

# Učinak bioaktivnih molekula trnine (*Prunus spinosa* L.) na lipidnu peroksidaciju i antioksidacijski sustav mozga

---

Božić, Damjan

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:217:746210>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-03**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Damjan Božić

**Učinak bioaktivnih molekula trnine (*Prunus spinosa* L.) na lipidnu  
peroksidaciju i antioksidacijski sustav mozga**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za Animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Domagoja Đikića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja profesora biologije.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### UČINAK BIOAKTIVNIH MOLEKULA TRNINE (*Prunus spinosa* L.) NA LIPIDNU PEROKSIDACIJU I ANTIOKSIDACIJSKI SUSTAV MOZGA

Damjan Božić

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Ekstrakt cvijeta trnine (ECT) bogat je bioaktivnim molekulama – polifenolima. Metodom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti – masene spektrometrije (eng. skraćenica UPLC-MS) otkrivena su 32 polifenolna spoja, najviše iz grupa flavonola, flavan-3-ola i fenolnih kiselina. C57BL/6 miševi su dnevno dozirani sa 25 mg/kg tjelesne težine miša ECT polifenola u periodu od 28 dana. 1., 7., 14., 21. i 28. dana su mjerene maksimalne koncentracije pojedinih polifenola u mozgu te oksidacijski markeri: vrijednosti superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), ukupnog glutationa (GSH), malondialdehida (MDA) i karboniliranih proteina (PC). U mozgu mniševa tretiranih ECT detektirano je 11 polifenola statistički značajno povećanih ( $p \leq 0,05$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu (KO) s ukupnim povećanjem od oko 2,5 puta. Najviše koncentracije pokazuju kvercetin-rhamnoid, kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-pentozid, (-)-epigalokatehin-3-galat, te 4-O-kafeoilkvinična kiselina i 4-p-kumaroilkvinična kiselina. Zabilježena su smanjenja ( $p \leq 0,05$ ) lipidne peroksidacije (MDA) i oštećenih (karboniliranih) proteina (PC), te povećanja ( $p \leq 0,05$ ) koncentracije GSH i enzimske aktivnosti (SOD, CAT) 21. te 28. dan u ECT grupi. Zaključno, ti polifenoli uvelike doprinose antioksidacijskoj zaštiti reducirajući lipidnu peroksidaciju i oksidacijski stres.

(55 stranica, 7 slika, 3 tablice, 58 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: trnina, polifenoli, oksidacijski stres, markeri, MDA, PC

Voditelj: Dr. sc. Domagoj Đikić, prof..

Ocjenitelji: Dr. sc. Domagoj Đikić, prof.,

Dr. sc. Željka Vidaković Cifrek, izv. prof.,

Dr. sc. Damir Sirovina, viši predavač,

Dr. sc. Nada Oršolić, prof. (zamjena).

Rad prihvaćen: 18. rujna 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### THE EFFECT OF BIOACTIVE MOLECULES FROM BLACKTHORN (*Prunus spinosa* L.) ON LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDATION SYSTEM OF THE BRAIN

Damjan Božić

Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

The extract from the blackthorn flower (ECT) is rich with bioactive molecules – polyphenols. With Ultra-High Performance Liquid-Chromatography Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS) method 32 different polyphenolic compounds were detected, mostly from groups of flavonols, flavan-3-ols and phenolic acids. C57BL/6 mice received oral daily repeated doses of 25 mg/kg body weight of ECT polyphenols for 28 days. 1<sup>st</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> day were measured maximum brain concentrations of individual ECT polyphenols and brain oxidative markers; superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion (GSH), malodialdehyde (MDA) and protein carbonyls (PC). 11 polyphenols detected from the brain were found to be statistically significantly increased ( $p \leq 0.05$ ) in ETC group relative to the control group (KO) with a total increase of about 2,5-fold. Compounds with the highest concentrations measured are: quercetin-rhamnosid, quercetin-3-rutinosid, quercetin-pentosid, (-)-epigallocatechin-3-gallate, 4-O-caffeoylquinic acid and 4-p-coumaroylquinic acid. Lipid peroxidation (MDA) and protein carbonyls (PC) decreases ( $p \leq 0.05$ ), together with enzymatic activities (SOD, CAT) and concentrations of GSH increases ( $p \leq 0.05$ ) were recorded on 21<sup>st</sup> and 28<sup>th</sup> day in the ECT group. In conclusion, these polyphenols greatly contribute to antioxidant protection by reducing lipid peroxidation and oxidative stress.

(55 pages, 7 figures, 3 tables, 58 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: blackthorn, polyphenols, oksidative stress, markers, MDA, PC

Supervisor: Dr. sc. Domagoj Đikić, Prof.

Reviewers: Dr. sc. Domagoj Đikić, Prof.,

Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.,

Dr. sc. Damir Sirovina, Sr. Lecturer,

Dr. sc. Nada Oršolić, Prof. (substitute).

Thesis accepted: 18. 09. 2019.

# SADRŽAJ

SADRŽAJ .....	
<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1.</b> Botanički podaci o biljci trnini .....	<b>2</b>
<b>1.2.</b> Polifenolni biljni spojevi.....	<b>3</b>
1.2.1. Skupine polifenolnih spojeva (svojstva i razvrstavanje) .....	<b>4</b>
1.2.2. Polifenoli u ekstraktu cvijeta trnine .....	<b>8</b>
<b>1.3.</b> Važnost polifenolnih spojeva u biomedicinskim i farmakološkim istraživanjima i bioaktivno djelovanje u organizmu .....	<b>9</b>
1.3.1. Bioaktivno djelovanje polifenola cvijeta trnine u organizmu.....	<b>9</b>
1.3.2. Farmakokinetika .....	<b>10</b>
<b>1.4.</b> Bioapsorpcija i distribucija polifenolnih spojeva u organizmu .....	<b>11</b>
1.4.1. Polifenoli i procesi razgradnje u probavnom traktu.....	<b>13</b>
<b>1.5.</b> Bioapsorpcija i distribucija polifenola u mozgu .....	<b>15</b>
<b>1.6.</b> Oksidacijski stres i antioksidacijska zaštita .....	<b>16</b>
1.6.1. Reaktivne kisikove vrste i slobodni radikali.....	<b>16</b>
1.6.2. Oksidacijski stres .....	<b>18</b>
1.6.3. Antioksidacijska zaštita .....	<b>18</b>
1.6.4. Posljedice oksidacijskog stresa na stanične strukture.....	<b>21</b>
<b>2. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>25</b>
<b>2.1.</b> Materijali.....	<b>25</b>
2.1.1. Pripravci korišteni u istraživanju .....	<b>25</b>
2.1.2. Sastav ekstrakta trnine (ECT- ekstrakt cvijeta trnine) upotrijebljen u istraživanju .	<b>25</b>
2.1.3. Pokusne životinje.....	<b>28</b>
<b>2.2.</b> Metode .....	<b>30</b>
2.2.1. Izolacija i priprema tkiva za mjerenje biomarkera oksidacijskog stresa .....	<b>30</b>
2.2.2. Mjerenje markera oksidacijskog stresa.....	<b>31</b>
2.2.3. Statistička obrada podataka .....	<b>36</b>
<b>3. REZULTATI</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1.</b> Kvantifikacija i farmakokinetička obrada ( $C_{max}$ ) polifenola u mozgu.....	<b>37</b>
<b>3.2.</b> Lipidna peroksidacija u mozgu - koncentracija malondialdehida(MDA) .....	<b>39</b>
<b>3.3.</b> Vrijednosti karboniliranih proteina (PC) u mozgu .....	<b>40</b>
<b>3.4.</b> Vrijednosti ukupnog glutationa (GSH) u mozgu .....	<b>41</b>

3.5. Vrijednosti enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u mozgu .....	42
3.6. Vrijednosti enzimske aktivnosti katalaze (CAT) u mozgu .....	43
4. RASPRAVA .....	44
5. ZAKLJUČAK .....	50
6. LITERATURA .....	51
7. ŽIVOTOPIS .....	56

## 1. UVOD

Trnina (*Prunus spinosa* L.) je biljka koja samoniklo raste po Europi, a i šire. Ljekovitost trnine odavno je poznata u narodnoj medicini, ali je u današnje vrijeme njezina upotreba zapostavljena. Za konzumaciju se koristio najčešće plod, ali i listovi, grančice i cvjetovi najčešće u obliku raznovrsnih čajeva. Cvijet trnine sadrži raznovrsne bioaktivne spojeve – polifenole, kao što su kempferol, kvercetin, katehini, fenolne kiseline i slično, za koje je poznato da imaju izrazito antioksidacijsko djelovanje i blagotvorni učinak na zdravlje. Antioksidacijska sposobnost polifenolnih spojeva leži u njihovoj laganoj mogućnosti primanja kisika, tj. davanja vodika te kao takvo reducirajuće sredstvo neutraliziraju oksidacijske procese u organizmu. Pomoću te sposobnosti, hvatajući slobodne radikale, sprječavaju razvitak lančane reakcije i pojavu oksidacijskog stresa opasnog za organizam.

