu\text{g/g}$ ,  $T_{\text{max}} = 168 \text{ h}$ ) kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u odnosu na kontrolnu skupinu. Usporedimo li rezultate

maksimalnih koncentracija apigenina u ovom istraživanju s vrijednostima  $c_{\max}$  prethodno opisanog istraživanja, vidljivo je da su maksimalno postignute koncentracije gotovo pa jednake.

Osim flavonoida, polifenoli uključuju i fenolne kiseline. Napravljena je opsežna analiza provedenih istraživanja koja su ispitivala bioraspoloživost fenolnih kiselina. Dosadašnja istraživanja ukazuju da se slobodne hidroksicimetne kiseline brzo apsorbiraju u želudcu i tankom crijevu pomoću prijenosnika monokarboksilnih kiselina (MCT), a zatim prevode u glukuronide i sulfate (Clifford, 2000; Crozier *i sur.*, 2010). Istraživanjem Konishi *i sur.* (2006) utvrđeno je da se fenolne kiseline apsorbiraju u želudcu s različitim stupnjevima apsorpcije. Prije iniciranja 2,25  $\mu\text{mol}$  otopine fenolnih kiselina koja je sadržavala ferulinsku, *p*-kumarinsku, galnu, klorogensku i kafeinsku kiselinu, pilorus štakora je ligiran, a koncentracije fenolnih kiselina u plazmi štakora izmjerene su nakon 5, 15 i 25 minuta od intragastričnog unosa. U prvih 5 minuta, najveće koncentracije u plazmi štakora utvrđene su za ferulinsku kiselinu. Nakon 5 minuta, usporedbom koncentracija i vrijednosti površina ispod krivulje ( $\mu\text{M} \times \text{min}$ ) dobivena relativna bioraspoloživost fenolnih kiselina slijedila je niz: galna kiselina = klorogenska kiselina < kafeinska kiselina < *p*-kumarinska kiselina = ferulinska kiselina (Konishi *i sur.*, 2006). Njihovi rezultati ukazuju da prijenosnik monokarboksilnih kiselina može biti uključen u apsorpciju fenolnih kiselina u želudcu. Također, rezultati njihova istraživanja odgovaraju prijašnjim istraživanjima o afinitetu fenolnih kiselina za MCT u Caco-2 stanicama (Konishi *i sur.*, 2003; Konishi i Shimizu, 2003; Konishi i Kobayashi 2004). Današnje spoznaje također ukazuju da se hidroksicimetne kiseline metaboliziraju u lumenu crijeva i crijevnoj mukozi te jetri i bubregu, a metabolički put ovisi o strukturi, dozi i postojećim strukturnim oblicima (Kay *i sur.*, 2017; Zhao i Moghadasian, 2010). Hidroksibenzojeve kiseline su nešto manje zastupljene u biljnim izvorima, pa je tako i manji broj istraživanja koje ispituju njihovu bioraspoloživost (Lafay i Gil-Izquierdo, 2008). Usporedimo li maksimalne koncentracije apsorbiranih fenolnih kiselina u jetri s prethodno opisanim istraživanjem, iz rezultata ovog istraživanja vidljivo je da su maksimalne bioapsorbirane vrijednosti fenolnih kiselina slične gore navedenom nizu o bioraspoloživosti fenolnih kiselina.

Nakon prolaska polifenolnih spojeva kroz crijevnu barijeru, polifenolni spojevi ili njihovi konjugirani metaboliti ulaze u krvožilni sustav kojim putuju u određeno tkivo. Međutim, bioraspoloživost polifenola u organizmu također može biti pod utjecajem njihovog afiniteta prema krvnim proteinima. Dokazano je da polifenoli mogu ostvariti međureakciju s

određenim krvnim proteinima (D'Archivio *i sur.* 2007; Zsila *i sur.*, 2011; Bolli *i sur.*, 2010; Xiao i Kai, 2012). Naime, polifenoli i njihovi metaboliti u cirkulaciji brzo prelaze iz slobodne frakcije u frakciju vezanu na proteine plazme, i obratno. Stupanj vezanja na proteine plazme može utjecati na brzinu izlučivanja polifenola iz organizma te na njihovu dopremu do ciljnih stanica i tkiva (Pandey i Rizvi, 2009a). Inkubacija kvercetina u ljudskoj plazmi u uvjetima *in vitro* pokazala je da se on preferentno nalazi vezan na proteine plazme i to na ljudski serumski albumin (engl. *human serum albumin*, HSA) (Boulton *i sur.* 1998). Slično tome, inkubacijom EGCG-a s HSA utvrđeno je njegovo vezanje na taj plazmatski protein, te je kao glavni strukturni element za afinitet vezanja prepoznata galoilna skupina (Zinellu *i sur.* 2015).

Kao što je prethodno spomenuto, određene vrste polifenola koje se nisu apsorbirale u tankom crijevu mogu biti podvrgnuti enzimskoj hidrolizi enterobakterija debelom crijevu, što dovodi do nastanka velikog broja novih metabolita. Nastali metaboliti polifenola ulaze u sistemski optok krvi gdje se putem portalne vene transportiraju do jetre i moždanog tkiva kao što je prikazano u rezultatima ovog istraživanja.

U usporedbi s drugim organima, posebice bubrezima, s obzirom na broj otkrivenih spojeva u mozgu nakon akutne i subkronične obrade ekstraktom cvijeta trnine, može se zaključiti da mozak posjeduje dobar bioakumulacijski potencijal za polifenole. U usporedbi s jetrom, također je vidljiv dobar bioakumulacijski potencijal mozga za bioakumulaciju polifenola unatoč očekivanom ograničenju njihova prijenosa kroz krvno-moždanu barijeru (KMB). Kako bi istražili koncentraciju kvercetina u mozgu i njegov učinak na ekspresiju relevantnih gena kod Alzheimerovoj bolesti, Huebbe *i sur.* (2010) obradili su C57BL/6 miševe aglikonom kvercetina u dozi od 2 g/kg tijekom šest tjedana. Izmjerena koncentracija aglikona kvercetina iznosila je 0,28 nmol/kg, dok je koncentracija njegovog metiliranog metabolita izoramnetina iznosila 0,08 nmol/g tkiva mozga. Izmjerene vrijednosti koncentracija kvercetina u opisanom istraživanju odgovaraju rezultatima prosječnih  $c_{max}$  vrijednosti kvercetinskih spojeva dobivenih u ovom istraživanju. Nadalje, Ferruzzi *i sur.* (2009) istražili su bioraspoloživost galne kiseline i flavan-3-ola iz ekstrakta sjemenki grožđa kao potencijalnu implikaciju za liječenje Alzheimerove bolesti u modelu štakora. Štakori su obrađeni intragastrično ekstraktom sjemenki grožđa u dozama od 50, 100 i 150 mg/kg tjelesne težine. Nakon akutne obrade (8 h neposredno nakon intragastričnog unosa), primjenom tekućinske kromatografije uz spektrometar masa (LC-MS), u plazmi pokusnih životinja dokazali su prisutnost galne kiseline (GA), katehina (C) i epikatehina (EC). Nadalje, subkroničnim intragastričnom obradom, jedanput dnevno u trajanju od 10 dana, utvrdili su povećanu bioakumulaciju GA, C

i EC za 198%, 253% i 282%. Nakon akutne obrade u mozgu štakora nisu utvrdili prisutnost C i EC, međutim nakon subkronične obrade njihova je koncentracija u mozgu porasla na  $290,7 \pm 45,9$  i  $576,7 \pm 227,7$  pg/g tkiva mozga. Maity *i sur.* (2006) koji su istraživali apsorpciju, raspodjelu i farmakokinetiku teaflavina i polifenola iz ekstrakta crnog čaja u miševima također su utvrdili da se ponovljenim doziranjem teaflavina povećava njegovo upijanje u stanicama jetre, a povećanje je povećano ukoliko se daje u kombinaciji s ekstraktom crnog čaja.

Youdim *i sur.* (2003) proučavali su bioraspoloživost flavonoida citrusa preko krvno-moždane barijere. Rezultati su pokazali da flavonoidi citrusa prolaze kroz krvno-moždanu barijeru u obliku metabolita pasivnim transcelularnim difuzijskim procesom koji ovisi o vremenu i dozi. Koncentracija propusnosti vezana je za lipofilnost metabolita, a glavni metaboliti detektirani u mozgu bili su glukuronidirani flavonoidi (Youdim *i sur.*, 2003). Također je objavljeno da glikozidi formirani hidrolizom O-glikozidnih veza flavonoida imaju bolju lipofilnost i propusnost od njihovih nativnih glikozida, što je pogodno za transmembranski prijenos (Scheepens *i sur.*, 2010). Yingcong *i sur.* (2017) istražili su apsorpciju kampferol-3-rutinozida i njegov prijenos kroz krvno-moždanu barijeru u štakora. Rezultati njihova istraživanja dokazali su da prijenos kampferol-3-rutinozida ovisi o koncentraciji, a dodatak inhibitora P-glikoproteina nije utjecao na njegovu apsorpciju. Nadalje, također je utvrđeno da se kampferol-3-rutinozid potpuno apsorbira u crijevima, a proces apsorpcije slijedi kinetiku prvog reda. Osim navedenog, dokazano je da se prijenos kampferol-3-rutinozida kroz krvno-moždanu barijeru odvija pasivnom difuzijom (Yingcong *i sur.*, 2017). U ovom istraživanju, statistički značajno veća vrijednost  $c_{\max}$  i AUC u mozgu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u odnosu na kontrolnu skupinu također je uočena za spoj kampferol-3-rutinozid. Osim navedenog, nakon akutne obrade, od svih detektiranih metabolita kampferola u mozgu, za kampferol-3-rutinozid ( $c_{\max}=2,93$   $\mu\text{g/g}$ ) uočene su i najveće bioakumulirane koncentracije. Dobiveni rezultati također ukazuju na brzu apsorpciju i metabolizam kampferol-3-rutinozida u lumenu crijeva i jetri, te pasivnom prijenosu kroz krvno-moždanu barijeru što je u skladu s prethodno navedenim istraživanjima.

U odnosu na tanko crijevo, mozak i jetru, u bubregu je zabilježen najmanji broj polifenolnih spojeva, ali je zato u bubrezima uočen najveći postotak detektiranih spojeva koji imaju statistički značajno veći ( $P<0,05$ )  $c_{\max}$  ili AUC u odnosu na kontrolnu skupinu. Ti rezultati upućuju na zaključak da je pretpostavljena niska bioraspoloživost polifenola u organizmu posljedica ne samo niske apsorpcije već i povećane ekskrecije, s obzirom da mali broj

detektiranih spojeva vjerojatno ukazuju i na brzo izlučivanje. Nadalje, rezultati ukazuju da su razine koncentracija polifenola (do otprilike 5  $\mu\text{g/g}$  tkiva) u crijevima i bubrezima bile dvostruko veće od koncentracija polifenola izmjerenih u tkivima jetre i perifernim tkivima mozga (do otprilike 2,5  $\mu\text{g/g}$ ) što također ukazuje na dinamiku apsorpcijskog izlučivanja i potrebne biodostupne ulazne doze kako bi se postigli određeni terapijski učinci. Iz dobivenih rezultata farmakokinetičkih vrijednosti flavan-3-ola, u bubregu je uočena tendencija raspodjele epikatehina. Slična tendencija raspodjele uočena je u istraživanju Ganguly *i sur.* (2016) koji su proveli istraživanje o bioraspoloživosti flavan-3-ola i teaflavina iz dvije vrste čaja (Asam black Tea i Darjeeling Black Tea) u tkivima zamoraca (pluća, jetra, bubreg i srce). Zamorci su podijeljeni u tri skupine. Prva skupina je primala 5%-tnu otopinu Asam black Tea (20 mL/kg), druga, 5%-tnu otopinu Darjeeling Tea (20 mL/kg), dok je treća skupina primala vodu (kontrolna skupina, 20 mL/kg). Rezultati su analizirani UPLC MS/MS metodom. Životinje su obrađene intragastrično, dva puta dnevno, tijekom 14 dana. Izmjerene srednje koncentracije flavan-3-ola u bubregu su ovisno o vrsti čaja iznosile (u ng/g): za epigalokatehin 49,1 $\pm$ 17,1 i 34,2 $\pm$ 8,2, epikatehin 47,8 $\pm$ 11,0 i 22,3 $\pm$ 9,72, epigalokatehin-galat 91,8 $\pm$ 15,2 i 45 $\pm$ 7,7 i epikatehin-galat 22,5 $\pm$ 4,7 i 2,85 $\pm$ 2,72.

### **5.1.2. Bioraspoloživost polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom proteinima**

Svjetska zdravstvena organizacija (World Health organization-WHO) i organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih Naroda (Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO) 2007. godine definirali su preporučeni dnevni unos proteina koji iznosi 0,8 g proteina po kilogramu tjelesne mase čovjeka, što je otprilike 10% preporučenog dnevnog unosa energije. Prehrana obogaćena proteinima (više od 2-3 grama proteina po kilogramu tjelesne mase) često se preporuča kao dijeta koja se koristi za redukciju tjelesne mase i održavanje dobrog zdravlja. Rezultati različitih provedenih istraživanja (Journel *i sur.*, 2012; Kinsey-Jones *i sur.*, 2015; Santesso *i sur.*, 2012) dokazuju da povećanje unosa proteina u prehrani smanjuje ukupan unos energije, što dovodi do redukcije tjelesne mase.

Prednost proteina sirutke u odnosu na druge proteine je u brzjoj apsorpciji u crijevima, što u konačnici rezultira sintezom proteina koji izgrađuju mišiće (Mansour *i sur.*, 2013). Proteini sirutke se smatraju i izvorom aminokiselina, budući da sadrže do 26% aminokiselina razgranatog lanca-BCAA (valin, leucin, izoleucin), te L-arginina, L-lizina, L-glutamina, cisteina, laktoglobulina, laktozu, mineralne tvari i lipide u tragovima.

Ranija istraživanja koja su proučavala međureakciju polifenola i proteina, te njihov utjecaj na bioraspoloživost, opisala su minimalne učinke. Schramm *i sur.* (2003) proučavali su utjecaj međureakcije proteina i polifenola (katehina iz kaka) u ljudi. Utvrdili su da međureakcije proteina i polifenola pokazuju minimalne učinak na apsorpciju polifenola. U istraživanju koje su proveli *in vivo*, na ljudskim dobrovoljcima, Van het Hof *i sur.* (1998) utvrdili su da dodatak mlijeka u zeleni i crni čaj ne utječe na bioraspoloživost katehina. Osim navedenog, Serafini *i sur.* (1996) utvrdili su da čaj koji se konzumira bez mlijeka pokazuje smanjeni antioksidacijski potencijal u odnosu na čaj s mlijekom. Također je dokazano da vezanje polifenola na proteine ovisi o broju hidroksilnih skupina polifenola. Tako se tanini koji sadrže preko 12 hidroksilnih grupa vrlo snažno vežu za proteine tvoreći kompleks s proteinima prisutnim u slini što rezultira njihovom smanjenom apsorpcijom i bioraspoloživosti (Hasni *i sur.*, 2011; Kanakis *i sur.*, 2011).

Do sada objavljena istraživanja o utjecaju proteina na bioraspoloživost polifenola opisuju pozitivne i negativne učinke. Duarte i Farah (2011) smatraju da međureakcijom mliječnih sastojaka i polifenola iz kave u ljudi može dovesti do negativnih učinaka na bioraspoloživost. Ribnicky *i sur.* (2014) su proučavali bioraspoloživost polifenola iz biljke estragona (*Artemisia dracuncululus* L.) u miševa, u obliku čistog ekstrakta i u kombinaciji sa sojinim proteinima. Dobiveni rezultati ukazali su da se apsorpcija i bioraspoloživost polifenola povećava s istodobnom konzumacijom izolata soje. Nadalje, Mullen *i sur.* (2009) utvrdili su da mlijeko znatno smanjuje izlučivanje metabolita flavan-3-ola putem mokraće. Slično tome, dokazano je i da jogurt ima značajan utjecaj na izlučivanje fenolnih kiselina putem mokraće. Ukupno izlučivanje fenolnih kiselina mjerenih unutar 24 sata iznosilo je 62  $\mu$ mola nakon konzumacije čistog soka od naranče, dok je ukupno izlučivanje fenolnih kiselina nakon konzumacije soka od naranče u kombinaciji s jogurtom značajno pala na 9,3  $\mu$ mola (Roowi *i sur.*, 2009). Većina istraživanja opisani inhibitorni učinak mlijeka pripisuje mliječnim bjelancevinama koje s polifenolnim spojevima mogu tvoriti vodikove veze i hidrofobne međureakcije (Charlton *i sur.*, 2002; Fraizer *i sur.*, 2006). Također treba napomenuti da se u mlijeku nalaze i ostali makronutrijenti, kao što su ugljikohidrati i masti čiji se učinci ne mogu isključiti.