Oksidacijski stres je zapravo stanje biokemijske redoks neravnoteže u pomaku k oksidaciji, koje dolazi zbog suvišnog nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta, odnosno slobodnih radikala. Zbog brzog prekomjernog nakupljanja slobodnih radikala, prirodna antioksidacijska zaštita nije dovoljno efikasna u njihovom uklanjanju, pa se oštećuju stanične molekule; lipidi, proteini, nukleinske kiseline i ugljikohidrati. Iz toga proizlazi, da je oksidacijski stres uzročnik nastanka raznih patofizioloških i neurodegenerativnih poremećaja, poput infektivnih i kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, karcinoma, neurodegenerativnih bolesti (Alzheimerova i Parkinsonova bolest), zatim fibroze, hemolize te procesa starenja i dr. (Noorhajati i sur., 2012).

Mjerenjem priznatih biomarkera oksidacijskog stresa; aktivnosti enzima superoksid dismutaze, katalaze i ukupnog glutaciona te nakupljanje nusprodukta oksidacijskog stresa malondialdehida i karboniliranih proteina, dokazuje se oksidacijski stres u stanicama.

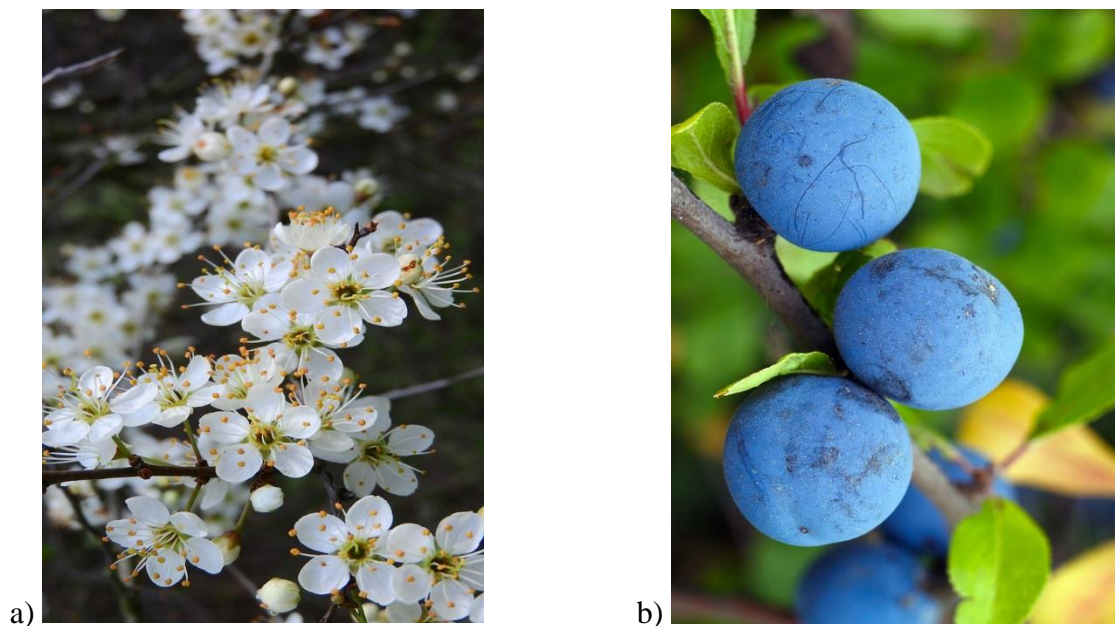


## 1.1. Botanički podaci o biljci trnini

### Trnina (*Prunus spinosa* L.)

Trnina u narodu poznata još kao i crni trn, trnula, trnavka, grmulja, divlja šljiva i dr., samonikla je vrsta roda šljiva (*Prunus*) i porodice ruža (*Rosaceae*). Smatra se da je trnina preteča današnjih kultiviranih sorti šljiva. Porijeklo trnine je područje srednje i istočne Europe, odgovara joj umjerena kontinentalna klima, pa se stoga proširila na prostore zapadne Azije, sjeverne Afrike, istočne Sjeverne Amerike, te na Novi Zeland (Ruiz-Rodriguez i sur., 2014; Yuksel, 2015).

Raste u obliku razgranatog grma ili niskog drveta 2-3 metara visine. U našim prostorima pojavljuje se uz rubove šuma, polja i putova. Listovi trnine dugački 2 do 5 centimetara jajastog su oblika i oštrog ruba. Trnina cvate prije listanja krajem ožujka, tijekom travnja i svibnja sitnim bijelim cvjetovima slatkastog mirisa (Slika 1, a). Cvjetovi se javljaju pojedinačno ili po 2-3 zajedno te prekrivaju gotovo cijelu biljku. Plod je plava koštunica 1-1.5 centimetara veličine (Slika 1, b). Vrhunac dozrijevanja je u kolovozu i rujnu, ali tada je plod još zelenkast i izrazito trpkog i kiselkastog okusa. Za ljudsku konzumaciju je pogodan tek nakon prvih mrazeva krajem studenog ili u prosincu, kad iz trpkog prelazi u brašnasto slatkasti okus (Yuksel, 2015).



Slika 1. Trnina (*Prunus spinosa* L.) a) cvjetovi b) plodovi (preuzeto iz Maky Orel, 2017).

Po nekim dokazima, trnina je konzumirana još u mlađem kamenom dobu, a poznata je bila i u starom Rimu. Odavno je poznata ljekovitost trnine u narodnoj medicini, ali je u današnje vrijeme njezina upotreba zapostavljena (Marchelak i sur., 2017). U ljekovite se svrhe prvenstveno koristio plod, ali i cvijet, list, kora i korijen. Od plodova se rade pekmez i sok ljekovitog djelovanja te probavni i laksativni liker. Pekmez se koristi kao sredstvo za reguliranje probave, a sok se koristi za ublažavanje simptoma upalnih bolesti u usnoj šupljini i grlu, te protiv bolesti bubrega i mjehura (Yuksel, 2015). Čaj od cvjetova koristi se protiv kašlja, za čišćenje krvi te za ublažavanje simptoma probavnih, mokraćnih i plućnih bolesti (Gelenčir, 1989). Čajem su se također ispirali kožni osipi (Veličković i sur., 2014).

## 1.2. Polifenolni biljni spojevi

Polifenoli su raznovrsne biološki aktivne molekule prisutne u prirodi najviše u biljnom carstvu. Pronađene su u nekim mikroorganizmima, ima ih i u eukariota (u hitinu insekta i rakova) i u hifama gljiva (Barros i sur., 2009).

Dakle, iako se pojavljuju i negdje drugdje u prirodi, glavni izvor polifenola su biljke. Za uspješan rast i razvoj većine biljaka zaslužni su primarni metaboliti (aminokiseline, nukleotidi organske kiseline,...). Polifenoli ne spadaju u primarne, već u sekundarne (specijalizirane) metabolite pa stoga nisu neophodni za uspješan rast i razvoj, ali u biljci obavljaju svakojuke druge (ne manje važne) funkcije. Često mogu biti veoma važni za biljku te se u nekim vrstama pojavljuju u vrlo visokim koncentracijama (Del Rio i sur., 2013).

Polifenoli su zapravo dio veće skupine fenilpropanoida odnosno fenolnih spojeva, te ih uz terpenoide i alkaloida ubrajamo u biljne sekundarne (specijalizirane) metabolite. Ove skupine se međusobno razlikuju po biosintetskom porijeklu.

Fenolni spojevi ili fenoli su molekule sastavljene od najmanje jednog benzenskog aromatskog prstena s priključenom jednom ili više hidroksilnih skupina (Del Rio i sur., 2013). Po definiciji, polifenole (kao sastavni dio fenola) karakteriziraju dva ili više aromatskih prstena (*poli* antička grčka riječ za *mnogi*) i barem dvije fenolne hidroksilne skupine. Međutim u polifenole se ubraja i nekoliko hidroksiliranih jedno prstenastih aromatičnih spojeva kao galna kiselina ili pirogalol (Milke i sur., 2018).

Najčešće se samo male količine pojedinih polifenola akumuliraju u biljkama. Ne nastaju svi spojevi u svakom trenutku jer njihova biosinteza često ovisi o ekološkim okidačima. Polifenolni spojevi u biljkama snažno se razlikuju među različitim biljnim tkivima i biljnim vrstama, a također su podvrgnuti sezonskoj i zemljopisnoj varijaciji (Milke i sur., 2018).

U biljkama polifenoli kao sekundarni metaboliti obavljaju različite funkcije;

- zaštita biljaka od herbivora i mikrobnih infekcija,
- privlačnost za oprašivače i životinje koje raznose sjemenje,
- alelopatski agensi,
- UV zaštitna sredstva,
- signalne molekule u formiranju korijenskih nodula za fiksiranje dušika i dr. (Del Rio i sur., 2013).

Određeni polifenoli pokazuju također zaštitnu ulogu na ljudsko zdravlje. Zaštita leži u njihovoj prirodnoj antioksidativnoj funkciji i sposobnosti uklanjanja slobodnih radikala, te samim time sprečavanju oksidativnog stresa. Stoga, neki polifenoli pokazuju pozitivne zdravstvene učinke kod ljudi i time imaju potencijal za pomoć u prevenciji ili liječenju određenih bolesti (Milke i sur., 2018).

Za razliku od vitamina, polifenoli nisu neophodni za kratkotrajnu dobrobit organizmu. Međutim, sve je više dokaza da skromni dugoročni unos polifenola, može imati povoljne učinke na prevenciju pojave karcinoma i kroničnih bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti, dijabetes i oštećenja kognitivnih funkcija, što su sve bolesti koje se danas javljaju s povećanom učestalosti u zapadnim populacijama (Del Rio i sur., 2013).

Stoga je zaštitna uloga polifenola na ljudsko zdravlje, kao dio sastojaka prehrane bogate voćem i povrćem, postala sve važnije područje istraživanja današnjice.

### **1.2.1. Skupine polifenolnih spojeva (svojstva i razvrstavanje)**

Polifenoli čine veliku skupinu različito kompleksnih spojeva i do danas je otkriveno preko 8000 strukturno različitih molekula (Del Rio i sur., 2013). Postanak svih polifenola kreće od zajedničkog intermedijera fenilalanina i ide putem šikiminske kiseline ili poliketidnom putu do finalnih polifenolnih spojeva (Scalbert i Williamson, 2000).

Postoje različite podjele polifenola s obzirom na njihovu biološku funkciju, strukturu i broj prstena, biosintetski put i dr. (Tsao, 2010). U radu ću se poslužiti jednom jednostavnom podjelom temeljenom prema broju i strukturi fenolnih prstena, gdje fenolne spojeve dijelimo na flavonoide i ne-flavonoide (prema Del Rio i sur., 2013).

## **A) FLAVONOIDI**

Flavonoidi čine većinu polifenola preko 4000 molekula (Del Rio i sur., 2013). Skupinu flavonoida odlikuje 15 ugljikovih atoma raspoređenih u 2 aromatska fenolna prstena međusobno povezana s mostom od 3 ugljikova atoma, shematski prikazano C6-C3-C6. Glavne podskupine flavonoida su flavonoli, flavoni, izoflavoni, flavanoni, antocijanidini i flavan-3-oli (Scalbert i Williamson, 2000). 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).

### **Flavonoli**

Najčešći flavonoli su kvercetin, kempferol, isorhamnetin i miricetin. Razno voće i povrće kao jabuke, običan i crveni luk sadrže velike količine kvercetina. Kvercetin, kempferol i drugi flavonoli široko su rasprostranjeni, a u prirodi dolaze u obliku glikozida, što znači da je na osnovnu strukturu polifenola vezan određeni šećer (Del Rio i sur., 2013).

### **Flavoni**

Flavoni su polifenoli koji se razlikuju strukturno od flavonola samo po tome što im nedostaje hidroksilna skupina na C-3. Najčešći flavoni su apigenin, luteolin, wogonin, i baicalein. Ti polifenoli nisu toliko široko rasprostranjeni kao prije navedeni flavonoli, ali su pronađene velike količine u celeru, peršinu i sličnim biljkama. Flavoni posjeduju veliku mogućnost supstituiranja u obliku hidroksilacije, metilacije, O- i C-glikolizacije i alkilacije (Del Rio i sur., 2013; Spencer, 2003).

### **Izoflavoni**

Strukturno su slični flavonima, ali se od njih razlikuju po tome što imaju svoj B prsten vezan na C-3 atom umjesto na C-2 atom kao u flavona. Izoflavoni se gotovo isključivo nalaze u mahunarkama, a najpoznatiji su daidzein i genistein iz soje. U prirodnom obliku se također pojavljuju u obliku glikozida, ali obrađeni proizvodi od soje najčešće gube šećernu

komponentu, pa se u sojinom mlijeku ili u tofu nalaze smanjene količine izoflavona u obliku aglikona. Sojine izoflavone, koji po strukturi nalikuju i na skupinu ne-flavonoida lignanima, a oboje strukturalno liče hormonu estrogenu, zajednički nazivamo i fitoestrogeni (Del Rio i sur., 2013). Smatra se da uvelike pomažu pri sprečavanju raka dojke i osteoporoze (Adlercreutz i Mazur, 1997).

### **Flavanoni**

Nemaju dvostruku vezu na karbonskom mostu te prisutnost kiralnog centra na C-2. Najpoznatiji su naringenin i hesperetin, a u prirodnom okruženju se pojavljuju kao hidroksilni, glikolizirani i *O*-metilizirani derivati. Flavanoni su zaduženi za gorkast okus agruma naročito naranča i grejpa, a najveće koncentracije se nalaze u kori (Del Rio i sur., 2013).

### **Antocijanidini**

Najčešći antocijanidini su pelargonidin, cijanidin, delfinidin, peonidin, petunidin i malvadin. Pronalazimo ih u cvijeću i plodovima raznih biljaka gdje daju karakteristične boje od crvenih i narančastih do plavih i ljubičastih. Kao i većina flavonoida, ti polifenoli se u prirodi tj. u biljnim tkivima pojavljuju u obliku glikozida (vezani sa organskom kiselinom ili šećernom komponentom), te ih tada nazivamo antocijani (Del Rio i sur., 2013).

### **Flavan-3-oli (flavanoli)**

Od drugih flavonoida se razlikuju po 2 kiralna centra na C-2 i C-3 atomu te stoga svaki spoj može poprimit 4 različite prostorno izomerne strukture obilježene sa (+) i (-). Grupa flavan-3-ola je zapravo najkompleksnija podskupina flavonoida, jer se unutra nalaze polifenoli u rasponu od monomernih jedinica, pa prema dimernim, oligomernim i polimernim kondenzatima nazvanim proantocijanidini. Polimerni proantocijanidini su poznati i pod nazivom kondenzirani tanini. Sastoje se od mnogo čak do 50 podjedinica monomernih flavan-3-ola (epi)katehina i (epi)galokatehina. Za flavan-3-ole je poznato da nisu konjugirani sa šećerima tvoreći glikozide, što je značajno za ostale flavonoide, već se gotovo uvijek prirodno nalaze u aglikonskom obliku. Zeleni čaj sadrži vrlo velike količine monomernih flavan-3-ola epikatehina, epigalokatehina i druge (Spencer, 2003).

## **B) NEFLAVONOIDI**

U ne-flavonoide ubrajamo one polifenole koji nemaju klasičnu 15C ugljičnu strukturu značajnu za flavonoide. Značajni u prehrani su fenolne kiseline, stilbeni i lignani.