U istraživanju Zhanga *i sur.*, (2012) koji su proučavali bioraspoloživost polifenola u kombinaciji s isključivo mliječnim proteinima, utvrđeno je da mliječni proteini uzrokuju značajne promjene u kinetičkom profilu polifenola u plazmi štakora, ali nisu utjecali na ukupnu apsorpciju polifenola. Slično tome, uočeno je da mliječni proteini produžuju vrijeme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije polifenola u ljudskoj plazmi (Zhang *i sur.*,

2012). Kazein kao glavna komponenta mliječnih bjelančevina može u želudcu koagulirati čime se usporava proces želučanog pražnjenja, što izravno utječe na brzinu kojom se aminokiseline apsorbiraju u krvotok (Barth *i sur.*, 1990). Prema tome, smatra se da se polifenoli mogu vezati na mliječne proteine i oblikovati komplekse, stoga se rezultati *in vivo* istraživanja mogu objasniti formiranjem protein-polifenolnih kompleksa koji ostaju u želudcu kroz dulji vremenski period, čime se odgađa pojavljivanje polifenola u krv (Rawel *i sur.*, 2001; Dupas *i sur.*, 2006). Nadalje, što se tiče odsutnosti utjecaja na ukupnu apsorpciju polifenola, dokazano je da se polifenoli mogu otpustiti iz kompleksa i apsorbirati kasnije.

Kako je navedeno, dosadašnja istraživanja o utjecaju proteina na bioraspoloživost polifenola opisuju pozitivne i negativne učinke.

U ovom istraživanju u tankom crijevu skupine obrađene ekstraktom cvijeta trine u kombinaciji s proteinima sirutke je ukupno detektirano 25 polifenolnih spojeva, što je za dva spoja manje u odnosu na skupinu obrađene čistim vodenim ekstraktom cvijeta trine (ECT). Statistički značajno manji AUC ili  $c_{max}$  u tankom crijevu kod skupine ECT+P u odnosu na skupinu ECT uočen je za 12 spojeva polifenolnih spojeva ( $P < 0,05$ ) (Tablica 40, 41, 42, 43). Analizom rezultata jetre nije utvrđena razlika u broju detektiranih spojeva između skupina ECT+P i ECT. Od ukupno 26 detektiranih polifenolnih spojeva, statistički značajno manji AUC ili  $c_{max}$  utvrđen je za 8 spojeva u skupini ECT+P, dok je za 2 spoja uočen statistički značajno veći AUC ili  $c_{max}$  u odnosu na skupinu ECT ( $P < 0,05$ ) (Tablica 44, 45, 46, 47). U mozgu skupine ECT+P je ukupno detektiran 20 polifenolnih spojeva što je za dva spoja manje u odnosu na skupinu ECT. Statistički značajno manji AUC ili  $c_{max}$  uočen je za 11 spojeva u skupini ECT+P, dok je za jedan spoj uočen statistički značajno veći  $c_{max}$  u odnosu na skupinu ECT ( $P < 0,05$ ) (Tablica 48, 49, 50, 51). Analizom bubrega nisu uočene razlike u broju detektiranih polifenolnih spojeva. Od ukupno 12 detektiranih spojeva u bubregu, statistički značajno manji AUC ili  $c_{max}$  kod skupine ECT+P u odnosu na skupinu ECT, uočen je za 7 polifenolnih spojeva ( $P < 0,05$ ) (Tablica 52, 53, 55).

Iz navedenih rezultata može se zaključiti kako subkronični unos polifenola u kombinaciji s proteinima sirutke dovodi do statistički značajne promjene u bioraspoloživosti određenih polifenola. Iako za ostale vrste polifenola nije utvrđena statistički značajna promjena u farmakokinetičkim parametrima ( $c_{max}$ , AUC), iz rezultata ovog istraživanja jasno je vidljivo da velika većina detektiranih polifenola u gore navedenim organima u skupini ECT+P pokazuje dulji vremenski period za postizanje njihovih maksimalnih koncentracija, kao i

manji AUC što ukazuje na smanjenju izloženost polifenola u organu. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju ukazuju da proteini i određene skupine polifenola ostvaruju međureakcije koje se mogu odraziti na njihovu bioraspoloživost. Rezultati ovog istraživanja se mogu usporediti s gore opisanim istraživanjima kao i drugim radovima u kojima su korišteni drugi izvori polifenola.

### **5.1.3. Bioraspoloživost polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine u kombinaciji s prehranom obogaćenom mastima**

Lesser *i sur.*, (2004) istraživali su utjecaj prehrambene masti na bioraspoloživost kvercetina (30  $\mu\text{mol/kg}$  tjelesne težine) u svinja. Životinje su podijeljene u skupine, te hranjene obrocima koji su sadržavali kvercetin-3-*O*-glukozid i lipofilni aglikon kvercetina, a koji su se razlikovali u sadržaju masti (3,17 i 32 g masti/100 g obroka). Uzorci krvi, uzimani su nekoliko puta unutar 24 sata, te analizirani pomoću HPLC metode. Glavni metabolit pronađen u plazmi je uvijek bio konjugirani kvercetin. Bioraspoloživost kvercetina iz svake dijetete je uvijek bila veća kod glukozida u odnosu na aglikonski kvercetin. Bez obzira na primijenjeni kemijski oblik kvercetina, bioraspoloživost kvercetina bila je veća u prehrani od 17% masti u usporedbi s prehranom od 3% masti. U prehrani od 32% masti nije uočen daljnji učinak na bioraspoloživost kvercetina. Nadalje, također je uočeno da obrok bogat mastima i kvercetinom znatno produljuje vrijeme zadržavanja kvercetina u tijelu. Autori su zaključili da osim kemijske strukture flavonola, sadržaj masti također utječe na bioraspoloživost kvercetina.

Azuma *i sur.* (2002) utvrdili su da istodobnom primjenom lipida (sojino ulje, lecitin) i emulgatora kao što je žučni taurokolat dolazi do poboljšane i ubrzane crijevne apsorpcije kvercetina u štakora. U drugom istraživanju na štakorima, apsorpcija flavan-3-ola katehina također je poboljšana kada su katehini iz zelenog čaja primijenjeni kao fosfolipidni kompleksi u odnosu na slobodni katehin (Pietta *i sur.*, 1998). Smatra se da se u prisutnosti prehrambene masti kvercetin djelomično ugradio u mješovite micelle žučnih soli u lumenu duodenuma što je moglo potaknuti njegovu topljivost i prijenos kroz neprekinuti vodeni sloj i tako omogućiti pasivnu difuziju kroz četkaste membrane enterocita. Također je dokazano da dodatak 4%-tnog sojinog ulja u prehrani značajno povećava bioakumulaciju kvercetina u plazmi (Azuma *i sur.*, 2003).

Osim različitih udjela masti, procijenjeni su i učinci različitih vrsta masti na bioraspoloživost polifenola. Utvrđeno je da duljina lanca masnih kiselina utječe na micelarizaciju fenolnih



spojeva tijekom probave. Lesser *i sur.* (2006) istraživali su bioraspoloživost flavan-3-ola s masnim kiselinama srednjeg i dugog lanca u svinja. Rezultati su pokazali povećanu bioraspoloživost flavonola u kombinaciji s kiselinama srednjeg lanca za 38%, dok je s masnim kiselinama duljeg lanca povećana za 12%. Nadalje, utvrđeno je da stupanj zasićenosti također može utjecati na bioraspoloživost polifenola. Goltz *i sur.* (2012) utvrdili su povećanu apsorpciju karotenoida iz povrća u ljudi koja je konzumirana s većim koncentracijama masnoća, te da nezasićene masnoće povećavaju apsorpciju karotenoida u odnosu na zasićene masnoće.

U ovom istraživanju u tankom crijevu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji s kolesterolom (ECT+CHOL) je ukupno detektirano 26 polifenolnih spojeva, što je za jedan spoj manje u odnosu na skupinu obrađenu čistim vodenim ekstraktom cvijeta trnine (ECT). Statistički značajno manji AUC ili  $c_{\max}$  kod skupine ECT+CHOL u odnosu na skupinu ECT uočen je za 6 polifenolnih spojeva, dok je za 3 spoja uočen veći AUC ili  $c_{\max}$  ( $P < 0,05$ ) (Tablica 56, 57, 58, 59). Analizom rezultata broja detektranih polifenola u jetri između uspoređivanih skupina nije utvrđena razlika u broju detektiranih spojeva. Statistički značajno manji AUC ili  $c_{\max}$  u jetri utvrđen je za 6 spojeva u skupini ECT+CHOL, dok je za 3 spoja uočen statistički značajno veći AUC ili  $c_{\max}$  u odnosu na skupinu ECT ( $P < 0,05$ ) (Tablica 60, 61, 62, 63). U mozgu skupine ECT+CHOL je ukupno detektirano 20 polifenolnih spojeva što je za dva spoja manje u odnosu na skupinu ECT. Statistički značajno manji  $c_{\max}$  uočen je za 7 spojeva u skupini ECT+CHOL u odnosu na skupinu ECT ( $P < 0,05$ ) (Tablica 64, 65, 66, 67). Analizom bubrega nije uočena razlika u broju detektiranih polifenolnih spojeva. Od ukupno 12 detektiranih polifenolnih spojeva, statistički značajno manji AUC ili  $c_{\max}$  kod skupine ECT+CHOL u odnosu na skupinu ECT, uočen je za 5 polifenolnih spojeva ( $P < 0,05$ ) (Tablica 69, 70, 71).

Iz navedenih rezultata može se zaključiti da primjena polifenola u kombinaciji s kolesterolom utječe na bioraspoloživost određenih polifenola, a posljedica njihove bioraspoloživosti ovisi o otpuštanju polifenola iz kompleksa polifenol-kolesterol koji je pod utjecajem različitih čimbenika poput: strukture polifenola, složenosti strukture polifenol-kolesterol, te pristupačnosti enzima.

#### **5.1.4. Bioraspoloživost polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine u kombinaciji sa saharozom i njihova usporedba sa čistim ekstraktom**

U ovom istraživanju u tankom crijevu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u kombinaciji sa saharozom (ECT+CARB) su ukupno detektirana 23 polifenolna spoja, što je za četiri spoja manje u odnosu na skupinu obrađenu čistim vodenim ekstraktom cvijeta trnine (ECT). Statistički značajno manji AUC ili  $c_{\max}$  u tankom crijevu kod skupine ECT+CARB u odnosu na skupinu ECT uočeno je 22 polifenolna spoja ( $P < 0,05$ ) (Tablica 72, 73, 74, 75). Analizom rezultata jetre, u jetri su ukupno detektirana 24 polifenolna spoja što je za dva spoja manje u odnosu na skupinu ECT. Statistički značajno manji AUC ili  $c_{\max}$  utvrđen je za 8 spojeva u skupini ECT+CARB, dok je za 5 spojeva uočeno statistički značajno veći AUC ili  $c_{\max}$  u odnosu na skupinu ECT ( $P < 0,05$ ) (Tablica 76, 77, 78, 79). U mozgu skupine ECT+CARB je ukupno detektiran 21 polifenolni spoj što je za jedan spoj manje u odnosu na skupinu ECT. Statistički značajno manji  $c_{\max}$  uočeno je za 16 spojeva u skupini ECT+CARB u odnosu na skupinu ECT ( $P < 0,05$ ) (Tablica 80, 81, 82, 83). Analizom bubrega u skupini ECT+CARB je ukupno detektirano 10 spojeva što je za dva spoja manje u odnosu na skupinu ECT+CARB. Statistički značajno manji AUC ili  $c_{\max}$  kod skupine ECT+CARB u odnosu na skupinu ECT, uočeno je za 8 polifenolnih spojeva ( $P < 0,05$ ) (Tablica 84, 85, 87).

Poznato je da makronutrijenti iz hrane i želučana kiselina mogu imati izraženi učinak na metabolizam mnogih ksenobiotika. Schramm *i sur.* (2003) proveli su istraživanje učinka prehrane na apsorpciju i farmakokinetiku flavan-3-ola iz kaka u ljudi. Ljudski ispitanici su bili podijeljeni u 4 skupine, gdje je svaka grupa sadržavala po šest ljudi. Uzorci plazme analizirani su primjenom HPLC metode. Za razliku od grupe koja je konzumirala obroke obogaćene ugljikohidratima, grupe koje su konzumirale hranu obogaćenu lipidima i proteinima, te famotidinom (antiulkusni lijek iz skupine specifičnih blokatora H<sub>2</sub>-receptora koji sprječava stimulirano izlučivanje želučane kiseline i pepsina) dokazana je minimalna učinkovitost na apsorpciju flavan-3-ola. Na temelju  $c_{\max}$  i AUC vrijednosti, njihovi rezultati upućuju da se uzimanje flavan-3-ola može značajno povećati istodobnom konzumacijom hrane bogate ugljikohidratima. Slično istraživanje proveli su Neilson *i sur.* (2009). U njihovim *in vitro* i *in vivo* istraživanjima također je dokazano da prisutnost saharoze u čokoladi može pozitivno utjecati na bioraspoloživost spojeva iz skupine flavan-3-ola. Pojedina istraživanja pokušala su razjasniti mehanizam povezan s povećanjem bioraspoloživosti polifenola. Smatra se da su pozitivni učinci promatrani za hranu bogatu ugljikohidratima (kruh, saharoza, sok od grejpa) mogli biti posredovani ugljikohidratnim specifičnim učinkom na gastrointestinalnu

pokretljivost i/ili izlučivanje (Schramm *i sur.*, 2003). Uz povećanje apsorpcije flavan-3-ola iz kakaa, uočena je i njihova brža eliminacija iz organizma nakon unosa s hranom bogatom ugljikohidratima. Ovo tumačenje je u skladu s konceptom povećane tubularne sekrecije ksenobiotika s povećanom filtracijom otapala. Povećana filtracija može biti rezultat povećane koncentracije otopljenih tvari u krvi (ksenobiotika) i povećane brzine glomerularne filtracije (Schramm *i sur.*, 2003).

Osim utjecaja na apsorpciju, dokazano je da ugljikohidrati mijenjaju i kinetički profil polifenola u plazmi. Bub *i sur.* (2001) utvrdili su da je prosječno vrijeme potrebno za postizanje maksimalne koncentracije malvidin-3-glikozida u plazmi produljeno nakon unosa crvenoga soka od grožđa u odnosu na crveno vino u ljudi. Na temelju tog istraživanja istraživači su zaključili da je šećer glukoza prisutan u crvenom soku od grožđa u kompetitivnom odnosu s malvidin-glukozidom za prijenosnik glukoze (SGLT 1) ovisne o natriju. Viskoznost određenih vrsta ugljikohidrata također se ne mogu zanemariti. Dokazano je da se antocijanini u zakiseljenoj otopini zobenog brašna apsorbiraju i izlučuju sporije nego u zakiseljenoj vodi (Walton *i sur.*, 2009). Naime, dodavanje saharoze rezultira laganim odgađanjem postizanja maksimalne koncentracije u plazmi. Odgađanje djelomično može biti posljedica povećanja viskoznosti pod utjecajem saharoze (Peters *i sur.*, 2010). Dokazano je da su saharozni pripravci šest puta veće viskoznosti od pripravaka koje ne sadrže saharozu. Poznato je da povećana viskoznost ima utjecaj na pražnjenje želuca i može utjecati na kinetiku apsorpcije fenolnih spojeva u tankom crijevu (Marciani *i sur.*, 2000). S obzirom da se neekstrahirani proantocijanidini povezuju s matricama hrane, posebice s netopivim polimerima kao što su dijetalna vlakna, njihov apsorpcija može biti sporija u odnosu na ekstrahirane proantocijanidine. Sporija apsorpcija neekstrahiranih metabolita produljuje njihovu biodostupnost što može rezultirati njihovom učinkovitošću na ljudsko zdravlje (Mateos-Martín *i sur.*, 2012). Također, postoje brojni dokazi da ferulinska kiselina u međureakciji s arabinoksilanom produljuje vrijeme zadržavanja ferulinske kiseline u organizmu. Fenomen se može objasniti sporijom hidrolizom veza između fenola i staničnih stijenki pomoću crijevne mikroflore (Andreasen *i sur.*, 2001).

U ovom istraživanju statistički značajno veće vrijednosti uočene su samo u jetri i to za epigalokatehin-3-galat ( $c_{\max}=2,65 \mu\text{g/g}$ ) i kvercetin-acetil-heksozid ( $c_{\max}=2,17 \mu\text{g/g}$ ) koji su imali tri puta veću koncentraciju u skupini ECT+CARB u odnosu na ECT, te 4-*p*-kumaroil kininsku kiselinu ( $c_{\max}=8,07 \mu\text{g/g}$ ) čija je koncentracija bila čak šest puta veća u skupini

ECT+CARB u odnosu na skupinu ECT. Na osnovi broja detektiranih spojeva u tankom crijevu i jetri, vidljivo je da u skupini ECT+CARB tanko crijevo i jetra imaju sličan omjer apsorpcije, ali s većim postotkom polifenolnih spojeva koji imaju statistički značajno manju vrijednost farmakokinetičkih parametara (AUC,  $c_{max}$ ) u odnosu na skupinu ECT. Velik postotak statistički značajno manjih vrijednosti AUC i  $c_{max}$  vrijednosti polifenola zabilježen je i u mozgu, te bubrezima kod skupine ECT+CARB u odnosu na skupinu ECT što ukazuje na njihovu nisku apsorpciju tj. bioraspoloživost u kombinaciji sa saharozom.