### **Fenolne kiseline**

Fenolne kiseline se dijele u dvije podgrupe; na derivate benzojeve kiseline i derivate cimetine kiseline (Del Rio i sur., 2013). Struktura derivata benzojeve kiseline je C6-C1, dakle na jedan fenolni aromatski prsten se veže karboksilna skupina sa jednim C atomom, dok je struktura derivata cimetine kiseline C6-C3, što znači da se na jedan fenolni aromatski prsten nadovezuju 3 atoma ugljika s karboksilnim kiselinskim završetkom (Tsao, 2010).

Najpoznatije benzojeve kiseline su galna kiselina, elaginska kiselina i protokatehinska kiselina. Najraširenija fenolna kiselina je galna kiselina koja se pojavljuje kao kompleksni šećerni ester u galotanimima, a ima ih mnoštvo u zelenom čaju, mangu i sličnom voću. Elaginska kiselina se isto tako pojavljuje u esternom kompleksnom obliku elagitanin, a najveće koncentracije su u malinama, kupinama, jagodama i naru (Del Rio i sur., 2013).

U derivate cimetine kiseline ubrajamo kafeinsku kiselinu, kumarinsku kiselinu, ferulinsku kiselinu i dr. Te kiseline se često povezuju zajedno ili sa drugim kiselinama u estere i druge kompleksne spojeve (npr. klorogenična kiselina). U takvim oblicima se nalaze u konzumnom voću kiviju, šljivama, trešnjama, grožđu, te u kavi i drugdje (Manach i sur., 2004).

### **Stilbeni**

Stilbeni imaju C6-C2-C6 strukturu i zapravo su fitoaleksini, spojevi koje biljke proizvode kao odgovor na bolest, ozljedu i stres. U hrani su zastupljeni u ekstremno niskim koncentracijama. Najznačajniji stilben resveratrol se u esternom obliku nalazi u kikirikiju, određenom bobičastom voću, grožđu, a najveći izvor je crno vino (Smoliga i sur., 2011; Pasinetti i sur., 2015). Međutim, njegova biodostupnost je veoma mala skoro pa zanemariva (Del Rio i sur., 2013).

### **Lignani**

Lignani su polifenolni spojevi koji se sastoje od dvije fenilpropanske jedinice. Ne smiju se zamijeniti s ligninima, jer su lignani dimeri i apsorbiraju se u crijevu, dok su lignini kompleksni polimeri, daju čvrstoću biljci i u ljudskim crijevima se ne mogu razgraditi. Najpoznatiji lignani su secoisolariciresinol i matairesinol kojih je najveća koncentracija u

lanenim sjemenkama, zatim u sezamu, a ima ih i u voću, ali u puno manjoj koncentraciji. Lignani se uz izoflavone zbog blagog estrogenskog djelovanja ubrajaju u fitoestrogene (Del Rio i sur., 2013).

### 1.2.2. Polifenoli u ekstraktu cvijeta trnine

Olszewska i Wolbiś (2001), Marchelak i sur. (2017) i Elez Garofulić i sur. (2018) proučavali su cvijet trnine (*Prunus spinosa* L.) i do tada poznatim kemijskim i spektralnim metodama dokazali petnaestak flavonoida iz skupine flavonola (kempferola, kvercetina i sličnih spojeva) u ekstraktu cvijeta trnine (Olszewska i sur., 2001; Olszewska i Wolbiś, 2001; Olszewska i Wolbiś, 2002). Najkorištenija i najosjetljivija metoda u tim istraživanjima bila je metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC – high performance liquid chromatography) koju su prvi upotrijebili i opisali Christ i Müller (1960), dok su Elez Garofulić i sur. (2018) primijenili još noviju i osjetljiviju UPLC-MS metodu. UPLC (ultra-high performance liquid chromatography) je sustav koji se sastoji od sustava detekcije dvostrukog detektora polja fotodioda (PDA - photodiode array) i pozitivne ionske elektrosprej ionizacije (ESI) tandem masene spektrometrije (MS). Taj današnji UPLC-PDA-ESI-MS sustav (skraćeno UPLC-MS) je puno razvijeniji, osjetljiviji i precizniji. Marchelak i sur. (2017) su pomoću kvalitativne UPLC-MS analize otkrili čak više od 50 polifenolnih spojeva u ekstraktu cvijeta trnine, koji se mogu svrstati u tri važne skupine: flavonoli (kempferol, kvercetin i dr.), flavan-3-oli (razni izomeri katehina i proantocijanidini) i fenolne kiseline (kafeinska kiselina, klorogenična kiselina i sl.). Flavonola je bilo najviše tridesetak, zatim fenolnih kiselina preko 10 i nekoliko važnih flavan-3-ola.

Sva prethodna istraživanja bila su prvenstveno usmjerena na izolaciju pojedinačnih spojeva, dok je rad Marchelak i sur. (2017) prvi prikazao sveobuhvatni LC-MS profil cvijeta trnine. U ovom istraživanju koristit će UPLC-MS analizu (napravljenju prema Elez Garofulić i sur. (2018) na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu) usmjerenu na izolaciju pojedinačnih polifenola (ne sveobuhvatni LC-MS profil), ali u konačnici očekujem da se identificiraju određeni polifenoli raspoređeni u spomenute tri glavne skupine.

### **1.3. Važnost polifenolnih spojeva u biomedicinskim i farmakološkim istraživanjima i bioaktivno djelovanje u organizmu**

U današnje vrijeme polifenoli uživaju sve veće priznanje ne samo znanstvene zajednice nego i široke javnosti. Redovna konzumacija namirnica bogatih polifenolima pokazala se benificijalnom za poboljšanje tj. održavanje ljudskog zdravlja. Pozitivan učinak zapravo je njihova sposobnost uklanjanja oksidativno generiranih slobodnih radikala i njihova jaka antioksidacijska, protuupalna, antimikrobna i antitumorska djelatnost (Wang i sur., 2013). Stoga polifenoli i njihovi derivati djeluju kao obećavajući prehrambeni dodaci u prevenciji i liječenju kroničnih i degenerativnih bolesti uključujući rak, kardiovaskularne bolesti i bolesti povezanih sa starenjem (Quideau i sur., 2011, Wang i sur., 2013). Unazad dvadesetak godina polifenoli se intenzivno multidisciplinarno istražuju, što uključuje istraživanja u biljnoj fiziologiji, analitičkoj kemiji, agronomiji, prehrambenoj tehnologiji, nutricionizmu, a naročito u farmakologiji i medicini (Quideau i sur., 2011). Napredni pristup budućim istraživanjima uključuje; gensku terapiju za proizvodnju više antioksidansa u tijelu, proizvodnju genetski modificiranih biljnih proizvoda s višom razinom antioksidansa, izradu sintetičkih antioksidativnih enzima, uporabu novih biomolekula i funkcionalne hrane obogaćene antioksidansima (Devasagayam i sur., 2004).

Danas se intenzivno radi na tome da se modificira biodostupnost i farmakokinetika biljnih polifenola, kako bi se potencijalno pojačala isporuka polifenola i optimizirala njihova efikasnost u ljudskom organizmu (Nabavi i sur., 2017).

#### **1.3.1. Bioaktivno djelovanje polifenola cvijeta trnine u organizmu**

Trnina je korištena kroz povijest kao medicinska biljka diljem Europe, a cvijeće je bilo najpopularnije u središnjem i istočnom dijelu kontinenta. Etnofarmakološki izvori ukazuju na vazoprotektivno, protuupalno, diuretičko i detoksikacijsko djelovanje cvijeta trnine. Ti izvori dokumentiraju uporabu cvjetova putem recepta sa biljnim sastojcima (najčešće čajevi i kreme) koji se tradicionalno primjenjuju, primjerice; za liječenje crijeva, poremećaja dišnog sustava, ali i raznih srčanih tegoba, kao što su miokarditis, srčana neuroza i ateroskleroza (Marchelak i sur., 2017).