## **5.2. Učinak polifenola u C57BL/6 miša na vrijednost biomarkera oksidacijskog stresa u različitim organima**

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

Višestruko nezasićene masne kiseline su često meta stvorenih slobodnih radikala. Ustanovljeno je da tkiva izložena oksidacijskom stresu brže ulaze u lipidnu peroksidaciju, a razlog veće peroksidabilnosti uključuje inaktivaciju, odnosno manjak antioksidacijskih mehanizama (Štefan *i sur.*, 2007). Kemijska modifikacija aminokiselina tijekom lipidne peroksidacije rezultira formiranjem lipooksidacijskih produkata koji služe kao biljezi oksidacijskog stresa *in vivo*. MDA reagira s proteinima krvnih žila npr. kolagenom i dovodi do promjena u njegovoj strukturi (Tiku *i sur.*, 2003).

Do sada objavljena istraživanja o polifenolima kao antioksidansima iznose brojne dokaze o njihovom pozitivnom učinku na razne organske sustave. Pozitivni učinci aronije i njenih proizvoda na biljege oksidacijskog stresa ispitivani su u malom broju dijetetskih intravenoznih istraživanja kod ljudi. Rezultati tih istraživanja potencijalno antioksidacijsko djelovanje baziraju upravo na smanjenju koncentracije MDA. Značajno smanjenje koncentracije MDA u serumu dokazano je nakon 8 tjedna unosa ekstrakta aronije kod ispitanika s metaboličkim sindromom (Broncel *i sur.*, 2010) kao i kod veslača koji su konzumirali sok od aronije prije izvođenja ergonometrijskog testa (Pilaczynska-Szczesniak *i sur.*, 2005).

Diamantini *i sur.* (2014) istraživali su utjecaj dvije različite sorte jagoda (Adria i Sveva) na toksičnost u štakora izazvanu doksorubicinom (DOX). Doksorubicin je drastično povećao

oštećenje DNA, lipidnu peroksidaciju i sadržaj mitohondrijskih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), te je značajno smanjio aktivnost antioksidacijskih enzima i mitohondrijske funkcije. Dva mjeseca nakon što su životinje obrađene sokom od jagoda, utvrđeno je značajno smanjenje oštećenja DNA i koncentracije ROS i značajno poboljšanje biljega oksidacijskog stresa, aktivnosti antioksidacijskih enzima i mitohondrijske performanse. Autori su zaključili da se unosom jagoda može utjecati na toksičnost izazvanu doksorubicinom, te da povećani unos jagoda ima potencijalne zdravstvene dobrobiti od oksidacijskog stresa *in vivo* (Diamanti *i sur.*, 2014). Sličan pad koncentracije MDA u jetri pronađen je i kod zdravih štakora koji su hranjeni prehranom bogatom polifenolima iz voća poput jagoda ili šljiva u usporedbi s kontrolnom grupom životinja (Mateos *i sur.*, 2005). Nadalje, Papandreou *i sur.* (2011), istraživali su učinak polifenola iz ekstrakta ploda divlje borovnice na kognitivnu sposobnost i oksidacijski status mozga u Balb/C miševima. Nakon sedmodnevne obrade, rezultati su pokazali da miševi obrađeni ekstraktom ploda borovnice pokazuju značajniju učinkovitost u učenju i pamćenju od kontrolne skupine životinja. Primjena ekstrakta također je rezultirala smanjenom koncentracijom MDA, te povećanom koncentracijom glutationa i askorbinske kiseline u mozgu obrađenih miševa.

U ovom istraživanju zapaženo je statistički značajno smanjenje vrijednosti MDA u sva četiri organa (jetra, bubreg, mozak i tanko crijevo) kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu 28. dana obrade, dok je kod mozga statistički značajno smanjenje vrijednosti MDA uočeno i 21. dana obrade ( $P < 0,05$ ) (Slika 99, 101, 103, 105). U odnosu na skupinu ECT statistički značajno povećanje vrijednosti MDA u mozgu zabilježeno je u skupinama ECT+P, ECT+CHOL i ECT+CARB, dok je u jetri statistički značajno povećanje vrijednosti zabilježeno u skupini ECT+CHOL ( $P < 0,05$ ) (Slika 102, 104). U odnosu na skupinu ECT+P, statistički značajno povećanje vrijednosti MDA utvrđeno je u homogenatima mozga i bubrega kod skupine obrađene proteinima sirutke (P) (Slika 104, 106).

U skladu s prethodnim istraživanjima, u ovom istraživanju, snižena razna MDA u homogenatima tkiva tankog crijeva, jetre, mozga i bubrega kod skupine koja je uz normalnu prehranu dobivala i ekstrakt cvijeta trnine dokazuje značajan pad lipidne peoksidacije u odnosu na kontrolnu skupinu životinja što ukazuje na antioksidacijski učinak polifenola prisutnih u ekstraktu cvijeta trnine.

Statistički značajno povećanje MDA u odnosu na skupinu ECT, uočeno je u mozgu kod skupina ECT+CHOL, ECT+CARB i ECT+P, te jetri kod skupine ECT+CHOL. U ovom istraživanju, skupina ECT+CHOL je uz ekstrakt cvijeta trnine primala i otopinu kolesterola otopljenog u suncokretovom ulju. Naime, poznato je da subkronični unos otopine kolesterola u suncokretovom ulju, primijenjen i u ovom istraživanju dovodi do hiperkolesterolemije i predstavlja ustaljeni model kod kojeg dolazi do povećane lipidne peroksidacije (Bulur *i sur.*, 1995). Pregledom literature, prethodnih istraživanja također je dokazano da hrana bogata kolesterolom povećava lipidnu peroksidaciju u miševima i kunićima, a za štakore su rezultati proturječni (Uysal *i sur.*, 1998; Gökkuşu i Mostafazadeh, 2003; Balkan *i sur.*, 2004; Aydin *i sur.*, 2009; Subramanian *i sur.*, 2011). Na temelju navedenog, povećanu lipidnu peroksidaciju u mozgu i jetri kod skupine ECT+CHOL u odnosu na skupinu ECT možemo pripisati subkroničnoj primjeni kolesterola.

U istraživanju koju su proveli Franke *i sur.* (2017) ispitivan je utjecaj velike konzumacije saharoze na razinu oštećenja DNA u krvi, hipokampusu i koštanoj srži štakora. Mužjaci Wistar štakora obrađeni su 4 mjeseca 10%-tnom otopinom saharoze prvih 60 dana, te 34%-tnom otopinom saharoze zadnjih 60 dana koja je bila otopljena u vodi za piće. Razine oštećenja DNA u krvi i hipokampusu procijenjene su primjenom komet testa. Rezultati njihova istraživanja ukazali su na da primjena visokih koncentracija saharoze uzrokuje povećani oksidacijski stres u hipokampusu i koštanoj srži štakora, međutim mehanizam toksičnosti saharoze u velikim koncentracijama još nije poznat. Gu *i sur.* (2008) proveli su istraživanje kako bi procijenili utjecaj prehrane obogaćene proteinima na ravnotežu proizvodnje slobodnih radikala i antioksidacijskog statusa u probavnim organima C57BL/6 miša. Miševi su podijeljeni u dvije skupine: skupina koja je imala normalni unos proteina (20%) te druga skupina s visokim unosom proteina (60%), uz dodatak 0,06 g/kg cisteina. Nakon dva tjedana, miševima su izmjereni antioksidacijski parametri u dvanaesniku, jetri i gušterači. Rezultati ukazuju kako se unosom hrane obogaćene proteinima značajno povećala koncentracija MDA i superoksidnog aniona, smanjila aktivnost SOD, glutation peroksidaze i katalaze te smanjio sadržaj reduciranog glutationa. Rezultati istraživanja pokazuju da unos hrane obogaćene proteinima može dovesti do promjene oksidacijsko/antioksidacijske ravnoteže i tako izazvati oksidacijski stres u probavnim organima miševa (Gu *i sur.*, 2008).

Na temelju navedenog, povećanu razinu lipidne peroksidacije u mozgu kod skupina ECT+CARB, ECT+P i P, te bubregu kod skupine P možemo pripisati subkroničnim primjenama saharoze i proteina sirutke, a maksimalno bioraspoložive koncentracije

polifenolnih spojeva u mozgu i bubrezima kod navedenih skupina nisu bile dostatne kako bi inducirani oksidacijski stres bio smanjen. Nadalje, dobiveni rezultati u ovom istraživanju odgovaraju prethodnim istraživanjima u kojima su procijenjeni učinci prehrane obogaćene ugljikohidratima (saharoza, fruktoza) i proteinima (proteini sirutke) tijekom višetjedne primjene na povećanje lipidine peroksidacije u mozgu pokusnih životinja (Jarukamjorn *i sur.*, 2016; Camiletti-Moirón *i sur.*, 2015).

Antioksidacijsko djelovanje polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine u organima miša istražena je i mjerenjem koncentracije karboniliranih proteina. Karbonilacija proteina je biokemijska promjena proteina kojom se uvode karbonilne grupe (C=O) u proteine. Uvođenje karbonilnih grupa u proteine nastaje kao posljedica izloženosti oksidacijskom stresu. Fizikalno-kemijske promjene koje nastaju kod karboniliranih aminokiselina uzrokuju gubitak identiteta aminokiselinskog bočnog lanca. Zbog ireverzibilne prirode takvih promjena, karbonilacija predstavlja najštetniji oblik oksidacijskog oštećenja proteina (Nystrom, 2007). Méndez *i sur.* (2014) proveli su istraživanje o utjecaju prehrane obogaćene mastima i saharozom na karbonilaciju proteina u Sprague-Dawley štakora kroz 22 tjedna. Rezultati njihova istraživanja ukazuju da dugotrajna prehrana mastima i saharozom povećava oksidaciju proteina i lipidnu peroksidaciju u jetri i plazmi štakora (Méndez *i sur.*, 2014). Slične rezultate o utjecaju visokosaharozne dijeta na povećanu karbonilaciju proteina u jetri i mozgu štakora dobiveni su i istraživanjem Potukuchi *i sur.* (2017a, 2017b).

Iz rezultata mjerenja koncentracije karboniliranih proteina uočeno je statistički značajno smanjenje u jetri, mozgu i bubregu životinja obrađenih ekstraktom cvijeta trnine u odnosu na kontrolnu skupinu ( $P < 0,05$ ) (Slika 132, 133, 134). Statistički značajno povećanje koncentracije proteinskih karbonila u odnosu na skupinu ECT uočeno je u jetri i bubregu kod skupina ECT+P, ECT+CHOL i ECT+CARB, te mozgu kod skupina ECT+P i ECT+CHOL (Slika 132, 134). Analizom rezultata koncentracije karboniliranih proteina u tankom crijevu nisu zapažene statistički značajne razlike.

Rezultati statistički značajno smanjenih vrijednosti koncentracija karboniliranih proteina u jetri, mozgu i bubregu kod skupine ECT u odnosu na kontrolnu skupinu upućuju na zaštitno djelovanje polifenola ekstrakta cvijeta trnine. Ovi rezultati su u skladu s prethodno navedenim istraživanjima. Na temelju proučene literature, povećanu razinu karbonilacije proteina u mozgu kod skupina ECT+P i ECT+CHOL, te jetri i bubregu kod skupine ECT+P, ECT+CHOL i ECT+CARB također možemo pripisati subkroničnom unosu saharoze i

proteina sirutke gdje maksimalno bioraspoložive koncentracije polifenolnih spojeva u mozgu, bubrezima i jetri kod navedenih skupina nisu bile dostatne kako bi inducirana karbonilacija proteina bila smanjena.

Reaktivni radikali kisika (ROS) stvaraju se tijekom različitih patoloških procesa u povećanim koncentracijama. Međutim, mehanizmi antioksidacijske zaštite, uključujući različite antioksidacijske enzime, sprječavaju oštećenja tkiva i druge komplikacije povezane s ROS-om. Antioksidacijska zaštita je važna u uklanjanju slobodnih radikala jer osigurava maksimalnu zaštitu bioloških mjesta kao što su tiolne skupine koje su dio aktivnih mjesta u nekim metabolizirajućim enzimima. Dobar antioksidans specifično potiskuje slobodne radikale, kelira redoks-metale, međusobno djeluje s drugim antioksidansima unutar antioksidacijske mreže, lako se apsorbira, ima fiziološki relevantnu koncentraciju u tkivima i biološkim tekućinama, te djeluje i u vodenim i/ili membranskim domenama (Valko *i sur.*, 2006). Polifenolni spojevi, koji se javljaju u izobilju u prehrambenim izvorima kao što su voće, povrće, čaj i vino, mogu imati važnu ulogu u jačanju antioksidacijskog djelovanja (Pandey i Rizvi, 2009b).

Zahvaljujući cisteinu koji sadrži tiolnu skupinu, glutation je važan unutarstanični neenzimski oksidans koji sudjeluje u prijenosu aminokiselina kroz plazmatsku membranu, izravno čisti singletni kisik i hidroksilni radikal te time detoksificira vodikov peroksid i lipidne perokside katalitičkim djelovanjem glutation peroksidaze (GPx). Glutation je obilatno prisutan u citosolu (1-11 mM), jezgrama (3-15 mM) i mitohondrijima (5-11 mM) te je glavni topljivi antioksidans u staničnim odjeljcima. Unutarstanični sadržaj glutationa ovisi o čimbenicima okoliša i funkcionira kao ravnoteža između njegova korištenja i brzine sinteze GSH (Valko *i sur.*, 2006).

U ovom istraživanju zapaženo je statistički značajno povećana vrijednosti GSH u tankom crijevu, jetri, mozgu i bubregu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu 28. dana obrade, dok je kod jetre i mozga statistički značajno povećanje vrijednosti GSH uočeno i 21. dana obrade ( $P < 0,05$ ) (Slika 107, 109, 111, 113). U odnosu na skupinu ECT, statistički značajno povećane vrijednosti GSH zabilježene su u mozgu i jetri kod skupina ECT+CHOL i ECT+P, dok su u tankom crijevu zabilježene statistički značajno manje vrijednosti u skupinama ECT+P, ECT+CHOL i ECT+CARB (Slika 108, 111, 113). Također statistički značajno niže vrijednosti GSH u odnosu na odgovarajuću



kombinaciju s ekstraktom cvijeta trnine zapažene su u jetri kod skupina CHOL i CARB, bubregu kod skupine CARB i mozgu kod skupina CARB, CHOL i P (Slika 110, 112, 114).

Iz navedenih rezultata povećane koncentracije GSH kod skupine koja je primala ekstrakt cvijeta trnine može se zaključiti da ekstrakt cvijeta trnine (bogat polifenolima) posjeduje pozitivan utjecaj na antioksidacijski sustav tankog crijeva, jetre, mozga i bubrega na način da doprinosi povećanju sinteze koncentracije glutaciona, spoja koji kontrolira redoks stanje u stanicama. Slično istraživanje proveli su Nardi *i sur.* (2016) koji su istraživali i uspoređivali protuupalno i antioksidacijsko djelovanje ekstrakta goji bobica, borovnice i brusnica na miševima. Miševi su obrađeni 10 dana s 50 i 200 mg/kg ekstrakta. Antioksidacijsku aktivnost odredili su ispitivanjem koncentracija GSH i katalaze. U sve tri biljke zabilježena je veća količina fenolnih spojeva (uključujući i rutin). Koncentracija GSH i CAT bila je najveća u skupini koja je dobivala goji bobice, a najniža u skupini koja je dobivala borovnice. Autori su donijeli dva zaključka: bobičasto voće posjeduje protuupalno i antioksidacijsko djelovanje, te da goji bobice, borovnice i brusnica moduliraju upalne procese na različite načine.

Kao što je navedeno u rezultatima ovog istraživanja, statistički značajno povišene koncentracije GSH uočene su u jetri i mozgu kod skupina ECT+CHOL i ECT+P. S obzirom da je u navedenim organima u tim skupinama uočena i statistički povišena vrijednost lipidne peroksidacije i karboniliranih proteina, povećanu sintezu glutaciona možemo pripisati kao posljedicu povećane vrijednosti oksidacijskog stresa za čije je uklanjanje odgovoran glutation. Statistički značajno manja vrijednost GSH u odnosu na skupinu ECT uočena i je u tankom crijevu kod skupina ECT+P, ECT+CARB i ECT+CHOL. Budući da u tankom crijevu nije uočena statistički povišena vrijednost lipidne peroksidacije, antioksidacijski sustav nije inducirao povećanu sintezu glutaciona. Osim navedenog, ukoliko je i inducirana lipidna peroksidacija u tankom crijevu kod navedenih skupina, bioakumulacija polifenolnih spojeva je u navedenom organu bila najveća, stoga je mogla učinkovito i ukloniti nastale lipidne perokside. Statistički značajno niže vrijednosti GSH u odnosu na odgovarajuću kombinaciju s ekstraktom cvijeta trnine zapažene su u jetri kod skupina CHOL i CARB, bubregu kod skupine CARB i mozgu kod skupina CARB, CHOL i P. S obzirom na gore navedena istraživanja o utjecaju visokih unosa saharoze, proteina sirutke i kolesterola na biomarkere oksidacijskog stresa, smanjenja koncentracija GSH u navedenim organima može biti posljedica velikog trošenja GSH u antioksidacijskog zaštiti od nastalih slobodnih radikala.

Kako bi se postigao osnovni cilj enzimskog antioksidacijskog sustava, a to je sprječavanje oksidacijskih oštećenja, enzimska kaskada mora biti vrlo dobro usklađena i regulirana. Ključan enzim enzimske kaskade je superoksid dismutaza (SOD) koja svojom aktivnošću uklanja superoksidni radikal i prevodi ga u vodikov peroksid.

Analizom rezultata enzimske aktivnosti superoksid dismutaze uočeno je statistički značajno povećanje vrijednosti enzimske aktivnosti u sva četiri organa (jetra, bubreg, mozak i tanko crijevo) kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu 28. dana obrade, dok je u jetri i bubregu statistički značajno povećanje enzimske aktivnosti uočeno i 14. dana obrade ( $P < 0,05$ ) (Slika 115, 117, 119, 121). Statistički značajno povećanje u odnosu na skupinu ECT zapaženo je u jetri kod skupine ECT+P, tankom crijevu kod skupina ECT+P i ECT+CHOL, dok je u bubregu kod skupine ECT+P uočena statistički niža vrijednost ( $P < 0,05$ ) (Slika 116, 118, 122). Također statistički snižena vrijednost enzimske aktivnosti u odnosu na odgovarajuću kombinaciju s ekstraktom cvijeta trnine uočena je u jetri kod skupine CHOL i mozgu kod skupine CARB (Slika 118, 120). Nadalje, statistički povišena vrijednost enzimske aktivnosti u odnosu na odgovarajuću kombinaciju s ekstraktom cvijeta trnine zapažena u bubregu kod skupine CHOL i tankom crijevu kod skupine P ( $P < 0,05$ ) (Slika 115, 121).

Rezultati sve većeg broja istraživanja podupiru povećanje enzimske aktivnosti superoksid dismutaze inducirane unosom polifenola. U ovom istraživanju, iz navedenih rezultata povećane koncentracije SOD-a kod skupine koja je primala ekstrakt cvijeta trnine može se zaključiti da ekstrakt cvijeta trnine doprinosi povećanju enzimske aktivnosti superoksid-dismutaze u tkivima tankog crijeva, jetre, mozga i bubrega. Jin i Yin (2012) istražili su antioksidacijski utjecaj polifenola iz listova biljke bambusa na proces starenja miševa uzrokovan D-galaktozom. Tri skupine miševa obrađene su ekstraktom lista u dozama od 20, 40 i 80 mg/kg tjelesne težine. Antioksidacijski status miševa mjeren je određivanjem aktivnosti SOD, GSH-Px, katalaze i ukupne antioksidacijske aktivnosti ORAC metodom. U usporedbi s kontrolnom skupinom, u skupinama obrađenim ekstraktom lista utvrđena je statistički značajno povećana aktivnost SOD, GSH, CAT u serumu, jetri i mozgu, te smanjeni udio MDA. Slično istraživanje proveli su i Bao *i sur.* (2018) koji su također ispitali utjecaj polifenola iz cvjetova i listova biljke božura na oksidacijski stres u mozgu miševa uzrokovan D-galaktozom. U rezultatima njihova istraživanja također je uočeno statistički značajno povećana aktivnost SOD i GSH u jetri i mozgu pokusnih životinja, te smanjena koncentracija lipidne peroksidacije i karboniliranih proteina.

Iako u jetri kod skupine ECT+P nije uočena statistički značajno veća vrijednost lipidne peroksidacije uočena je statistički značajno povišena vrijednost koncentracije karboniliranih proteina što za posljedicu može dodatno aktivirati povećanu enzimsku aktivnost superoksid dismutaze. S obzirom da u tankom crijevu nisu uočene statistički značajno povećane vrijednosti lipidne peroksidacije i karbonilacije proteina, povećana enzimsku aktivnost superoksid-dismutaze u tankom crijevu kod skupina može biti posljedica povećane bioakumulacije polifenolnih spojeva.

Analizom rezultata enzimske aktivnosti katalaze uočeno je statistički značajno povećanje vrijednosti enzimske aktivnosti u jetri i bubregu kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu 28. dana obrade (Slika 125, 129). U odnosu na skupinu ECT, statistički značajno smanjenje enzimske aktivnosti katalaze zapaženo je u jetri i bubrezima kod ECT+P, ECT+CHOL i ECT+CARB (Slika 126, 130). Statistički značajno smanjena enzimsku aktivnost katalaze zapažena je i u jetri kod skupina CARB i CHOL u odnosu na skupine ECT+CARB i ECT+CHOL (Slika 126). Analizom rezultata enzimske aktivnosti katalaze u tankom crijevu i mozgu nisu uočene statistički značajne vrijednosti.

S obzirom da je u jetri i bubrezima kod skupina ECT+P, ECT+CHOL i ECT+P uočen statistički značajan porast lipidne peroksidacije i karboniliranih proteina, razlog statistički smanjene koncentracije katalaze u odnosu na skupinu ECT možemo pripisati njezinoj ulozi u uklanjanju nastalog vodikovog peroksida u uvjetima oksidacijskog stresa. Statistički značajno smanjena enzimsku aktivnost katalaze u jetri kod skupina CARB i CHOL u odnosu na skupine ECT+CARB i ECT+CHOL, također možemo pripisati povećanoj vrijednosti lipidne peroksidacije i karbonilacije proteina. Analizom rezultata vrijednosti katalaze u tankom crijevu i mozgu nisu uočene statistički značajne vrijednosti. S obzirom da tanko crijevo i mozak sadrže male količine katalaze, pretpostavlja se da katalaza ne sudjeluje u antioksidacijskog obrani neurona i enterocita.

### **5.3. Učinak polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine na vrijednost antioksidacijskog kapaciteta u različitim organima C57BL/6 miša**

S obzirom da je u ovom radu istražena biorasploživost polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine, kao i biorasploživost polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine u kombinaciji s proteinima sirutke, kolesterolom i saharozom, ispitan je antioksidacijski kapacitet u organima tankog crijeva, jetre, bubrega i mozga primjenom FRAP i ABTS metode.

U *in vitro* uvjetima, zbog malog redoks-potencija i sposobnosti da doniraju elektrone i atome vodika dokazano je da su polifenoli jaki antioksidansi (Bors *i sur.*, 2001). Mnogobrojnim istraživanjima je utvrđeno da dodavanje polifenola ili ekstrakta bogatog polifenolima u ljudsku plazmu ili lipoproteine učinkovito štite endogene lipide i proteine od oksidacije. Tako primjerice ekstrakt jabuke učinkovito odgađa oksidaciju  $\alpha$ -tokoferola i stvaranje lipidnih hidroperoksida u ljudskoj plazmi (Lotito i Frei, 2004). U istraživanju Goméza *i sur.* (2007) dokazano je da *m*-kumarinska i dihidroferulinska kiselina, glavni metaboliti klorogenske kiseline u debelom crijevu imaju visoku antioksidacijsku aktivnost (Gómez-Ruiz *i sur.*, 2007). Pinacho *i sur.* (2015) proveo je kvantifikaciju polifenolnih spojeva iz različitih dijelova biljke trnine (stabljika, lišće, plod) i utjecaj *in vitro* probave na njihov antioksidacijski kapacitet. Antioksidacijski kapacitet određen je DPPH metodom. U usporedbi s drugim ekstraktima, etanolni, etil-acetatni i vodeni ekstrakti pokazali su najveći antioksidacijski kapacitet, a fitokemijskom analizom utvrđena je prisutnost flavonoida, kumarina i fenolnih kiselina. Etanolni ekstrakt grane bio je podvrgnut *in vitro* probavi. Probava u usnoj šupljini i želudcu nije utjecala na kvalitativni sastav fenolnih spojeva. Međutim, simulacija probave u crijevima značajno je promijenila kvantitativan i kvalitativan sastav nativnog etanolnog ekstrakta.

*In vivo* istraživanjem također je dokazano da fenolni spojevi nakon dugotrajnog unosa mogu povećati antioksidacijski kapacitet plazme (Prior *i sur.*, 2007; Crozier *i sur.*, 2009; Fernandez-Panchon *i sur.*, 2008). Ovaj je učinak uočen kod mnogih prehrambene proizvoda poput čaja, crnog vina i soka od jabuka za koji je poznato da sadrže velike količine polifenola. Porast od 18% u antioksidacijskoj aktivnosti plazmi opaženo je i nakon unosa 100 g tamne čokolade (Serafini *i sur.*, 2003). Zbog povećane antioksidacijske aktivnosti u plazmi, pokazalo se da potrošnja polifenola s masnom hranom smanjuje lipidne hidroperoksidi u plazmi. Natella *i sur.* (2002a, 2000b) dokazali su da unosom masne hrane i krumpira uz dodatak 300 mg polifenola dovodi do 1,5 puta manje koncentracije lipidnih hidroperoksida u ljudskoj plazmi. Plazma štakora hranjenih kvercetinom također je pokazala veći antioksidacijski kapacitet u odnosu na kontrolnu skupinu životinja što ukazuje da pojedini metaboliti kvercetina zadržavaju sposobnost antioksidacijskog djelovanja (Da Silva *i sur.*, 1998).

U ovom *in vivo* istraživanju kao bogat izvor polifenola korišten je vodeni ekstrakt cvijeta trnine. Prednosti upotrebe tekućih ekstrakata su: isti omjer aktivnih spojeva u početnom materijalu i pripravku za upotrebu, doziranje te zadržavanje hlapivih komponenata u ekstraktu (Redchenkova i Khiskova, 2006). Istraživanjem Marchelak *i sur.* (2017) dokazano je da ekstrakt cvijeta trnine sadrži visoku koncentraciju ukupnih fenola (584,07 mg/g suhog cvijeta

trnine), a vrlo visok antioksidacijski kapacitet dokazan je primjenom ABTS, DPPH i FRAP metode. Nadalje, Marchelak *i sur.* (2017) također su dokazali da primjena *in vivo* ekstrakta cvijeta trnine u ljudi učinkovito djeluje na povećanje antioksidacijskog kapaciteta ljudske plazme, te smanjenu koncentraciju 3-nitrotirozina i lipidnih peroksida u plazmi čije je oštećenje prouzročeno djelovanjem peroksinitrita.

Analizom rezultata antioksidacijskog kapaciteta FRAP metodom uočena je statistički značajno povećana vrijednost antioksidacijskog kapaciteta u tkivima tankog crijeva, jetre i bubrega kod skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (Slika 135, 139, 147). U odnosu na skupinu ECT, statistički povećana vrijednost uočena je tankom crijevu kod skupine ECT+CHOL, te bubrezima kod skupine ECT+P ( $P<0,05$ ) (Slika 137, 149). Statistički značajno smanjenje vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na skupinu ECT uočeno je u jetri i mozgu kod skupina ECT+CHOL i ECT+CARB ( $P<0,05$ ) (Slika 141, 145). Prilikom usporedbe antioksidacijske aktivnosti skupina P, CHOL i CARB u odnosu na njihovu kombinaciju s ekstraktom cvijeta trnine, statistički značajno povećana vrijednost uočena je u tankom crijevu kod skupina ECT+CHOL ( $P<0,05$ ) (Slika 137). Statistički značajno manja vrijednost uočena je u tankom crijevu kod skupine CARB, te bubregu u skupini CARB, CHOL i P ( $P<0,05$ ) (Slika 137, 149).

Analizom rezultata antioksidacijskog kapaciteta metodom ABTS uočena je statistički značajno povećana vrijednost antioksidacijskog kapaciteta u tkivima tankog crijeva i jetre, kod skupine ECT u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (Slika 136, 140). Povećana vrijednost antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom u odnosu na kontrolnu skupinu vidljiva je i u bubrezima i mozgu kod skupine ECT, međutim bez statistički značajnih razlika (Slika 144, 148). U odnosu na skupinu ECT, statistički značajno manja vrijednost uočena je u jetri kod skupina ECT+CHOL, ECT+CARB i ECT+P, dok je u bubregu uočeno statistički značajno povećanje kapaciteta kod skupine ECT+P (Slika 142, 146). U tankom crijevu i mozgu nisu uočene statistički značajne razlike između istraživanih skupina. Prilikom usporedbe antioksidacijske aktivnosti skupina P, CHOL i CARB ABTS metodom u odnosu na kombinaciju s ekstraktom cvijeta trnine, statistički značajno manja vrijednost uočena je u mozgu i bubregu kod skupine P, te bubregu kod skupine CARB (Slika 146, 150). U jetri i tankom crijevu nisu uočene statistički značajne razlike.

Bez obzira na nepostojanje statistički značajne razlike u antioksidacijskom kapacitetu istog organa između uspoređivanih skupina izmjerenih FRAP i ABTS metodom dobiveni podatci

navode na postojanje sličnog obrasca promjene antioksidacijskog kapaciteta. Naime, vrijednost antioksidacijske aktivnosti pojedinačnih polifenolnih tvari razlikuju se kod svake metode. Razlog tome je što su kod različitih metoda korišteni različiti slobodni radikali. Kod ABTS metode korišteni radikalni monokation  $ABTS\bullet^+$  posjeduje slabu selektivnost u reakcijama s donorima vodika, jer reagira s bilo kojim aromatskim spojem koji sadrži hidroksilnu skupinu, bez obzira na njegov stvarni antioksidacijski potencijal (Campos i Lissi, 1997; Arts *i sur.*, 2003; Roginsky i Lissi, 2005). Kod FRAP metode rezultati mogu varirati ovisno o trajanju reakcije, iz razloga što različiti antioksidansi zahtijevaju različito reakcijsko vrijeme za detekciju (Shahidi i Zhong, 2007).

Iz dobivenih rezultata FRAP i ABTS metodom može se zaključiti da svaki od prisutnih polifenola u analiziranim organima kod skupine ECT u odnosu na kontrolnu skupinu posjeduje određena antioksidacijska svojstva koja se očituju ne samo kroz izmjerene biomarkere oksidacijskog stresa već i povećanjem antioksidacijskog kapaciteta. Ovi rezultati su u skladu s dobivenim vrijednostima bioapsorbiranih koncentracija između kontrolne skupine i skupine obrađene ekstraktom cvijeta trnine. Statistički značajno povećanje antioksidacijskog kapaciteta u bubrezima kod skupina ECT+CHOL i ECT+P, te tankom crijevu kod skupine ECT+CHOL možemo pripisati interakciji polifenola i proteina, odnosno polifenola i kolesterola koji produžuju vrijeme za postizanje njihovih maksimalnih koncentracija. Nadalje, statistički značajno manju vrijednost antioksidacijskog kapaciteta u jetri izmjerenog ABTS metodom kod skupina ECT+P, ECT+CHOL i ECT+CARB u odnosu na skupinu ECT možemo pripisati smanjenoj koncentraciji ukupno bioapsorbiranih polifenolnih spojeva što je i dokazano u rezultatima ovog istraživanja.

## 6. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata možemo izvesti sljedeće zaključke:

1. Subkroničnom primjenom vodenog ekstrakta cvijeta trnine povećava se bioakumulacija polifenolnih spojeva u tkivu tankog crijeva, jetre, mozga i bubrega.
2. Tanko crijevo, jetra, mozak i bubreg pokazuju selektivnu prednost za bioakumulacijom i zadržavanjem pojedinih molekula polifenola iz skupine flavonola, flavona, flavan-3-ola i fenolnih kiselina.
3. Najviše bioakumulirane koncentracije polifenolnih spojeva u tankom crijevu utvrđene su za 3-*O*-kafeoil kininsku kiselinu, kampferol-pentozid i (-)-epikatehin, jetri, kvercetin-3-rutinozid i kvercetin-pentozid, mozgu, epigalokatehin-3-galat i kvercetin-ramnozid i bubregu za (-)-epikatehin i kvercetin-3-*O*-rutinozid.
4. Subkronični unos ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke produljuje vremenski period postizanja maksimalnih koncentracija polifenola, te ukazuje na smanjenu bioraspoloživost polifenola u organizmu.
5. Subkronični unos ekstrakta cvijeta trnine i kolesterola smanjuje bioraspoloživost flavan-3-ola u mozgu.
6. Subkronični unos ekstrakta cvijeta trnine i saharoze smanjuje kinetiku apsorpcije polifenola u tankom crijevu, te smanjuje njihovu bioraspoloživost u organizmu.
7. Polifenoli ekstrakta cvijeta trnine i njihovi metaboliti u skupini obrađenoj ekstraktom cvijeta trnine u odnosu na kontrolnu skupinu smanjuju oksidacijski stres i aktiviraju enzime uključene u antioksidacijski sustav obrane. Navode temeljimo na:
  - statistički značajno smanjenoj koncentraciji MDA u tankom crijevu, jetri, mozgu i bubregu ( $P < 0,05$ )
  - statistički značajno smanjenoj koncentraciji karboniliranih proteina u jetri, mozgu i bubregu ( $P < 0,05$ )
  - statistički značajno povećanoj koncentraciji GSH u tankom crijevu, jetri, mozgu i bubregu ( $P < 0,05$ )
  - statistički značajno povećanoj enzimskoj aktivnosti SOD-a u tankom crijevu, jetri, mozgu i bubregu ( $P < 0,05$ )

- statistički značajno povećanoj enzimskoj aktivnosti katalaze u jetri i bubregu ( $P < 0,05$ )
8. Polifenoli ekstrakta cvijeta trnine povećavaju antioksidacijski kapacitet tkiva tankog crijeva, jetre, mozga i bubrega.
  9. Subkronični unos ekstrakta cvijeta trnine i proteina sirutke, te ekstrakta cvijeta trnine i kolesterola uzrokuje povećani antioksidacijski kapacitet tkiva tankog crijeva i bubrega.