Danas se zna da se ti blagotvorni učinci u cvjetovima pripisuju polifenolima. Njihova djelotvornost u borbi protiv kardiovaskularnih bolesti, proizlazi iz sposobnosti da utječu na dva međusobno ovisna patološka procesa oksidativnog/nitratnog stresa i upale. Kao sakupljači slobodnih radikala, kelatori metala, inhibitori protuupalnih enzima i modifikatori staničnih signalnih puteva, polifenoli štite stanice i funkcionalne elemente krvotoka od lipidne peroksidacije, proteinske nitracije, kroničnih upala i oksidacijskog oštećenja DNA. Što su zapravo vazodilatatori, vazoprotektivni, antiaterosklerotički, antitrombotički i antiapoptotski učinci. U globalu polifenoli i njihovi metaboliti mogu uvelike povećati ukupni antioksidativni kapacitet krvne plazme i time toleranciju tjelesnih tkiva protiv upala, ishemijskih ozljeda i sličnih problematičnih stanja (Marchelak i sur., 2017).

### 1.3.2. Farmakokinetika

Farmakokinetika je grana farmakologije, znanosti koja se bavi proučavanjem sudbine lijeka, odnosno spojeva (npr. polifenola i njihovih metabolita) u tijelu u smislu njihove apsorpcije, raspodjele, metabolizma i izlučivanja, te vremenskog tijeka tih zbivanja (Linčir, 2012; Francetić i Vitezić, 2007). Za razliku od farmakodinamike, koja proučava promjene što ih lijek (polifenol) izaziva na biološkom objektu i mehanizam tih promjena (Linčir, 2012). Osnovni parametri farmakokinetike su; apsorpcija, metabolizam, distribucija i eliminacija. Drugim riječima, farmakokinetičari se bave proučavanjem puteva spojeva u organizmu, te na temelju biodostupnosti tj. koncentracija izračunavaju određene varijable za pojedini spoj. Neke od varijabli koje su značajne u farmakokinetici su stupanj apsorpcije, bioraspoloživost i klirens (Francetić i Vitezić, 2007).

Stupanj apsorpcije je definiran konstantom apsorpcije  $k_a$ . Što je stupanj apsorpcije veći promatrani spoj će postizati višu vršnu koncentraciju u plazmi  $C_{max}$ . Isto tako je i vrijeme do postizanja te vršne koncentracije u plazmi  $T_{max}$  kraće nego kod lijekova s manjim stupnjem apsorpcije (Francetić i Vitezić, 2007).  $C_{max}$  je dakle parametar koji označuje maksimalnu koncentraciju promatranog spoja u plazmi, a  $T_{max}$  je parametar koji ukazuje vrijeme koje je potrebno da se dođe do  $C_{max}$ . Uz  $C_{max}$  i  $T_{max}$  usko je povezan i AUC (area under the curve). AUC je parametar koji dobijemo ako u graf uvrstimo  $C_{max}$ ,  $T_{max}$  i eliminaciju spoja (klirens), te nam predstavlja krivulju koncentracije spoja u plazmi u odnosu na vrijeme (Francetić i Vitezić, 2007). Ona prvo raste do točke  $C_{max}$  u  $T_{max}$ , a zatim opada do totalne eliminacije iz

organizma u određenom vremenu. Bioraspoloživost (biodostupnost) nekog spoja označuje dio ukupne primijenjene doze toga spoja koji je nepromijenjen dospio u cirkulaciju i obično se označava sa  $f$  (fraction). Biodostupnost je definirana kao omjer između primljene (unesene) koncentracije i koncentracije koja se naposljetku nalazi u sistemske cirkulaciji (Francetić i Vitezić, 2007). Klirens (Clr) je naziv za eliminaciju nekog spoja iz plazme najvećim dijelom bubregom preko mokraće i manje jetrom putem žući. On zapravo označuje brzinu eliminacije spoja iz organizma. Klirens je definiran kao volumen plazme iz kojeg se u jedinici vremena ukloni neka tvar i izluči urinom, a izračunava se u mL/min (Linčir, 2012).

U ovom istraživanju najvažnija varijabla je  $C_{max}$ , što je zapravo najveća koncentracija promatranog polifenola u određenom promatranom vremenu (tijekom 28 dana) u tkivu (u mozgu miševa). Obradivanjem podataka (UPLC-MS analize sa Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta)  $C_{max}$  određenih polifenola u homogenatu mozga i njihovim međusobnim uspoređivanjem te uspoređivanjem sa kontrolnom skupinom, doći će do krajnjih zaključaka važnih za ovo istraživanje.

#### **1.4. Bioapsorpcija i distribucija polifenolnih spojeva u organizmu**

Polifenoli koji su najviše zastupljeni u ljudskoj prehrani, nisu nužno i najaktivniji unutar tijela. Najčešće zato što imaju nižu aktivnost unutar organizma, zato što su slabo apsorbirani iz crijeva, velik postotak je metabolizirani ili su brzo eliminirani. Metaboliti koji dopiru u krv i u ciljane organe mogu se nakon djelovanja probavnog trakta i jetre uvelike razlikovati u biološkoj aktivnosti od prirodnih oblika koji se unesu hranom (Manach i sur., 2004). Krajnji antioksidacijski potencijal i potencijalna bioaktivnost polifenola unesenih hranom ovise o apsorpciji, metabolizmu, distribuciji i izlučivanju tih spojeva unutar tijela, a dobiveni metaboliti najčešće su smanjene koncentracije i smanjenih svojstava (Spencer, 2003).

Nisu svi polifenoli podjednako apsorbirani što proizlazi iz njihove prostorne strukture, intenzitetu metabolizma, općem stanju organizma, starosti i mnoštvu drugih uvjeta unutar organizma. Najbolje apsorbirani polifenoli su galna kiselina i izoflavoni, a slijede katehini, flavanoni i glukozidi kvercetina. Najmanje apsorbirani polifenoli su proantocijanidini, galokatehini iz čaja i antocijanini. Slabo su dostupni podaci za neke manje istraživane skupine kao hidroksicinaminske kiseline i neke druge polifenole (Manach i sur., 2005).

Spomenuto je da put polifenola tijelom možemo podijeliti na nekoliko važnih parametra: apsorpcija (absorption), distribucija (distribution), metabolizam/biotransformacija (biotransformation) i eliminacija (elimination). Polifenoli uneseni hranom prolaze probavnim traktom i tamo su apsorbirani, te naposljetku dolaze u sistemsku cirkulaciju. Apsorpcija je zapravo put prolaska spojeva kroz epitelne stanice u intersticij te zatim kroz endotel krvnih žila u krvnu struju (Linčir, 2012). Velika većina spojeva ne prolazi nepromijenjena tim putem, nego su podvrgnuti metabolizmu u lumenu crijeva ili naknadno portalnom cirkulacijom u jetri.

Biotransformacija ili metabolizam je proces razgradnje i sinteze uz pomoć probavnih enzima u kojem se spojevi mijenjaju i prilagođuju za iskorištavanje u organizmu i/ili za izlučivanje iz organizma. Najčešće proces metabolizma dijelimo u dvije faze. Reakcije faze I su nesintetske, a odnose se na cijepanje (oksidacija, redukcija, hidroliza) molekule, odnosno na stvaranje nove ili modificiranje već postojeće funkcijske skupine. Reakcije faze II su sintetske, a odnose se na konjugaciju tj. spajanje molekule s jednom endogenom tvari (npr. glicin, glukuronska ili sumporna kiselina). Određeni spojevi podliježu samo reakcijama I ili II faze, a mogu i obje. Metaboliti koji nastaju su polarniji i prilagođeni organizmu za uporabu (Linčir, 2012). Apsorpcijom metaboliti iz lumena tankog i/ili debelog crijeva, preko epitelnih stanica, odlaze u krv, te slijedi distribucija. Metaboliti korisni za organizam se distribuiraju krvlju do ciljanih organa (npr. mozak), a nepotrebni se distribuiraju do bubrega ili jetre gdje se vrši izlučivanje. Izlučivanje je proces eliminacije i odstranjivanja negativnih i neiskorištenih spojeva metabolizma putem bubrega u obliku urina i/ili putem jetre uz pomoć žuči (Manach i sur., 2004). Određeni postotak metabolita, ovisno o sastavu, može proći kroz probavu bez da se apsorbira, te se izbacuje fekalijama. Isto tako određeni postotak metabolita može biti metaboliziran uz pomoć debelo crijevne mikrobiote pa se tek tamo apsorbira (Manach i sur., 2004).

Zaključno, uočava se da biodostupnost polifenola ovisi o mnoštvu čimbenika unutar organizma, pa neki spojevi koji su široko dostupni u hrani, ne moraju nužno biti i široko biodostupni.