## 7. LITERATURA

1. Adam A, Crespy V, Levrat-Verny MA, Leenhardt F, Leuillet M, Demigné C, Rémésy C (2002) The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *The Journal of Nutrition* 132: 1962–1968.
2. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105:121–126.
3. Alarcón R, Pardo-de-Santayana M, Priestley C, Morales R, Heinrich M (2015) Medicinal and local food plants in the south of Alava (Basque Country, Spain). *Journal of Ethnopharmacology* 24(176): 207-224.
4. Andreasen MF, Kroon PA, Williamson G, Garcia-Conesa MT (2001) Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5679–5684.
5. Anderson ØM, Jordheim M (2006) The anthocyanins. U: *Flavonoids: Chemistry, biochemistry and Applications* (Anderson ØM, Markham KR, ured.), CRC Press, Boca Raton, 471–551.
6. Arora A, Nair MG, Strasburg GM (1998) Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radical Biology and Medicine* 24:1355–1363.
7. Arteel GE, Sies H (1999) Protection against peroxynitrite by cocoa polyphenol oligomers. *FEBS Letters* 462:167–170.
8. Arts MJTJ, Haenen GRMM, Wilms LC, Beetstra SAJN, Heijnen CGM, Voss HP, Bast A (2002) Interactions between flavonoids and proteins: Effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:1184–1187.
9. Arts MJTJ, Dallinga JS, Voss HP, Haenen GRMM, Bast A (2003) A critical appraisal of the use of antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. *Food Chemistry* 80: 409–414.
10. Arts IC, Hollman PC (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 81: 317–325.
11. Arts IC, Sesink AL, Faassen-Peters M, Hollman PC (2009) The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides. *Journal of Nutrition* 91: 841–847.
12. Ashor AW, Siervo M, Lara J, Oggioni C, Mathers JC (2014) Antioxidant vitamin supplementation reduces arterial stiffness in adults: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *The Journal of Nutrition* 144(10): 1594–602.

13. Aura AM (2008) Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemistry Reviews* 7(3): 407–429.
14. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (6): 360438
15. Aydin S, Uzun H, Sozer V, Altug T (2009) Effects of atorvastatin therapy on protein oxidation and oxidative DNA damage in hypercholesterolemic rabbits. *Pharmacological Research* 59: 242–247.
16. Azuma K, Ippoushi K, Ito H, Horie H, Terao J (2003) Enhancing effect of lipids and emulsifiers on the accumulation of quercetin metabolites in blood plasma after the short-term ingestion of onion by rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67: 2548–2555.
17. Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM (2004) Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicology in Vitro* 18(5): 555–61.
18. Azuma K, Ippoushi K, Ito H, Higashio H, Terao J (2002) Combination of lipids and emulsifiers enhances the absorption of orally administered quercetin in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1706–1712.
19. Balkan J, Dođru-Abbasođlu S, Aykaç-Toker G, Uysal M (2004) The effect of a high cholesterol diet on lipids and oxidative stress in plasma, liver and aorta of rabbits and rats. *Nutrition Research* 24: 229–234.
20. Balasundram N, Sundram K, Samman S (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-product: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99: 191–203.
21. Bao Y, Qu Y, Li J, Li Y, Ren X, Maffucci KG, Li R, Wang Z, Zeng R (2018) In Vitro and In Vivo Antioxidant Activities of the Flowers and Leaves from *Paeonia rockii* and Identification of Their Antioxidant Constituents by UHPLC-ESI-HRMS<sup>n</sup> via Pre-Column DPPH Reaction. *Molecules* 23(2): 392.
22. Barras A, Mezzeti A, Richard A, Lazzaroni S, Roux S, Melnyk P, Betbeder D, Monfilliette-Dupont N (2009) Formulation and characterization of polyphenol-loaded lipid nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics* 379: 270–277.
23. Barrington R, Williamson G, Bennett RN, Davis BD, Brodbelt JS, Kroon PA (2009) Absorption, conjugation and efflux of the flavonoids, kaempferol and galangin, using the intestinal CACO-2/TC7 cell model. *Journal of Functional Foods* 1:74–87.
24. Barros L, Carvalho AM, Sá Morais J, Ferreira ICFR (2001) Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: detailed characterization in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry* 120 (1): 247–254.

25. Barth CA, Pfeuffer M, Scholtissek J (1990) Animal models for the study of lipid metabolism, with particular reference to the Gottingen minipig. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* S20: 39–49.
26. Beattie SD (2006) Bioenergetics and oxidative metabolism. U: *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 6. izd., (Devlin, TM, ured.), Wiley-Liss, New York, str. 978-989.
27. Béduneau A, Tempesta C, Fimbel S, Pellequer Y, Jannin V, Demarne F, Lamprecht A (2014) A tunable Caco-2/HT29-MTX co-culture model mimicking variable permeabilities of the human intestine obtained by an original seeding procedure. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 87: 290-298.
28. Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power" the FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70–76.
29. Berker KI, Güçlü K, Tor I, Apak R (2007) Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta* 72(3): 1157–65.
30. Betteridge DJ (2000) What is oxidative stress? *Metabolism* 49: 3–8.
31. Bilia AR, Giomi M, Innocenti M, Gallori S, Vincieri FF (2008) HPLC–DAD–ESI–MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 46: 463–70.
32. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012) Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal* 5 (1): 9–19.
33. Blumenthal M, Busse WR (1998) *The Complete German Commission E monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines*. Austin, TX: The American Botanical Council.
34. Bohn T (2014) Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews* 7: 429–452.
35. Bolli A, Marino M, Rimbach G, Fanali G, Fasano M, Ascenzi P (2010) Flavonoid binding to human serum albumin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 398: 444–449.
36. Bondonno NP, Bondonno CP, Rich L, Mas E, Shinde S, Ward NC, Hodgson JM, Croft KD (2016). Acute effects of quercetin-3-O-glucoside on endothelial function and blood pressure: A randomized dose-response study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 104(1): 97–103.
37. Borkowski B, Lutomski J, Skrzydlewska E, Zygmunt B (1994) *Rosliny lecznicze w fitoterapii*, IRiPZ, Poznan, 470–471.

38. Bouayed J, Bohn T (2010) Exogenous antioxidants-Double-edged swords in cellular redox state. Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 3: 228–237.
39. Boulton DW, Walle UK, Walle T (1998) Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 50(2): 243–9.
40. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M (1990) Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology* 186: 343–355.
41. Bors W, Michel C, Stettmaier K (2001) Structure–activity relationships governing antioxidant capacities of plant polyphenols. *Methods in Enzymology* 335: 166–180.
42. Broncel M, Kozirog M, Duchnowicz P, Koter-Michalak M, Sikora J, Chojnowska-Jeziarska J (2010) *Aronia melanocarpa* extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome. *Medical Science Monitor* 16(1): CR28–34.
43. Bub A, Watzl B, Heeb D, Rechkemmer G, Briviba K (2001) Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice. *European Journal of Nutrition* 40: 113–120.
44. Bukan N, Sancak B, Yavuz O, Koca C, Tutkun F, Ozçelikay AT, Altan N (2003) Lipid peroxidation and scavenging enzyme levels in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 40: 447–450.
45. Bulotta S, Celano M, Lepore SM, Montalcini T, Pujia A, Russo D (2014) Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases. *Journal of Translational Medicine* 12: 219.
46. Bulur H, Özdemirler G, Öz B, Toker G, Öztürk M, Uysal M (1995) High cholesterol diet supplemented with sunflower seed oil but not olive oil stimulates lipid-peroxidation in plasma, liver and aorta of rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 6: 547–550.
47. Bunaciu AA, Danet AF, Fleschin Ş, Aboul-Enein HY (2015) Recent Applications for In Vitro Antioxidant Activity Assay. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 46: 389–399.
48. Burda S, Oleszek W (2001) Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 2774–2779.
49. Cai YZ, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H (2006) Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences* 78: 2872–2888.

50. Cai H, Boocock DJ, Steward WP, Gescher AJ (2007) Tissue distribution in mice and metabolism in murine and human liver of apigenin and tricetin, flavones with putative cancer chemopreventive properties. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 60: 257–66.
51. Calvo MI, Cavero RY (2014) Medicinal plants used for cardiovascular diseases in Navarra and their validation from Official sources. *Journal of Ethnopharmacology* 157: 268–273.
52. Cao G, Sofic E, Prior RL (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22: 749–760.
53. Camiletti-Moirón D, Aparicio VA, Nebot E, Medina G, Martínez R, Kapravelou G, Andrade A, Porres JM, López-Jurado M, Aranda P (2015) High-intensity Exercise Modifies the Effects of Stanozolol on Brain Oxidative Stress in Rats. *International Journal of Sports* 36(12): 984–91.
54. Campos AM, Lissi EA (1997) Kinetics of the reaction between 2,2'-azobis(3-ethylbenzoxolin-6-sulfonic acid) (ABTS) derived radical cation and phenols. *International Journal of Chemical Kinetics* 29: 219–224.
55. Cardona F, Andrés-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI (2013) Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry* 24: 1415–1422.
56. Cermak R, Landgraf S, Wolffram S (2003) The bioavailability of quercetin in pigs depends on the glycoside moiety and on dietary factors. *Journal of Nutrition* 133: 2802–2807.
57. Charlton AJ, Baxter NJ, Lokman Khan ML, Moir AJG, Haslam E, Davies AP, Williamson MP (2002) Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1593–1601.
58. Chen TY (2013) Brain Bioavailability of Polyphenols: Implications for Delivery of Brain. Health Benefits. Open Access. Purdue University e-pubs. Dissertations. pp194.
59. Chen Y, Xie S, Chen S, Zeng S (2008) Glucuronidation of flavonoids by recombinant UGT1A3 and UGT1A9. *Biochemical Pharmacology* 76(3): 416–25.
60. Chen JW, Zhu ZQ, Hu TX, Zhu DY (2002) Structure-activity relationship of natural flavonoids in hydroxyl radical-scavenging effects. *Acta Pharmacologica Sinica* 23(7): 667–72.
61. Cheeseman KH, Slater TF (1993) An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* 49(3): 481–93
62. Clifford, MN (2000) Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1063–1072.

63. Clifford MN, Johnston KL, Knight S, Kuhnert N (2003) Hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2900–2911.
64. Cotelle N (2001) Role of flavonoids in oxidative stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1(6): 569–590.
65. Crozier A, Del Rio D, Clifford MN (2010) Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine* 31:446–467.
66. Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN (2009) Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* 26: 1001–1043.
67. Czank C, Cassidy A, Zhang Q, Morrison DJ, Preston T, Kroon PA, Botting NP, Kay CD (2013) Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a <sup>13</sup>C-tracer study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 97(5): 995–1003.
68. D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 43(4): 348–361.
69. D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R (2010) Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences* 11: 1321–1342.
70. Dai J, Mumper RJ (2010) Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15: 7313–7352.
71. Dai F, Chen WF, Zhou B (2008) Antioxidant synergism of green tea polyphenols with alpha-tocopherol and L-ascorbic acid in SDS micelles. *Biochimie* 91(11-12): 1535.
72. Da Silva EL, Piskula MK, Yamamoto N, Moon JH, Terao J (1998) Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. *FEBS Letters* 430(3): 405–8.
73. Day AJ, Cañada FJ, Díaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MR, Williamson G (2000) Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters* 468: 166–170.
74. Day AJ, Gee JM, DuPont MS, Johnson IT, 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. *Biochemical Pharmacology* 65:1199–11206.

75. de Ancos B, Gonzalez E, Cano MP (1999) Differentiation of raspberry varieties according to anthocyanin composition. *European Food Research and Technology* 208: 33–38.
76. De Kok TM, van Breda SG, Manson MM (2008) Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review. *European Journal of Nutrition* 47: 51–59.
77. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A (2013) Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & redox signaling* 18: 1818–1892.
78. Di Meo F, Anouar E, Podloucka P, Fabre G, Trouillas P (2013) Understanding antioxidant properties of natural compounds at the atomic scale. *Journal of the Serbian Society for Computational Mechanics* 7(1): 58–70.
79. Diamanti J, Mezzetti B, Giamperi F, Alvarez-Suarez JM, Quiles JL, Gonzales-Alonso A, Ramirez-Tortosa MC, Grandos-Principal S, Gonzáles-Paramás AM, Santos-Buelga C, Battino M (2014) Doxorubicin-induced oxidative stress in rats is efficiently counteracted by dietary anthocyanin differently enriched strawberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62: 3936–3943.
80. Dragović-Uzelac V, Bursać Kovačević D, Pedisić S, Levaj B, Elez Garofulić I, Zorić Z, Repajić M (2014) Polyphenolic composition and antioxidant capacity of Croatian wild 440 fruits. Poster session presentation at the meeting of the 7th Central European Congress on Food, Food Chain Integration, Skopje, Macedonia.
81. Duarte GS, Farah A (2011) Effect of simultaneous consumption of milk and coffee on chlorogenic acids' bioavailability in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 7925–7931.
82. Dugas Jr. AJ, Castañeda-Acosta J, Bonin GC, Price KL, Fischer NH, Winston GW (2000) Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. *Journal Natural Products* 63: 327–331.
83. Dupas CJ, Marsset-Baglieri AC, Ordonaud CS, Ducept FMG, Maillard MN (2006) Coffee antioxidant properties: effects of milk addition and processing conditions. *Journal of Food Science* 71: S253–S258.
84. 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. *Journal of Food Science* 83(11): 2782–2789.
85. Eyer P, Worek F, Kiderlen D, Sinko G, Stuglin A, Simeon-Rudolf V, Reiner E (2003) Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Analytical Biochemistry* 312: 224–227.

86. Fantini M, Benvenuto M, Masuelli L, Frajese GV, Tresoldi I, Modesti A, Bei R (2015) In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: perspectives on cancer treatment. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 9236–9282.
87. Fernandes A, Ivanova G, Brás NF, Mateus N, Ramos MJ, Rangel M, de Freitas V (2014) Structural characterization of inclusion complexes between cyanidin-3- O-glucoside and  $\beta$ -cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers* 102: 269–277.
88. Fernandez-Panchon MS, Villano D, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC (2008) Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48(7): 649–71.
89. Ferruzzi MG, Lobo JK, Janle EM, Cooper B, Simon JE, Wu QL, Welch C, Ho L, Weaver C, Pasinetti, GM (2009) Bioavailability of gallic acid and catechins from grape seed polyphenol extract is improved by repeated dosing in rats: implications for treatment in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 18(1): 113–124.
90. Figueiredo-González M, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J, Teixeira N, Mateus N, De Freitas V (2014) The phenolic chemistry and spectrochemistry of red sweet wine-making and oak aging. *Food Chemistry* 152: 522–530.
91. Flohé L, Ötting F (1984) Superoxide dismutase assays. *Methods in Enzymology* 105: 93–104.
92. Franke SIR, Molz P, Mai C, Ellwanger JH, Zenkner FF, Horta JA, Prá D (2017) High consumption of sucrose induces DNA damage in male Wistar rats. *Journal Anais da Academia Brasileira de Ciências* 89(4): 2657–2662.
93. Frazier RA, Deaville ER, Green RJ, Stringano E, Willoughby I, Plant J, Mueller-Harvey I (2010) Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51: 490–495.
94. Fresco P, Borges F, Diniz C, Marques MPM (2006) New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medicinal Research Reviews* 26: 747–766.
95. Ganguly S, G. TK, Mantha S, Panda K (2016) Simultaneous Determination of Black Tea- Derived Catechins and Theaflavins in Tissues of Tea Consuming Animals Using Ultra13 Performance Liquid-Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *PLoS One* 11(10): e0163498.
96. Gao Z, Huang K, Yang X, Xu H (1999) Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochimica et Biophysica Acta* 472: 643–650.
97. Gelenčir N (1989) Prirodno liječenje biljem i ostalim sredstvima, 14. izdanje, Digitalizacija knjige: Equilibrium, Beograd.



98. Georgiades P, Pundey PDA, Rogers S, Thornton DJ, Waihg TA (2014) Tea Derived Galloylated Polyphenols Cross-Link Purified Gastrointestinal Mucins. *PLoS ONE* 9(8): e105302.
99. Gessner DK, Ringseis R, Eder K (2017) Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 101(4): 605–628.
100. Gökkuşu C, Mostafazadeh T (2003) Changes of oxidative stress in various tissues by long-term administration of vitamin E in hypercholesterolemic rats. *Clinica Chimica Acta* 328:155–161.
101. Gómez-Ruiz JA, Leake DS, Ames JM (2007) In vitro antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(17): 6962–6969.
102. Gonzales GB, Smagghe G, Grootaert C, Zotti M, Raes K, Van Camp J (2015) Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism: a sequential structure -activity/property relationship-based approach in the study of bioavailability and bioactivity. *Drug Metabolism Reviews* 47(2): 175–90.
103. Goltz SR, Campbell WW, Chitchumroonchokchai C, Failla ML, Ferruzzi MG (2012) Meal triacylglycerol profile modulates postprandial absorption of carotenoids in humans. *Molecular Nutrition & Food Research* 56: 866–877.
104. Gorelik S, Kanner J, Schurr D, Kohen R (2013) A rational approach to prevent postprandial modification of LDL by dietary polyphenols. *Journal of Functional Foods* 5: 163–169.
105. Gradolatto A, Basly JP, Berges R, Teyssier C, Chagnon MC, Siess MH, Canivenc-Lavier MC (2005) Pharmacokinetics and metabolism of apigenin in female and male rats after a single oral administration. *Drug Metabolism and Disposition* 33: 49–54.
106. Grlić Lj (2005) *Enciklopedija samoniklog jestivog bilja*. Ex libris, Rijeka.
107. Gu C, Shi Y, Le G (2008) Effect of Dietary Protein Level and Origin on the Redox Status in the Digestive Tract of Mice. *International Journal of Molecular Sciences* 9(4): 464–75.
108. Guimarães R, Barros L, Dueñas M, Carvalho AM, Queiroz MJRP, Santos-Buelga C, Ferreira, ICFR (2013) Characterization of Phenolic Compounds in Wild Fruits from Northeastern Portugal. *Food Chemistry* 141 (4): 3721–3730.
109. Guo Y, Bruno RS (2015) Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability. *Journal of Nutritional Biochemistry* 26: 201–210.
110. Haenen GR, Paquay JB, Korthouwer RE, Bast A (1997) Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 236:591–593.

111. Häkkinen S (2000) Flavonols and phenolic acids in berries and berry products. Doktorski rad, Kuopio University, Finland.
112. Halliwell B, Aeschbach R, Löliger J, Aruoma OI (1995) The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* 33:601-617.
113. Halliwell B (2008) Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics* 476(2):107-112.
114. Hamed AI, Al-Ayed AS, Moldoch J, Piacente S, Oleszek W, Stochmal A (2014) Profiles analysis of proanthocyanidins in the argun nut (*Medemia argun*—an ancient Egyptian palm) by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry* 49: 306-315.
115. Han X, Shen T, Lou H (2007) Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences* 8: 950-988.
116. Hanske L, Loh G, Sczesny S, Blaut M, Braune A (2009) The bioavailability of apigenin-7-glucoside is influenced by human intestinal microbiota in rats. *Journal of Nutrition* 139:1095-102.
117. Hasni I, Bourassa P, Hamdani S, Samson G, Carpentier R, Tajmir-Riahi HA (2011) Interaction of milk  $\alpha$  and  $\beta$ -casein with tea polyphenols. *Food Chemistry* 126: 630-639.
118. Havsteen BH (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 96: 67-202.
119. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13:572-84.
120. Hodgson JM, Puddey IB, Burke V, Croft KD (2006) Is reversal of endothelial dysfunction by tea related to flavonoid metabolism? *British Journal of Nutrition* 95(1): 14-7.
121. Hollman PCH, Arts ICW (2000) Flavonols, flavones and flavanols—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1081-1093.
122. Hollman PCH, Bijlsman MNCP, van Gameren Y, Cnossen EPJ, de Vries JHM, Katan MB (1999) The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research* 31: 569-573.
123. Hollman PCH, van Trijp JMP, Buysman MNCP, v.d. Gaag MS, Mengelers MJB, de Vries JHM, Katan MB (1997a) Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters* 418: 152-156.

124. Hollman PCH, van Trijp JMP, Mengelers MJB, de Vries JHM, Katan MB (1997b) Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. *Cancer Letters* 114: 139–140.
125. Hollman PCH (2004) Absorption, bioavailability and metabolism of flavonoids. *Pharmaceutical Biology* 42: 74-83.
126. Hosny M, Abdel –Aziz Z, El-aasser MM, Zhran M (2014) Microbial transformation of 2,5 dihydroxycinnamic acid by *aspergillus niger* and *rhizopus oryzae*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 49: 104–116.
127. Huang WY, Cai YZ, Zhang Y (2010) Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer* 62: 1–20.
128. Huebbe P, Wagner AE, Boesch-Saadatmandi C, Sellmer F, Wolffram S, Rimbach G (2010) Effect of dietary quercetin on brain quercetin levels and the expression of antioxidant and Alzheimer's disease relevant genes in mice. *Pharmacological Research* 61(3): 242–246.
129. Jacob JK, Hakimuddin F, Paliyath G, Fisher H (2008) Antioxidant and antiproliferative activities of polyphenols in novel high polyphenol grape lines. *Food Research International* 41: 419–428.
130. Jaganath IB, Mullen W, Edwards CA, Croizer A (2006) The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolites of rutin in man. *Free Radical Research* 40: 1035–1046.
131. 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). *Journal of Ethnopharmacology* 175: 93–108.
132. Jarukamjorn K, Jearapong N, Pimson C, Chatuphonprasert W (2016) A high-fat, high-fructose diet induces antioxidant imbalance and increases the risk and progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Scientifica (Cairo)* 2016: 5029414.
133. Jayakumar T, Sakthivel M, Thomas PA, Geraldine P (2008) *Pleurotus ostreatus*, an oyster mushroom, decrease the oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rat kidneys, heart and brain. *Chemico-Biological Interactions* 176: 108–120.
134. Jin SL, Yin YG (2012) In vivo antioxidant activity of total flavonoids from *indocalamus* leaves in aging mice caused by D-galactose. *Food and Chemical Toxicology* 50(10): 3814–8.
135. Journel M, Chaumontet C, Darcel N, Fromentin G, Daniel Tomé D (2012) Brain Responses to High-Protein Diet. *Advances in Nutrition* 3:322-329.

136. Kähkönen MP, Heinämäki J, Ollilainen V, Heinonen M (2003) Berry anthocyanins: Isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83:1403–1411.
137. Kanakis CD, Hasni I, Bourassa P, Tarantilis PA, Polissiou MG, Tajmir-Riahi HA (2011) Milk  $\beta$ -lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chemistry* 127: 1046–1055.
138. Kandaswami C, Perkins E, Soloniuk DS, Drzewiecki G, Middleton E Jr. (1993) Ascorbic acid-enhanced antiproliferative effect of flavonoids on squamous cell carcinoma in vitro. *Anticancer drug* 4(1): 91–6.
139. Karakaya S (2004) Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44: 453–464.
140. Kay CD, Pereira-Caro G, Ludwig IA, Clifford MN, Crozier A (2017) Anthocyanins and Flavanones Are More Bioavailable than Previously Perceived: A Review of Recent Evidence. *Annual Review of Food Science and Technology* 8: 155–180.
141. Kazazić SP (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* 55: 279–290.
142. Kehrer JP, Lund LG (1994) Cellular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 17: 65–75.
143. Kerry N, Rice-Evans C (1999) Inhibition of peroxynitrite-mediated oxidation of dopamine by flavonoid and phenolic antioxidants and their structural relationships. *Journal of Neurochemistry* 73:247–253
144. Kim DH, Jung EA, Sohng IS, Han JA, Kim TH, Han MJ (2008). Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Archives of Pharmacal Research* 21:17–23.
145. Kinsey-Jones JS, Alamshah A, McGavigan AK, Spreckley E, Banks K, Cereceda Monteoliva N, Norton M, Bewick GA, Murphy KG (2015). GPRC6a is not required for the effects of a high-protein diet on body weight in mice. *Obesity (Silver Spring)* 23(6):1194–200.
146. Kolodziej H, Sakar MK, Burger JFW, Engelshowe R, Ferreira D (1991) A-type proanthocyanidins from *Prunus spinosa*. *Phytochemistry* 30: 2041–2047.
147. Konishi Y, Kobayashi S, Shimizu M (2003) Transepithelial transport of p-coumaric acid and gallic acid by monocarboxylic acid transporter in Caco-2 cell monolayers. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67: 2317–2324.
148. Konishi Y, Kobayashi S (2004) Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 2518–2526.

149. Konishi Y, Shimizu M (2003) Transepithelial transport of ferulic acid by monocarboxylic acid transporter in Caco-2 cell monolayers. *Biotechnology, and Biochemistry* 67: 856–862.
150. Konishi Y, Zhao Z, Shimizu M (2006) Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(20): 7539–43.
151. Kroon PA, Williamson G (1999) Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79:355–361.
152. Kültür S (2007) Medicinal plants used in Kirklareli Province. *Journal of Ethnopharmacology* 111: 341–364.
153. Kumar S, Pandey AK (2013) Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* 2013: 1–16.
154. Lafay S, Morand C, Manach C, Besson C, Scalbert A (2006) Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. *British Journal of Nutrition* 96: 39–46
155. Lafay S, Gil-Izquierdo A (2008) Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Reviews* 7: 301–311.
156. Lamuela-Raventós RM, Romero-Pérez AI, Andrés-Lacueva C, Tornero A (2005) Health Effects of Cocoa Flavonoids. *Food Science and Technology International* 11(3): 159–176.
157. Le Bourvellec C, Bouchet B, Renard CMGC (2005) Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III; Study on model polysaccharides. *Biochimica et Biophysica Acta* 1725: 10–18.
158. Le Bourvellec C, Guyot S, Renard CMGC (2009) Interactions between apple (*Malus domestica* Borkh.) polyphenols and cell walls modulate the extractability of polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 75: 251–261.
159. Leopoldini M, Mriono T, Russo N, Toscano M (2004) Antioxidant Properties of Phenolic Compounds: H-Atom versus Electron Transfer Mechanism. *The Journal of Physical Chemistry* 108 (22): 4916–4922.
160. Leopoldini M, Russo N, Toscano M (2011) The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry* 125: 288–306.
161. Lesjak M, Hoque R, Balesaria S, Skinner V, Debnam ES, Srail SKS, Sharp PA (2014) Quercetin inhibits intestinal iron absorption and ferroportin transporter expression in vivo and in vitro. *PLoS One*. 24; 9(7):e102900.

162. Lee HC, Wei YH (2000) Mitochondrial role in life and death of the cell. *Journal of Biomedical Science* 7: 2–15.
163. Lee J, Mitchell AE (2012) Pharmacokinetics of quercetin absorption from apples and onions in healthy humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 3874–3881.
164. Lee YS, Woo JB, Ryu SI, Moon SK, Han NS, Lee SB (2017) Glucosylation of flavonol and flavanones by *Bacillus cyclodextrin* glucosyltransferase to enhance their solubility and stability. *Food Chemistry* 229:75–83.
165. Lee H, Yeom H, Kim YG, Yoon CN, Jin C, Choi SJ, Kim BR, Kim DH (1998) Structure-Related Inhibition of Human Hepatic Caffeine N<sup>3</sup>-Demethylation by Naturally Occurring Flavonoids. *Biochemical Pharmacology* 55: 1369-1375.
166. Lesser S, Cermak R, Wolfram S (2004) Bioavailability of quercetin in pigs is influenced by the dietary fat content. *Journal of Nutrition* 134: 1508–1511.
167. Lesser S, Cermak R, Wolfram S (2006) The fatty acid pattern of dietary fat influences the oral bioavailability of the flavonol quercetin in pigs. *British Journal of Nutrition* 96: 1047–1052.
168. Levine RL, Williams JA, Stadtman EP, Shacter E (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 233: 346–357.
169. Lewandowska U, Gorlach S, Owczarek K, Hrabec E, Szewczyk K (2014) Synergistic interactions between anticancer chemotherapeutics and phenolic compounds and anticancer synergy between polyphenols. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)* 68: 528–40.
170. Li HJ, Deinzer ML (2008) The mass spectral analysis of isolated hops atype proanthocyanidins by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 43: 1353–1363.
171. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 4: 118–126.
172. Lotito SB, Frei B (2004) Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting in vitro and in vivo effects. *Free Radical Biology and Medicine* 36: 201–211.
173. Lotito SB, Zhang WJ, Yang CS, Crozier A, Frei B (2011) Metabolic conversion of dietary flavonoids alters their anti-inflammatory and antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine* 51: 454–463.
174. Lorrain B, Dangles O, Genot C, Dufour C (2010) Chemical modeling of heme-induced lipid oxidation in gastric conditions and inhibition by dietary polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 676–683.

175. Lorrain B, Dangles O, Loonis M, Armand M, Dufour C (2012). Dietary iron-initiated lipid oxidation and its inhibition by polyphenols in gastric conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 9074–9081.
176. Lovrić J, Mesić M, Macan M, Koprivanac M, Kelava M, Bradamante V (2008) Measurement of malondialdehyde (MDA) level in rat plasma after simvastatin treatment using two different analytical methods. *Periodicum Biologorum* 110: 63–67.
177. Lovrić V, Putnik P, Bursać Kovačević D, Jukić M, Dragović-Uzelac V (2017) Effect of Microwave-Assisted Extraction on the Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Blackthorn Flowers. *Food Technology and Biotechnology* 55(2): 243-250.
178. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagent, *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
179. MacDonald RS, Wagner K (2012) Influence of dietary phytochemicals and microbiota on colon cancer risk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 6728–6735.
180. McNally DJ, Wurms KV, Labbé C, Quideau S, Bélanger RR (2003) Complex C-glycosyl flavonoid phytoalexins from *Cucumis sativus*. *Journal of Natural Products* 66:1280–3.
181. Mandal SM, Chakraborty D, Dey S (2010) Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe Symbioses. *Plant Signaling & Behavior* 5 (4): 359-368.
182. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* 79: 727–747.
183. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 81:230S–242S.
184. Mansour DFS, Eldensahary EES, Nada SA, Omara EA, Ibrahim MIM (2013) therapeutic effectiveness of certain whey proteins on lipopolysaccharide-induced oxidative stress and histopathological changes in rat liver. *Journal of Applied Sciences Research* 9: 4983–4992.
185. Marchelak A, Owczarek A, Matczak M, Pawlak A, Kolodziejczyk-Czepas J, Nowak P, Olszewska MA (2017) Bioactivity Potential of *Prunus spinosa* L. Flower Extracts: Phytochemical Profiling, Cellular Safety, Pro-inflammatory Enzymes Inhibition and Protective Effects Against Oxidative Stress In Vitro. *Frontiers in Pharmacology* 8:680.
186. Marciani L, Gowland PA, Spiller RC, Manoj P, Moore RJ, Young P, Al-Sahab S, Bush D, Wright J, Fillery-Travis AJ (2000) Gastric response to increased meal viscosity assessed by echo-planar magnetic resonance imaging in humans. *Journal of Nutrition* 130: 122–127.

187. Lila MA (2004) Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (5): 306–313.
188. Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L (2005) Determination of malondialdehyde (MDA) by high performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *Journal of Chromatography B* 827: 76–82.
189. Mateos-Martín ML, Pérez-Jiménez J, Fuguet E, Torres JL (2012) Non-extractable proanthocyanidins from grapes are a source of bioavailable (epi)catechin and derived metabolites in rats. *British Journal of Nutrition* 108: 290–297.
190. Matthiesen L, Malterud KE, Sund RB (1997) Hydrogen bond formation as basis for radical scavenging activity: a structure-activity study of C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale* and structurally related acetophenones. *Free Radical Biology and Medicine* 2:307–311.
191. Mattila P, Hellström J, Törrönen R (2006) Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:7193–7199.
192. Maity S, Ukil A, Vedasiromoni JR, Das PK (2006) Biodistribution and pharmacokinetics of theaflavin-3,3'-digallate, the Major Antioxidant of Black Tea, in Mice. *International Journal of Pharmacology* 2(2): 240–246.
193. Méndez L, Pazos M, Molinar-Toribio E, Sánchez-Martos V, Gallardo JM, Rosa Nogués M, Torres JL, Medina I (2014) Protein carbonylation associated to high-fat, high-sucrose diet and its metabolic effects. *Journal of Nutritional Biochemistry* 25(12): 1243–53.
194. Menendez-Baceta G, Aceituno-Mata L, Tardío J, Reyes-García V, Pardo de Santayana M (2012) Wild edible plants traditionally gathered in Gorbeialdea (Biscay, Basque Country). *Genetic Resources and Crop Evolution* 59: 1329-1347.
195. Meng S, Wu B, Singh R, Yin T, Morrow JK, Zhang S, Hu M (2012) SULT1A3-mediated regiospecific 7-O-sulfation of flavonoids in Caco-2 cells can be explained by the relevant molecular docking studies. *Molecular Pharmacology* 9: 862–873.
196. Meschini S, Pellegrini E, Condello M, Occhionero G, Delfino S, Condello G, Mastrodonato F (2017) Cytotoxic and apoptotic activities of *Prunus spinosa* trigonate ecotype extract on human cancer cells. *Molecules* 22(9). pii: E1578.
197. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* 84: 407–412.
198. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* 52:673–751.



199. Mikulic-Petkovsek M, Stampar F, Veberic R, Sircelj H (2016) Wild prunus fruit species as a rich source of bioactive compounds. *Journal of Food Science* 81(8): C1928.
200. Mishra A, Kumar S, Pandey AK (2013) Scientific validation of the medicinal efficacy of *Tinospora cordifolia*. *The Scientific World Journal* 2013:8.
201. Moon T, Chi MH, Kim DH, Yoon CN, Choi YS (2000) Quantitative structure-activity relationship (QSAR) study of flavonoid derivatives for inhibition of cytochrome P450 1A2. *Quant Struct-Act Relat* 19: 257–263.
202. 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 Radical Research* 33:667–676.
203. Moreno A, Nuño G, Cuello S, Sayago JE, Alberto MR, Zampini C, Isla MI (2015) Anti-inflammatory, Antioxidant and Antimicrobial Activity Characterization and Toxicity Studies of Flowers of "Jarilla", a Medicinal Shrub from Argentina. *Natural Product Communications* 10(6):991-4.
204. Morris ME, Zhang S (2006) Flavonoid-drug interactions: Effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sciences* 78: 2116–2130.
205. Mullen W, Borges G, Donovan JL, Edwards CA, Serafini M, Lean ME, Crozier A (2009) Milk decreases urinary excretion but not plasma pharmacokinetics of cocoa flavan-3-ol metabolites in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 89: 1784–1791.
206. Nagy K, Courtet-Compondu MC, Williamson G, Rezzi S, Kussmann M, Rytz A (2012) Non-covalent binding of proteins to polyphenols correlates with their amino acid sequence. *Food Chemistry* 132: 1333–1339.
207. Nardi GM, Farias Januario AG, Freire CG, Megiolaro F, Schneider K, Perazzoli MR, Do Nascimento SR, Gon AC, Mariano LN, Wagner G, Niero R, Locatelli C (2016) Anti-inflammatory Activity of Berry Fruits in Mice Model of Inflammation is Based on Oxidative Stress Modulation. *Pharmacognosy Research* 8:42–49.
208. Pravilnik o zaštiti životinja koje koriste u znanstvene svrhe (2013) Narodne novine 55, Zagreb.
209. Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u pokusima ili druge znanstvene svrhe (2011) Narodne novine 47, Zagreb.
210. Zakon zaštiti životinja (2006) Narodne novine 135, Zagreb.
211. Natella F, Nardini M, Giannetti I, Dattilo C, Scaccini C (2002a) Coffee drinking influences plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(21): 6211–6.