#### 1.4.1. Polifenoli i procesi razgradnje u probavnom traktu

Prilikom unosa polifenola hranom, u ustima na njih djeluju probavni enzimi sline. Većina polifenola je u glikozidnom obliku, te na njih enzimi sline nemaju učinka. Oni samo prolaze nepromijenjeni dalje jednjakom do želuca. Međutim utvrđeno je da slina ipak ima malo utjecaja na stabilnost katehina (flavan-3-oli) u zelenom čaju. Za razliku od ostalih flavonoida, flavan-3-oli se u prirodnom okruženju nalaze u aglikanskom obliku (Spencer, 2003).

U želučanom kiselom okruženju također nema djelovanja na glikozide polifenola. Niski pH nema učinka niti na monomerne katehine, međutim, pokazalo se da niski pH iz želučanog soka djeluje na stabilnost dimernih i oligomernih flavan-3-ola iz kaka. Ti proantocijanidini se pod djelovanjem niskog pH s vremenom raspadaju na epikatehinske monomerne i dimerne jedinice. Ako su pH uvjeti u želucu povoljno niski, doći će do brzog cijepanja proantocijanidina i nastat će manje flavanolske jedinice koje ulaze dalje u tanko crijevo (Spencer, 2003).

Dok u gornjem djelu probavnog trakta gotovo da i nema nekakvog metaboličkog djelovanja, u tankom crijevu dolazi do pravog metabolizma polifenolnih glikozida. Mnogi čimbenici utječu na stopu apsorpcije polifenolnih spojeva u tankom crijevu kao što su fizikalno kemijski čimbenici; molekularna veličina, lipofilnost, topivost, pKa, te biološki čimbenici; vrijeme transporta iz želuca u crijevo, pH lumena crijeva, permeabilnost membrane i efikasnost metabolizma (Spencer i sur., 1999).

Flavonoidni glikozidi su u prednjem dijelu tankog crijeva (jejunum) pocijepani intestinalnim enzimima (glukozidaza). U toj fazi I metabolizma, kida se esterska veza i odvaja se šećerna komponenta glikozida, te ostaje polifenolni aglikan. U fazi II metabolizma jetreni enzimi kataliziraju vezanje polifenolnog aglikana sa glukuronilskom kiselinom u procesu glukuronidacije te se time dobiju polarni (hidrofilni) glukuronidi, koji se lako prenose krvlju. Glukuronidacija je najčešći proces faze II metabolizma konjugacije, ali se konjugirati mogu spojevi i procesom metilacije i sulfatacije. Dok se cijepanje odvija u jejunumu, glukuronidacija se odvija u stražnjem dijelu tankog crijeva ileumu. Ti glukuronidi se apsorbiraju preko epitela ileuma u limfu i dospiju u krv. Zatim se krvlju distribuiraju po cijelom tijelu, gdje su zbog svoje polarne prirode lako dostupni za iskorištavanje (D'Archivio i sur., 2010).

Taj put metabolizma prolazi većina flavonoida (u glikozidnom obliku), osim flavan-3-ola koji prolaze samo fazu II glukuronidacije, jer se već nalaze u aglikonskom obliku. Postoje i iznimke kao kvercetin-3-glukozid i rutin koji nisu metabolizirani, već su apsorbirani u takvom nepromijenjenom glikozidnom obliku. Neflavonoidi jednostavne monomerne fenolne kiseline i slični spojevi sa jednim aromatskim prstenom, nisu skloni glukuronidaciji te prolaze eventualno samo fazu I metabolizma i apsorbiraju se putem jejunuma i ileuma većinom u aglikonskom obliku (Spencer i sur., 1999).

Stopa apsorpcije u tankom crijevu je relativno mala nekih 10-20%. Na ostalu većinu polifenola ne djeluju intestinalni metabolički enzimi pa nisu apsorbirani, već prolaze nepromijenjeni kroz tanko crijevo i odlaze u debelo crijevo (Spencer i sur., 1999).

Većina polifenola (80-90%) dolazi u debelo crijevo i tek tu započinje njihov metabolički put (Spencer i sur., 1999). U to su uključeni i oni polifenoli koji su apsorbirani u tankom crijevu i konjugirani u jetri, te zatim natrag transportirani u lumen crijeva bilo izravno ili preko žuči. U debelom crijevu na njih djeluje bogata crijevna mikroflora ( $10^{12}$  mikroorganizama/cm<sup>3</sup>), koja svojim katalitičkim i hidrolitičkim djelovanjem razgrađuje polifenole stvarajući cijelu paletu različitih metabolita (Spencer, 2003). Na primjer, bakterijski enzimi mogu katalizirati mnoge reakcije uključujući hidrolizu, dehidroksilaciju, demetilaciju, cijepanje fenolnog prstena, dekarboksilaciju, kao i brzu dekonjugaciju. Za razliku od ljudskih enzima, mikroflora katalizira i cijepanje flavonoidnih struktura na jednostavnije molekule, poput fenolnih kiselina (Spencer, 2003). Za sada je nejasno u kojem opsegu su te fenolne kiseline apsorbirane u kolonu. Međutim, detektirane su u plazmi, te su često dalje konjugirane i metabolizirane u jetri. Preostali spojevi izvedeni iz flavonoida, ali i određeni postotak netaknutih polifenola ostaju u crijevima i izmetom izlaze van. Metaboliti su krvlju distribuirani po tijelu, ulaze u stanice i pružaju im zaštitu od oksidativnog stresa te druge beneficije. A neiskoristivi metaboliti se preko bubrega mokraćom ili jetrom putem žuči uklanjaju iz tijela (Del Rio i sur., 2013).

## 1.5. Bioapsorpcija i distribucija polifenola u mozgu

Uvidjeli smo da je biodostupnost polifenola dosta niska, tj. razina iskoristivih spojeva nakon djelovanja metabolizma, koji naposljetku dopijaju u krvotok, je relativno malena. Još je manji postotak spojeva koji krvotokom dopijaju do mozga i tek tu moraju svladati krvno-moždanu barijeru. Isto tako, polifenoli koje unosimo hranom prolaze daleki put kroz probavni trakt gdje ih metaboliziraju probavni enzimi tankog crijeva, jetreni enzimi te naposljetku i microbiota debelog crijeva, pa se u različitim promijenjenim oblicima (konjugacija) apsorbiraju i dopijevaju u krvotok. Te reakcije često mijenjaju prvobitna kemijska svojstva polifenolnih metabolita, što rezultira potencijalno novim biološkim aktivnostima (Manach i sur., 2004).

Nekoliko novijih studija su pokazale kliničke učinke polifenolnih spojeva u neurodegenerativnim i neurološkim patologijama. Neuroprotektivna svojstva tih polifenola mogu smanjiti upale cerebralnog tkiva povezane sa degenerativnim bolestima (Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, ...) i potencijalno povećati pamćenje, učenje i kognitivne sposobnosti (Nabavi i sur., 2017). Istraženo je da polifenoli djelujući antioksidativno mogu pružati zaštitu protiv neurodegenerativnih promjena povezanih sa cerebralnom ishemijom, predstadijom moždanog infarkta (Tressera-Rimbau i sur., 2017). Polifenoli također doprinose mehanizmima povezanim s promicanjem otpornosti prema poremećajima raspoloženja i kognitivnoj disfunkciji kao odgovoru na stres (Ward i Pasinetti, 2016).

Kroz novija istraživanja su identificirani polifenoli koji imaju potencijala penetrirati iz krvi u mozak, ili povećati protok krvi u mozgu. Ti polifenoli su neki flavan-3-oli; katehin, epikatehin i polimerni proantocijanidini iz grožđa, flavonoli; kvercetin-3-galaktozid i kvercetin-3-glukozid iz jabuka i antocijanini iz borovnice (Chen i sur., 2015) te neke fenolne kiseline (González-Sarriás i sur., 2017). Chen i sur. (2015) su proučavali polifenole iz ekstrakta grožđa i jabuke, te borovnice i njihovu distribuciju krvlju i apsorpciju u mozak. Što se tiče polifenola iz ekstrakta grožđa i jabuke, u krvnoj plazmi najveću biodostupnost ima katehin-O- $\beta$ -glukuronid, pa epikatehin-O- $\beta$ -glukuronid, zatim njihovi metilirani metaboliti, a najmanju biodostupnost imaju metaboliti kvercentina od njih kvercentin- $\beta$ -glukuronid. Niska razina kvercetinovih metabolita je stoga jer glikozide zahvaća metabolizam u jačem opsegu nego flavan-3-ole koji su prirodno u aglikonskom obliku. Također ti spojevi prelaze barijeru krv mozak, te se u mozgu akumuliraju u koncentracijama sličnim kao u plazmi

katehin/epikatehin-O- $\beta$ -glukuronid > 3'-O-metilirani-katehin/epikatehin- $\beta$ -glukuronid > kvercetin- $\beta$ -glukuronid (Chen i sur., 2015).

U istraživanju su proučavali i koncentracije polifenola lokaliziranih po regijama mozga. Pokazalo se da su metaboliti flavan-3-ola i kvercetina pronađeni u svim regijama mozga bez obzira na početnu dozu, što upućuje ne to da ti polifenoli prolaze barijeru krv mozak već pri vrlo niskim koncentracijama u krvi. Suprotno od toga, mnogi antocijanini (dozirani u malim koncentracijama) nisu pronađeni u svim regijama mozga. Dokazano je i da se derivati polifenola primarno akumuliraju u malom mozgu (Chen i sur., 2015).

Neke fenolne kiseline (npr. 3,4-dihidroksifenilacetatna kiselina i 3,4-dihidroksifenilpropionidna kiselina) također imaju snažnu neuroprotektivnu aktivnost (González-Sarrías i sur., 2017). To su derivati nastali djelovanjem crijevne mikrobiote, dokazani su u krvi poslije konzumiranja hrane biljnog porijekla bogate proantocijanidima i flavan-3-olima u obliku kakaa, čaja ili vina. Te i njima slične fenolne kiseline prolaze barijeru krv-mozak (González-Sarrías i sur., 2017).

Otkriće polifenola s novim prirodnim proizvodima, obećava značajan napredak u mnogim područjima medicine, posebice neurologiji i psihijatriji (Ward i Pasinetti, 2016). Nažalost, potrebno je provesti još mnoga istraživanja o strogoj bioraspoloživosti i karakterizaciji bioaktivnih metabolita. Upravo iz ovog razloga postavio sam cilj svog rada prema istraživanju biodostupnosti u mozgu i antioksidativnih učinaka polifenola.

## **1.6. Oksidacijski stres i antioksidacijska zaštita**

### **1.6.1. Reaktivne kisikove vrste i slobodni radikali**

Reaktivne kisikove vrste (reactive oxygen species - ROS) su skupina vrlo reaktivnih molekula koje nastaju kao usputni produkt normalnog metabolizma kisika u organizmu, najviše u mitohondrijima, ali i drugdje u stanici (Noorhajati i sur., 2012). Uz ROS značajne su i reaktivne dušikove vrste (reactive nitrogen species – RNS). U te reaktivne vrste ubrajamo; superoksidi ( $O_2\bullet$ ), hidroksili ( $HO\bullet$ ), peroksidi ( $ROO\bullet$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), slobodni kisik ( $O_2$ ), dušikove okside ( $NO\bullet$ ), peroksinitrate ( $ONOO\bullet$ ), hipokloride ( $HOCl$ ) i dr. (Tablica 1) (Noorhajati i sur., 2012).

Tablica 1. Reaktivne kisikove vrste (preuzeto i prilagođeno iz Štefan i sur., 2007).

Slobodni radikali		Čestice koje nisu slobodni radikali	
Superoksidni	$O_2^{\cdot-}$	Vodikov peroksid	$H_2O_2$
Peroksidni	$ROO^{\cdot}$	Hipokloritna kiselina	$HClO$
Hidroksilni	$OH^{\cdot}$	Ozon	$O_3$
Alkoksilni	$RO^{\cdot}$	Singletni kisik	$^1O_2$
Hidroperoksilni	$HO_2^{\cdot}$		

U normalnim zdravim stanicama, niska količina ROS-a igra važnu ulogu u signalizaciji stanice, a postoje i mehanizmi uklanjanja suviška tih molekula zbog održavanja homeostaze. Međutim, prilikom okolišnog stresa (npr. vrućina, izloženost UV zrakama, prisutnost određenih bolesti i slično) nakupe se velike količine ROS-a i mogu svojom reaktivnošću oštetiti dijelove stanica (lipide, proteine, ugljikohidrate i DNA) te uzrokovati metaboličke poremećaje, nefunkcionalnost i naposljetku smrt stanice (Devasagayam i sur., 2004).

Molekula kisika u osnovnome stanju ima dva nesparena elektrona te djeluje kao snažno oksidacijsko sredstvo. Primanjem jednog elektrona nastaje superoksidni radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), a primanjem sljedećeg elektrona nastaje ( $O_2^{2-}$ ) koji protoniranjem prelazi u vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ). (Štefan i sur., 2007) U staničnim strukturama ROS oksidacijom uzima elektron od susjednih staničnih molekula te nastaju slobodni radikali. Po definiciji slobodni radikal bi bila svaka molekula koja u svojoj vanjskoj orbitali ima barem jedan slobodan, nesparesni elektron (Devasagajam i sur., 2004). Zbog tog nesparenoga elektrona slobodni radikali su vrlo reaktivni (Štefan i sur., 2007). U toj velikoj reaktivnosti, životni vijek slobodnih radikala je vrlo kratki, mjerljiv u mikro i nano sekundama, jer brzo oduzimaju elektron drugim molekulama stvarajući time nove slobodne radikale u lančanoj reakciji (Sies, 1997). Time dolazi do oštećenja dijelova stanica, lipida, proteina, ugljikohidrata ili DNA, a ta oštećenja prethode raznim bolestima (Noorhajati i sur., 2012).



### 1.6.2. Oksidacijski stres

Unutar stanice zbog nakupljanja ROS-a, a time i suviška slobodnih radikala i nedovoljno brzog uklanjanja tih spojeva, naposljetku dolazi do narušavanja biokemijske redoks ravnoteže i pomaka u smjeru oksidacije. Takvo stanje neravnoteže naziva se oksidacijski (oksidativni) stres (Sies, 1997). Najjednostavnija definicija oksidacijskog stresa je promjena u razinama ROS-a (Noctor i sur., 2016).

Oksidacijski stres je uzročnik nastanka raznih patofizioloških i neurodegenerativnih poremećaja, poput: infektivnih i kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, karcinoma, neurodegenerativnih bolesti (Alzheimerova i Parkinsonova bolest), zatim fibroze, hemolize te procesa starenja (Noorhajati i sur., 2012).

### 1.6.3. Antioksidacijska zaštita

Protiv akumuliranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i stvaranja slobodnih radikala, tj. protiv nastanka i prolongacije oksidacijskog stresa, organizam se bori antioksidacijskom zaštitom. Antioksidansi su supstance koje neutraliziraju slobodne radikale i sprečavaju ih u njihovoj akciji (Devasagajam i sur., 2004; Sies, 1997).

U antioksidacijsku zaštitu tijela ubrajamo: superoksid dismutaze (SOD), katalazu (CAT), glutation peroksidaze (GPx)/reduktaze, tioredoksin, tiole i slične spojeve, ali i vitamine E, C, carotenoide, flavonoide i druge polifenole (Devasagajam i sur., 2004).

Funkcija antioksidansa u tijelu je sprečavanje stvaranja ROS-a, neutralizacija već stvorenih slobodnih radikala i zaštita stanice od razornog djelovanja radikala čime se sprječava oksidacijski stres te pojava i razvoj bolesti vezanih uz njega. Antioksidansi se najčešće unose hranom u organizam i/ili nastaju u stanici.