212. Natella, F, Belevi, F, Gentili, V, Ursini F, Scaccini C (2002b) Grape seed proanthocyanidins prevent plasma postprandial oxidative stress in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7720–7725.
213. Neilson AP, George JC, Janle EM, Mattes RD, Rudolph R, Matusheski NV, Ferruzzi MG (2009) Influence of chocolate matrix composition on cocoa flavan-3-ol bioaccessibility in vitro and bioavailability in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 9418–9426.
214. Németh K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA (2003) Deglycosylation by small intestinal epithelial cell-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *European Journal of Nutrition* 42: 29–42.
215. Nyström T (2007) A bacterial kind of aging. *PLOS Genetics* 3:e224.
216. Olszewska M, Wolbiś M (2001) Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 58 (5): 367–372.
217. Olszewska M, Głowacki R, Wolbiś M, Bald E (2001) Quantitative determination of flavonoids in the flowers and leaves of *Prunus spinosa* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 58 (3): 199–203.
218. Olszewska M, Wolbiś M (2002a) Further flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Acta poloniae pharmaceutica* 59: 133–137.
219. Olszewska M, Wolbiś M (2002b) Flavonoids from the leaves of *Prunus spinosa* L. *The Polish Journal of Chemistry* 76: 967–974.
220. Olthof MR, Hollman PC, Vree TB, Katan MB (2000) Bioavailabilites of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *Journal of Nutrition* 130: 1200–1203.
221. Otake Y, Hsieh F, Walle T (2002) Glucuronidation versus oxidation of the flavonoid alangin by human liver microsomes and hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* 30: 576–581.
222. Owczarek A, Magiera A, Matczak M, Piotrowska DG, Olszewska MA, Marchelak A (2017) Optimisation of preparative HPLC separation of four isomeric kaempferol diglycosides from *Prunus spinosa* L. by application of the response surface methodology. *Phytochemistry Letters* 20: 415–424.
223. Ozdal T, Sela DA, 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.

224. Padayachee A, Netzel G, Netzel M, Day L, Zabaras D, Mikkelsen D, Gidley MJ (2012a) Binding of polyphenols to plant cell wall analogues – Part 1: Anthocyanins. *Food Chemistry* 134: 155–161.
225. Padayachee A, Netzel G, Netzel M, Day L, Zabaras D, Mikkelsen D, Gidley MJ (2012b) Binding of polyphenols to plant cell wall analogues – Part 2: Phenolic acids. *Food Chemistry* 135: 2287–2292.
226. Palafox-Carlos H, Ayala-Zavala JF, González-Aguilar GA (2011) The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science* 76:R6–R15.
227. Pandey KB, Rizvi SI (2009a) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2: 270–278.
228. Pandey KB, Rizvi SI (2009b) Protective effect of resveratrol on formation of membrane protein carbonyls and lipid peroxidation in erythrocytes subjected to oxidative stress. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 34: 1093–1097.
229. Papandreou MA, Tsachaki M, Efthimiopoulos S, Cordopatis P, Lamari FN, Margarity M (2011) Memory enhancing effects of saffron in aged mice are correlated with antioxidant protection. *Behavioural Brain Research* 219(2): 197–204.
230. Rao PV, Krishnan KT, Salleh N, Gan SH (2016) Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 26: 657–664.
231. Pekkinen J, Rosa NN, Savolainen OI, Keski-Rahkonen P, Mykkänen H, Poutanen K, Micard V, Hanhineva K (2014) Disintegration of wheat aleurone structure has an impact on the bioavailability of phenolic compounds and other phytochemicals as evidenced by altered urinary metabolite profile of diet-induced obese mice. *Nutrition and Metabolism* 11: 1–15.
232. Pereira, DM, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB (2009) Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*, 14: 2202–2211.
233. Peters CM, Green RJ, Janle EM, Ferruzzi MG (2010) Formulation with ascorbic acid and sucrose modulates catechin bioavailability from green tea. *Food Research International* 43: 95–102.
234. Petersen B, Egert S, Bosy-Westphal A, Müller MJ, Wolfram S, Hubbermann EM, Rimbach G, Schwarz K (2016) Bioavailability of quercetin in humans and the influence of food matrix comparing quercetin capsules and different apple sources. *Food Research International* 88: 159–165.
235. Petrik J (2008) Polifenoli – antioksidansi. *Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, str. 1–8.*

236. Pichichero E, Canuti L, Canini A (2009) Characterisation of the phenolic and flavonoid fraction and antioxidation power of Italian honeys of different botanical origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89 (4): 609–616.
237. Pietta P, Simonetti P, Gardana C, Brusamolino A, Morazzoni P, Bombardelli E (1998) Relationship between rate and extent of catechin absorption and plasma antioxidant status. *Biochemistry and Molecular Biology International* 46: 895–903.
238. Pinacho R, Cavero RY, Astiasarán I, Ansorena D, Calvo MI (2015) Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of *in vitro* digestion on their antioxidant capacity. *Journal of Functional Food* 19: 49–62.
239. Plumb GW, Price KR, Williamson G (1999) Antioxidant properties of flavonol glycosides from tea. *Redox Report* 4:13–16.
240. Pilaczynska-Szczesniak L, Skarpanska-Steinbron A, Deskur E, Basta P, Horoszkiewicz-Hassan M (2005) The influence of chokeberry juice supplementation on the reduction of oxidative stress resulting from an incremental rowing ergometer exercise. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism* 15: 48–58.
241. 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.
242. Potukuchi A, Addepally U, Upadrashta M, Nagalla B, Manchala R (2017a) High sucrose diet feeding aggravates age related changes in oxidative stress and antioxidant status of WNIN/Gr-Ob obese rats. *International Journal of Medical and Health Sciences* 6: 144-150.
243. Potukuchi A, Addepally U, Sindhu K, Manchala R (2017b) Increased total DNA damage and oxidative stress in brain are associated with decreased longevity in high sucrose diet fed WNIN/Gr-Ob obese rats. *Nutritional Neuroscience* 21(9): 648-656.
244. Maruyama K, Iso H (2014) Overview of the role of antioxidant vitamins as protection against cardiovascular disease: implication for aging. U: *Aging: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants* (Preedy VR, ured.), Academic Press, Oxford, str. 213-222.
245. Prior RL, Gu L, Wu X, Jacob RA, Sotoudeh G, Kader AA, Cook RA (2007) Plasma antioxidant capacity changes following a meal as a measure of the ability of a food to alter *in vivo* antioxidant status. *Journal of the American College of Nutrition* 26(2): 170–81.
246. Qiao JP, Kong XY, Kong AY, Han M (2014) Pharmacokinetics and biotransformation of tea polyphenols. *Current Drug Metabolism* 15 (1): 30–36.
247. Li Y, Paxton JW (2011) Oral Bioavailability and Disposition of Phytochemicals. U: *Phytochemicals – Bioactivities and Impact on Health* (Rasooli I, ured.), InTech, Rijeka/Šangaj, str. 117-138.

- 248.Rasmussen SE, Frederiksen H, Struntze Krogholm K, Poulsen L (2005) Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Molecular Nutrition & Food Research* 49: 159–174.
- 249.Ratty AK, Das NP (1988) Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* 39: 69–79.
- 250.Rawel HM, Frey SK, Meidtner K, Kroll J, Schweigert FJ (2006) Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence. *Molecular Nutrition and Food Research* 50: 705–713.
- 251.Rawel HM, Kroll J, Hohl UC (2001) Model studies on reactions of plant phenols with whey proteins. *Nahrung* 45: 72–81.
- 252.Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 1231–1237.
- 253.Redchenkova VN, Khishova OM (2006) Comparative analysis of the requirements of some pharmacopoeias on medicinal extracts. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 40: 40–43.
- 254.Rein MJ (2005) Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. *Disertacija*. Sveučilište Helsinki, Helsinki.
- 255.Reinboth M, Wolfram S, Abraham G, Ungemach FR, Cermak R (2010) Oral bioavailability of quercetin from different quercetin glycosides in dogs. *British Journal of Nutrition* : 104: 198–203.
- 256.Ribnicky DM, Roopchand DE, Poulev A, Kuhn P, Oren A, Cefalu WT, Raskin I (2014) *Artemisia dracunculus* L. polyphenols complexed to soy protein show enhanced bioavailability and hypoglycemic activity in C57BL/6 mice. *Nutrition* 30: S4–S10.
- 257.Rice-Evans C, Spencer JPE, Schroeter H, Rechner AR (2000) Bioavailability of flavonoids and potential bioactive forms *in vivo*. *Drug Metabolism and Drug Interaction* 17: 291–310.
- 258.Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20: 933–956.
- 259.Rice-Evans C (2001) Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry* 8: 797–807
- 260.Robards K, Prenzel PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* 66: 401–436.

261. Roginsky V, Lissi EA (2005) Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 92: 235–254.
262. Rosa NN, Dufour C, Lullien-Pellerin V, Micard V (2013) Exposure or release of ferulic acid from wheat aleurone: Impact on its antioxidant capacity. *Food Chemistry* 141: 2355–2362.
263. Rothwell JA, Perez-Jimenez J, Neveu V, Medina-Remón A, M'Hiri N, García-Lobato P, Manach C, Knox C, Eisner R, Wishart DS, Scalbert A (2013) Phenol explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database* 2013: 1-8. doi:10.1093/database/bat070
264. Rothwell JA, Medina-Remón A, Pérez-Jiménez J, Neveu V, Knaze V, Slimani N, Scalbert A (2015) Effects of food processing on polyphenol contents: A systematic analysis using Phenol-Explorer data. *Molecular Nutrition & Food Research* 59(1): 160–170.
265. Roowi S, Mullen W, Edwards CA, Crozier A (2009) Yoghurt impacts on the excretion of phenolic acids derived from colonic breakdown of orange juice flavanones in humans. *Molecular Nutrition & Food Research* 53: 68–75.
266. Rzeppa S, Bittner K, Döll S, Dänicke S, Humpf HU (2012) Urinary excretion and metabolism of procyanidins in pigs. *Molecular Nutrition & Food Research* 56(4): 653–665.
267. Saadatian-Elahi MI, Slimani N, Chajès V, Jenab M, Goudable J i sur. (2009) Plasma phospholipid fatty acid profiles and their association with food intakes: results from a cross-sectional study within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 89 (1): 331–46.
268. Sahari MA, Berenji Ardestani S (2015) Bio-antioxidants Activity: Their Mechanisms and Measurement Methods. *Applied Food Biotechnology* 2(1): 3–8.
269. Santos IS, Ponte BM, Boonme P, Silva AM, Souto EB (2013) Nanoencapsulation of polyphenols for protective effects against colon-rectal cancer. *Biotechnology Advances* 31: 514–523.
270. Santesso N, Akl EA, Bianchi M, Mente A, Mustafa R, Heels-Ansdell D, Schünemann HJ (2012) Effects of higher-versus lower-protein diets on health outcomes: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Clinical Nutrition* 66: 780–788.
271. Sarawek S, Derendorf H, Butterweck V (2008) Pharmacokinetics of luteolin and metabolites in rats. *Natural product communications* 3: 2029–36.
272. Saura-Calixto F (2011) Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: An essential physiological function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 43–49.

273. Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition* 130: 2073–2085S.
274. Scalbert A, Morand C, Manach C, Rémésy C (2002) Absorption and metabolism of polyphenol in the gut and impact on health. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 56: 276–282.
275. Scheline RR (1991) Metabolism of oxygen heterocyclic compounds. U: Handbook of mammalian metabolism of plant compounds, (Scheline, RR, ured.), CRC Press, Boca Raton, str. 243-305.
276. Scheepens A, Tan K, Paxton JW (2010) Improving the oral bioavailability of beneficial polyphenols through designed synergies. *Genes and Nutrition* 5(1): 75–87.
277. Scholz S, Williamson G (2007) Interactions affecting the bioavailability of dietary polyphenols in vivo. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 77(3): 224–35.
278. Schramm DD, Karim M, Schrader HR, Holt RR, Kirkpatrick NJ, Polagruto JA, Ensunsa JL, Schmitz HH, Keen CL (2003) Food effects on the absorption and pharmacokinetics of cocoa flavanols. *Life Sciences* 73: 857–869.
279. Selma MV, Espín JC, Tomás-Barberán FA (2009) Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 6485–501.
280. Serra A, Macià A, Romero MP, Valls J, Bladé C, Arola L, Motilva MJ (2010) Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and food matrix effect in in vitro and in vivo models. *British Journal of Nutrition* 103: 944–952.
281. Serra A, Macià A, Romero MP, Piñol C, Motilva MJ (2011) Rapid methods to determine procyanidins, anthocyanins, theobromine and caffeine in rat tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in Biomedical and Life Sciences* 879(19): 1519-1528.
282. Serafini M, Bugianesi R, Maiani G, Valtuena S, De Santis S, Crozier A (2003a) Plasma antioxidants from chocolate: dark chocolate may offer its consumers health benefits the milk variety cannot match. *Nature* 424: 1013.
283. Serafini M, Ghiselli A, Ferro-Luzzi A (1996) In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *European Journal of Clinical Nutrition* 50: 28–32.
284. Serafini M, Bugianesi R, Maiani G, Valtuena S, De Santis S, Crozier A (2003b) Plasma antioxidants from chocolate. *Nature* 424(6952).
285. Sies H (1991) Oxidative stress, oxidants and antioxidants, Academic Press, San Diego.

286. Spencer JP (2003) Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *The Journal of Nutrition* 133: 3255–3261.
287. Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD (1992) Phenolic antioxidants. *Critical reviews in Food Science and Nutrition* 32:67–103.
288. Shahidi F, Zhong, Y (2007) Measurement of Antioxidant Activity in Food and Biological Systems. U: Antioxidant Measurement and applications [online] (Shahidi F, Ho CT, ured.), American Chemical Society, Washington, str. 36–66, <[file:///C:/Users/Branko/Desktop/PIFLO/POSAO/Doktorat/Shahidi%20i%20Zhong%20\(2007\)%20Measurement%20of%20antioxidant%20activity%20in%20food%20and%20biological%20systems.pdf](file:///C:/Users/Branko/Desktop/PIFLO/POSAO/Doktorat/Shahidi%20i%20Zhong%20(2007)%20Measurement%20of%20antioxidant%20activity%20in%20food%20and%20biological%20systems.pdf)>. Pristupljeno 8. listopada 2018.
289. Shimoi K, Okada H, Furugori M, Goda T, Takase S, Suzuki M, Hara Y, Yamamoto H, Kinae N (1998) Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-beta-glucoside in rats and humans. *FEBS Letters* 438: 220–4.
290. Shishikura Y, Khokhar S, Murray BS (2006) Effects of tea polyphenols on emulsification of olive oil in a small intestine model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 1906–1913.
291. Shivashankara KS, Acharya SN (2010) Bioavailability of dietary polyphenols and the cardiovascular diseases. *The Open Nutraceuticals Journal* 3: 227–241.
292. Shoji T, Masumoto S, Moriichi N, Kanda T, Ohtake Y (2006). Apple (*Malus pumila*) procyanidins fractionated according to the degree of polymerization using normal-phase chromatography and characterized by HPLC-ESI/MS and MALDI-TOF/MS. *Journal of Chromatography A* 1102: 206–213.
293. Stojadinovic M, Radosavljevic J, Ognjenovic J, Vesic J, Prodic I, Stanic-Vucinic D, Cirkovic Velickovic T (2013) Binding affinity between dietary polyphenols and  $\beta$ -lactoglobulin negatively correlates with the protein susceptibility to digestion and total antioxidant activity of complexes formed. *Food Chemistry* 136: 1263–1271.
294. Shpigelman A, Israeli G, Livney YD (2010) Thermally-induced protein-polyphenol co-assemblies: beta lactoglobulin-based nanocomplexes as protective nanovehicles for EGCG. *Food Hydrocolloids* 24: 735–743.
295. SPSS version 17.0 (SPSS Inc. Chicago. IL) Available at: <https://www.hks.harvard.edu/.../A%SPSS%20Manuals/SPSS%2>
296. Stalmach A, Williamson G, Crozier A (2014) Impact of dose on the bioavailability of coffee chlorogenic acids in humans. *Food and Function* 5(8): 1727–1737.
297. Subramanian S, Goodspeed L, Wang S, Kim J, Zeng L, Ioannou GN, Haigh WG, Yeh MM, Kowdley KV, O'Brien KD, Pennathur S, Chait A (2011) Dietary cholesterol exacerbates hepatic steatosis and inflammation in obese LDL receptor-deficient mice. *Journal of Lipid Research* 52: 1626–1635.



298. Sugiyama H, Akazome Y, Shoji T, Yamaguchi A, Yasue M, Kanda T, Ohtake Y (2007) Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4604–4609.
299. Symonowicz M, Kolanek M (2012) Flavonoids and their properties to form chelate complexes. *Food science and biotechnology* 76 (1): 35–41.
300. Štefan L, Tepšić T, Zavidčić T, Urukalo D, Tota R, Domitrović R (2007) Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina* 43: 84–93.
301. Tammela P, Laitinen L, Galkin A, Wennberg T, Heczko R, Vuorela H, Slotte JP, Vuorela P (2004) Permeability characteristics and membrane affinity of flavonoids and alkyl gallates in Caco-2 cells and in phospholipid vesicles. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 425: 193–199.
302. Tang L, Zhou J, Yang CH, Xia BJ, Hu M, Liu ZQ (2012) Systematic studies of sulfation and glucuronidation of 12 flavonoids in the mouse liver S9 fraction reveal both unique and shared positional preferences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 3223–3233.
303. Teng H, Chen L (2018) Polyphenols and Bioavailability: an update. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, doi:10.1080/10408398.2018.1437023.
304. Terao J (2017) Factors modulating bioavailability of quercetin-related flavonoids and the consequences of their vascular function. *Biochemical Pharmacology* 139: 15-23.
305. Tian G, Xiang S, Noiva R, Lennarz WJ, Schindelin H (2006a) The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites. *Cell* 124(1): 61–73.
306. Tian XJ, Yang XD, Wang K, Yang XW (2006b) The efflux of flavonoids morin, isorhamnetin-3-O-rutinoside and diosmetin-7-O-β-D-xylopyranosyl-(1-6)-glucopyranoside in the human intestinal cell line Caco-2. *Pharmaceutical Research* 23: 1721–1728.
307. Tietze F (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry* 27(3): 502–22.
308. Tiku ML, Allison GT, Naik K, Karry SK (2003) Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes, Osteoarthritis and Cartilage 11: 159–166.
309. Toiu A, Mocan A, Vlase L, Pârvu AE, Vodnar DC, Gheldiu AM, Moldovan C, Oniga I (2018) Phytochemical Composition, Antioxidant, Antimicrobial and *in Vivo* Anti-inflammatory Activity of Traditionally Used Romanian *Ajuga laxmannii* (Murray) Benth. ("Nobleman's Beard" - Barba Împăratului). *Frontiers in pharmacology* 9: 7. doi: 10.3389/fphar.2018.00007

310. Tsao R, McCallum J (2010) Chemistry of Flavonoids. U: Fruit and vegetable phytochemicals, (de la Rosa LA, Alvarez-Parilla E, Gonzalez-Aguilar GA, ured.), Wiley-Blackwell, Ames, str. 131-153.
311. Tsao R (2010) Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2**: 1231–1246.
312. Tsyrllov IB, Mikhailenko VM, Gelboin HV (1994) Isozyme- and species-specific susceptibility of cDNA-expressed CYP1A P-450s to different flavonoids. *Biochimica et Biophysica Acta* **1205**: 325–335.
313. Tsuchiya H, Sato M, Kato H, Okubo T, Juneja LR, Kim M (1997) Simultaneous deetermination of catechins in human saliva by high-performance liquid chromatography. *The Journal of Chromatography B* **703**: 253–258.
314. Tuohy KM, Conterno L, Gasperotti M, Viola R (2012) Up-regulating the human intestinal microbiome using whole plant foods, polyphenols, and/or fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**: 8776–8782.
315. Uchiyama S, Taniguchi Y, Saka A, Yoshida A, Yajima H (2011) Prevention of diet-induced obesity by dietary black tea polyphenols extract in vitro and in vivo. *Nutrition* **27**: 287–292.
316. Uysal M, Kutalp G, Seçkin S (1998) The effect of cholesterol feeding on lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in the liver of rats. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* **58**: 339–342.
317. Vaidyanathan JB, Walle T (2003) Glucuronidation and sulfation of the tea flavonoid (-)-epicatechin by the human and rat enzymes. *Drug Metabolism and Disposition* **30**: 897–903.
318. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* **160**(1): 1–40.
319. van het Hof KH, Kivits GAA, Weststrate JA, Tijburg LBM (1998) Bioavailability of catechins from tea: The effect of milk. *European Journal of Clinical Nutrition*, **52**: 356–359.
320. Valls J, Millán S, Martí MP, Borràs E, Arola L (2009) Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavonols. *Journal of Chromatography A* **1216**: 7143–7172.
321. van Acker SABE, de Groot MJ, van den Berg DJ, Tromp MN, Donné-Op den Kelder G, van der Vijgh WJ, Bast A (1996) (1996) A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoid. *Chemical Research in Toxicology* **9**: 1305–1312.

322. Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57–149.
323. Velayutham P, Babu A, Liu D (2008) Green Tea Catechins and Cardiovascular Health: An Update. *Current Medicinal Chemistry* 15(18): 1840–50.
324. Vennat B, Bos MA, Pourrat A, Bastide P (1994) Procyanidins from tormentil: fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 17:1613–1615.
325. Vermeir W, Nicholson R (2006) Phenolic compound biochemistry. Springer, Dordrecht.
326. Viskupičová J, Ondrejovič M, Šturdík E (2008) Bioavailability and metabolism of flavonoids. *Journal of Food and Nutrition Research* 47: 151–162.
327. Von Staszewski M, Jara FL, Ruiz ALTG, Jagus RJ, Carvalho JE, Pilosof AMR (2012) Nanocomplex formation between beta-lactoglobulin or caseinomacropeptide and green tea polyphenols: Impact on protein gelation and polyphenols antiproliferative activity. *Journal of Functional Foods* 4: 800–809.
328. Walle T, Browning AM, Steed LL, Reed SG, Walle UK (2003) Flavonoid glucosides are hydrolysed and thus activated in the oral cavity in humans. *Journal of Nutrition* 135: 48–52.
329. Walton MC, Hendriks WH, Broomfield AM, McGhie TK (2009) Viscous food matrix influences absorption and excretion but not metabolism of blackcurrant anthocyanins in rats. *Journal of Food Science and Technology* 74: H22–H29.
330. Wang T, Li Q, Bi K (2016a) Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Journal Pharmaceutical Sciences* 13(1): 12-23.
331. Wang Y, Singh AP, Nelson HN, Kaiser AJ, Reker NC, Hooks TL, Wilson T, Vorsa N (2016b) Urinary clearance of cranberry flavonol glycosides in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64: 7931–7939.
332. Wang W, Sun C, Mao L, Ma P, Liu F, Yang J, Gao Y (2018) The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in Food Science & Technology* 56: 21–38.
333. Watrelot AA, Le Bourvellec C, Imberty, A, Renard CMGC (2013) Interactions between pectic compounds and procyanidins are influenced by methylation degree and chain length. *Biomacromolecules* 14: 709–718.
334. Weldin J, Jack R, Dugaw K, Kapur RP (2003) Quercetin, an over-the-counter supplement, causes neuroblastoma-like elevation of plasma homovanillic acid. *Pediatric and Developmental Pathology* 6: 547–51.

335. Williamson G, Clifford MN (2010) Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *British Journal of Nutrition* 104: 48–66.
336. Wu B, Basu S, Meng S, Wang X, Hu M (2011a) Regioselective sulfation and glucuronidation of phenolics: Insights into the structural basis. *Current Drug Metabolism* 12: 900–916.
337. Wu B, Kulkarni K, Basu S, Zhang S, Hu M (2011b) First-pass metabolism via UDP glucuronosyltransferase: A barrier to oral bioavailability of phenolics. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 100: 3655–3681.
338. Wu B, Morrow JK, Singh R, Zhang S, Hu M (2011c) Three-dimensional quantitative structure-activity relationship studies on UGT1A9- mediated 3-O-glucuronidation of natural flavonols using a pharmacophore- based Comparative Molecular Field Analysis model. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 336:403–413.
339. Wolbiś M, Olszewska M, Wesółowski WJ (2001) Triterpenes and sterols in the flowers and leaves of *Prunus spinosa* L. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 58 (6): 459–462.
340. Wong YC, Zhang L, Lin G, Zuo Z (2009) Intestinal first-pass glucuronidation activities of selected dihydroxyflavones. *International Journal of Pharmaceutics* 366:14–20.
341. Xiao J, Kai G (2012) A review of dietary polyphenol-plasma protein interactions: characterization, influence on the bioactivity, and structure-affinity relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52(1): 85–101.
342. Yang HL, Chen SC, Senthil Kumar KJ, Yu KN, Lee Chao PD, Tsai SY, Hou YC, Hseu YC (2012) Antioxidant and anti-inflammatory potential of hesperetin metabolites obtained from hesperetin-administered rat serum: an ex vivo approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 522–532.
343. Yi W, Akoh CC, Fischer J, Krewer G (2006) Absorption of anthocyanins from blueberry extracts by caco-2 human intestinal cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(15):5651-8.
344. Ma YC, Liu YJ, Sun AN, Du YT, Ye M, Pu XP, Qi XR (2017) Intestinal absorption and neuroprotective effects of kaempferol-3-O-rutinoside. *Royal Society of Chemistry* 7: 31408–31416
345. Yoo KS, Lee EJ, Patil BS (2010) Quantification of quercetin glycosides in 6 onion cultivars and comparisons of hydrolysis-HPLC and spectrophotometric methods in measuring total quercetin concentrations. *Journal of Food Science* 75: 160–165.
346. Youdim KA, Dobbie MS, Kuhnle G, Proteggente AR, Abbott NJ, Rice-Evans C (2003) Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *Journal of Neurochemistry* 85(1): 180–92.

347. Yu B, Sun J, Yang X (2012) Assembly of Naturally Occurring Glycosides, Evolved Tactics, and Glycosylation Methods. *Accounts of chemical research* 45(8): 1227–1236.
348. Yu BP (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews* 74: 139–162.
349. Yuksel Z, Avci E, Erdem YK (2010) Characterization of binding interactions between green tea flavonoids and milk proteins. *Food Chemistry* 121: 450–456.
350. Yuksel AK (2015) The effects of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) addition on certain quality characteristics of ice cream. *Journal of Food Quality* 38: 413–421.
351. Zhang L, Lin G, Zuo Z (2006) Position preference on glucuronidation of mono-hydroxyflavones in human intestine. *Life Sciences* 78: 2772–2780.
352. Zhang H, Yu D, Sun J, Liu X, Jiang L, Guo H, Ren F (2014) Interaction of plant phenols with food macronutrients: characterisation and nutritional-physiological consequences. *Nutrition Research Reviews* 27: 1–15.
353. Zhang H, Zheng J, Liu X, Ding Q, Jiang L, Guo H, Ren F (2012) Milk protein and fat play different roles in affecting the bioavailability and the antioxidant activity of jujube juice phenolics in rats. *Molecular Nutrition & Food Research* 56: 1511–1519.
354. Zhimin Xu, Luke R, Howard LR. (2012) *Analysis of Antioxidant Rich Phytochemicals*. Wiley-Blackwell, Oxford.
355. Zhao ZH, Moghadasian MH (2010) Bioavailability of hydroxycinnamates: a brief review of in vivo and in vitro studies. *Phytochemistry Reviews* 9:133–145.
356. Zhou P, Li LP, Luo SQ, Jiang HD, Zeng S (2008) Intestinal absorption of luteolin from peanut hull extract is more efficient than that from individual pure luteolin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 296–300.
357. Zinellu A, Sotgia S, Scanu B, Forteschi M, Giordo R, Cossu A, Posadino AM, Carru C, Pintus G (2015) Human serum albumin increases the stability of green tea catechins in aqueous physiological conditions. *PLoS One* 10(7): e0134690.
358. Zsila F, Bikadi Z, Malik D, Hari P, Pechan I, Berces A, Hazai E (2011) Evaluation of drug-human serum albumin binding interactions with support vector machine aided online automated docking. *Bioinformatics* 27(13):1806–13.

## 8. ŽIVOTOPIS

**Vedran Balta** rođen je 25. rujna 1988. u Zagrebu, Hrvatska. Na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (PMF) 2013. godine diplomirao je na integriranom preddiplomskom i diplomskom studiju biologije i kemije. Tijekom studija višestruko je nagrađivan za postignute uspjehe te je dobitnik posebne Rektorove nagrade za sudjelovanje u manifestaciji „Noć biologije“ u akademskoj godini 2011/2012., priznanja Hrvatskog kemijskog društva povodom uspješnog završetka studija kemije u znak poticanja na daljnji znanstveni rad i Državne stipendije zaklade „Hrvatska za djecu“. Od 2013. godine zaposlen je u Klasičnoj gimnaziji kao nastavnik biologije i kemije, a od 2015. godine u Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka PMF-a u svojstvu naslovnog asistenta gdje sudjeluje u izvođenju praktikumske nastave iz kolegija Imunologija i imunogenetika, Fiziologija oksidacijskog stresa, Fiziološki mehanizmi u toksikologiji, Fiziologija metabolizma i bioenergetika i Laboratorijska stručna praksa. Vedran Balta je 2014. godine upisao poslijediplomski doktorski studij Biologije na PMF-u. Tijekom godina svojim je radom savladao brojne molekularne i imunološke metode poput: izolacije limfocita iz uzoraka krvi na fikolu, Western blota, rad sa staničnim kulturama, rad s laboratorijskim životinjama, metode vezane za biokemiju, kromatografiju, farmakokinetiku, hematologiju i funkcionalnu aktivnost makrofaga, te metode procjene antioksidacijske sposobnosti stanica poput lipidne peroksidacije, analize ukupnog i reduciranog glutationa, hemolize eritrocita, osmotske fragilnosti eritrocita te genotoksične metode poput komet i mikronukleus testa.

### *Izvorni znanstveni radovi*

1. Oršolić N, **Balta V**, Odeh D, Mataković M, Škurić J (2017) Oxidative stress and inflammation caused by n-hexyl salicylate in mouse skin: the effectiveness of flavonoids. *International Journal of Phytomedicine* 9: 279-288.
2. Oršolić N, Jeleč Ž, Nemrava J, **Balta V**, Gregorović G, Jeleč D (2017) The effect of quercetin on bone mineral status and markers of bone turnover in retinoic acid-induced osteoporosis. *Polish of Food and Nutrition Sciences* 68: 149-162.
3. Đikić D, **Balta V**, Kmetič 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 (24 h) of flower extract of the blackthorn *Prunus spinosa* L. *Molecular and Experimental Biology in Medicine* 1(2): 23-31.

### ***Kongresna priopćenja***

1. Kunštić M, Kukulj M, **Balta V**, Đikić D, Oršolić N (2014) Gallic, caffeic and tannic acids inhibit tumor growth and angiogenesis in Erlich ascites tumor. HDIR-3: "From Bench to Clinic" - The 3rd Meeting with International Participation, Zagreb, Book of Abstracts: str. 258.
2. **Balta V**, Odeh D, Mataković M, Kunštić M, Kukulj M, Oršolić N (2015) Animal models of psoriasis: antiinflammatory and antioxidant epigallocatechin gallate efficiency. 12. Hrvatski biološki kongres s međunarodnim djelovanjem, Zagreb, Book of Abstracts: str. 59.
3. Oršolić N, Odeh D, Mataković M, **Balta V**, Kunštić M, Kukulj M, Sašilo K, Đikić D (2015) Quercetin attenuates n-hexyl salicylate or di-n-propyl disulfide-induced skin irritation: oxidative stress and inflammation. 12. Hrvatski biološki kongres s međunarodnim djelovanjem, Sveti Martin na Muri, Book of Abstracts: str. 269.
4. Landeka Jurčević I, Đikić D, **Balta V**, Paradžik I, Sabljic L (2016) Utjecaj flavonoida iz cvijeta *Prunus spinosa* L. i Whey proteina na oksidacijsko/antioksidacijski status u C57BL/6 miša. International conference 16th Ružička days: "Today science - tomorrow industry", Vukovar, Book of Abstracts: str. 225.
5. Odeh D, Nikolić B, Mataković M, Lesar N, Kukulj M, **Balta V**, Karać I, Oršolić N (2017) Oxidative stress and inflammation caused by n-hexyl salicylate in mouse skin: the effectiveness of flavonoids. Annual meeting of the Croatian Immunological Society with EFIS on Tour Symposium, Zagreb, Book of Abstracts: str. 59.
6. Landeka Jurčević I, Đikić D, **Balta V**, Frančić T, Dragović-Uzelac V, Pedisić S (2017) Selective biodistribution of absorbed polyphenolic compounds from the *Prunus spinosa* L. flower extract in the organs of C57BL/6 mouse, Osijek, Book of Abstracts: str. 57.
7. Landeka Jurčević I, Đikić D, Fabijančić I, **Balta V**, Dragović-Uzelac V, Zorić Z (2018) Bioavailability polyphenolic compounds of *Prunus spinosa* L. flower extract in the organs of C57BL/6 mouse. 6. Međunarodni kongres nutricionista, Zagreb, Book of Abstracts: str. 163.
8. Landeka Jurčević I, Fabijančić I, Frančić T, Dragović-Uzelac V, **Balta V**, Đikić D (2018) Dietary Polyphenols (extract flower *Prunus spinosa* L.) and Type Diabetes mellitus. 9th International Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutritionists, Zagreb, Book of Abstracts: str. 145.