Djelovanje antioksidansa može se opisati sljedećim mehanizmima:

- uklanjanjem kisika ili utjecanjem na smanjivanje lokalnih koncentracija kisika
- uklanjanjem metalnih iona
- uklanjanjem ciljnih ROS-a kao superoksida ili vodikova peroksida
- uklanjanjem slobodnih radikala

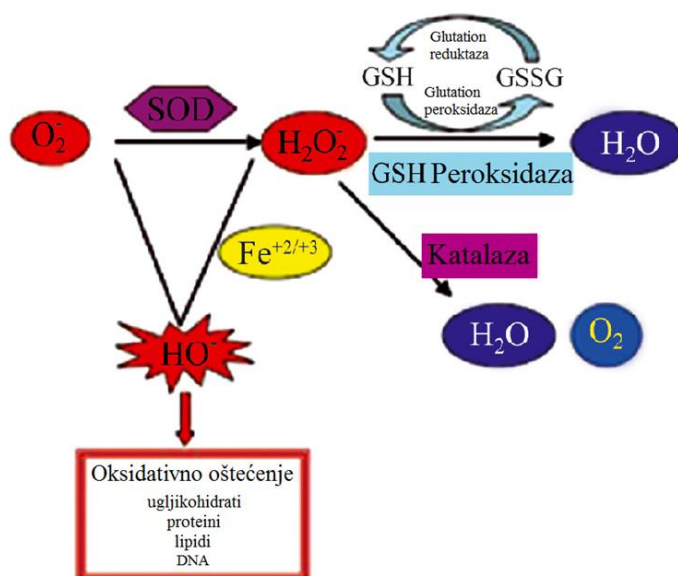
– uklanjanjem singletnoga kisika (Štefan i sur., 2007).

Antioksidansi djeluju u više razina pa se prema tome vrši podjela antioksidansa prema razinama njihove akcije (Devasagajam i sur., 2004) i prema mjestu njihova djelovanja (Štefan i sur., 2007). Razine djelovanja antioksidansa su: prevencija, presretanje i popravak (Devasagajam i sur., 2004; Sies, 1997).

1. Preventivni antioksidansi pokušavaju zaustaviti stvaranje ROS-a. To uključuje superoksid dismutazu (SOD) koja katalizira reakciju dismutacije superoksida u vodikov peroksid, te katalazu (CAT) i glutacion peroksidazu (GPx) koje neutraliziraju vodikov peroksid.
2. Razina presretanja se odnosi na one antioksidanse koji pronalaze i uklanjaju slobodne radikale ili sekundarno prekidaju lančane reakcije izazvane slobodnim radikalima njihovom neutralizacijom. Ti efektorni antioksidansi uključuju razne spojeve kao vitamine (C i E), enzime glutatione, ali i spojeve tiola, carotenoide, flavonoide itd.
3. U razinu popravka i rekonstrukcije uglavnom spadaju enzimi za popravak oštećenja nastala slobodnim radikalima na staničnim strukturama. Tu ubrajamo razne endo- i egzokleaze, DNA polimeraze i ligaze, fosfolipaze, glikozilaze, te brojne proteolitičke enzime. Ti enzimi popravljaju oštećenja na DNA, uklanjaju oksidirane masne kiseline membranskih lipida i pomoću razgradnje i resinteze obnavljaju oksidirane aminokiseline i proteine.

Sa starenjem polako opada fleksibilnost i učinkovitost antioksidacijske zaštite organizma te se time povećava oksidacijsko oštećenje, što je jedan od dokazanih biomarkera starenja (Štefan i sur., 2007).

Nekontrolirana proizvodnja ROS-a važna je u patogenezi mnogih kliničkih poremećaja, što se očituje promijenjenim aktivnostima superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) ili glutacion peroksidaze (GPx) (Štefan i sur., 2007). Ti unutarstanični antioksidansi su najčešći pokazatelji mjerljive enzimske djelatnosti većine istraživanja provedenih na temu oksidacijskog stresa i lipidne peroksidacije (Slika 2).



Slika 2. Djelovanje unutarstanične enzimske zaštite na ROS (preuzeto i prilagođeno iz Wakamatsu i sur., 2008).

### Superoksid dismutaza (SOD)

Superoksid dismutaza je metaloenzim koji sudjeluje u antioksidacijskoj zaštiti i obrani gotovo svih stanica izloženih aerobnom metabolizmu. SOD katalizira dismutaciju superoksidnih radikala ( $\cdot O_2^-$ ) u vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), pri čemu se jedna molekula superoksida reducira u  $H_2O_2$ , a druga oksidira u  $O_2$  (Štefan i sur., 2007). Jednadžba dismutacije superoksida metaloenzimom SOD je:



Unutarstanični vodikov peroksid se dalje uklanja preko jednog od dva glavna puta; putem katalaze ili putem peroksidaza (Sies, 1997; Bukan i sur., 2003).

### Katalaza (CAT)

Katalaza je široko rasprostranjen enzim jer ima značajnu ulogu u antioksidacijskoj obrani organizma. Razgrađuje štetan vodikov peroksid na vodu i kisik. To prikazano kemijskom jednadžbom je:

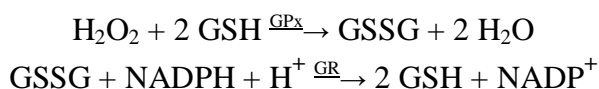


Aktivnost katalaze dolazi do maksimalne učinkovitosti tek pri većim koncentracijama  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dakle u stanju oksidacijskog stresa (Noctor i sur., 2016).

### **Reducirani glutation (GSH) i glutation peroksidaza (GPx)**

Glutation je antioksidans veoma značajan u ljudskom organizmu jer je efikasan u uklanjanju štetnog vodikovog peroksida već pri njegovim vrlo niskim koncentracijama. U zdravim stanicama i tkivima, preko 90% ukupnog glutaciona je u reduciranoj obliku (GSH), a manje od 10% je formiranog (oksidiranog) disulfidnog (GSSG). Uslijed povećanog oksidacijskog stresa nakupljaju se veće količine GSSG-a zbog antioksidacijske zaštite. Mjerenje koncentracije ukupnog glutaciona, tj. povećan omjer GSSG/GSH pokazatelj je oksidacijskog stresa (Halprin i Ohkawara, 1967).

Glutation peroksidaza katalizira redukciju vodikovog peroksida i lipidnih hidroperoksida u vodu i alkohol. Pri tome dolazi do oksidacije tiolne skupine cisteinskog dijela glutaciona te tada reducirani glutation (GSH) prelazi u oksidirani glutation (GSSG) (Nostor i sur., 2016). Reakcija je reverzibilnog karaktera uz pomoć nikotinamid adenin nukleotid fosfata (NADPH) i glutation reduktaze koja katalizira reakciju.



#### **1.6.4. Posljedice oksidacijskog stresa na stanične strukture**

Već je spomenuto da u stanju oksidacijskog stresa lančanim djelovanjem slobodnih radikala i nedovoljno učinkovitim njihovim uklanjanjem, dolazi do uništavanja staničnih struktura (DNA, lipidi, proteini i ugljikohidrati) te to prethodi pojavi raznih bolesti. Od tih struktura lipidi su najosjetljiviji na posljedice oksidacijskog stresa, tj. razarajuće djelovanje slobodnih radikala (Bukan i sur., 2003).

## **Ugljikohidrati**

Slobodni radikali (npr.  $\text{OH}^\cdot$ ) reagiraju s ugljikohidratima tako da se vežu na jedan slučajni C atom umjesto vodika i time nastaje ugljikohidratni radikal. To dovodi do pucanja lanca u nekim važnim molekulama kao što je hijaluronska kiselina, koja je sastavni dio vezivnog tkiva zglobova pa može doći do reumatoidnog artritisa i sličnih oboljenja (Devasagayam i sur., 2004).

## **Molekula DNA**

Oksidacijska oštećenja molekula DNA izazvana ROS-om uzrokuju disocijaciju šećernih komponenti, modifikaciju dušičnih baza i pucanje prstena. Posljedice se javljaju kao pogreške pri translaciji, inhibicija sinteze proteina, mutacije i naposljetku kancerogeneza. Međutim postoje različiti učinkoviti putevi popravka oštećenih dijelova DNA (Devasagayam i sur., 2004).

## **Proteini i oksidacijska karbonilacija proteina**

Oštećenja slobodnih radikala na proteinskim strukturama predstavlja veliku štetu, zbog toga što proteini obavljaju većinu poslova u živim organizmima. Ta oštećenja najčešće rezultiraju neaktivnošću enzima i time smanjuju efikasnost i preciznost vitalnih biokemijskih procesa, što rezultira staničnom degeneracijom i naposljetku smrću. Proteini mogu biti modificirani velikim brojem različitih oksidativnih reakcija, među njima je najvažnija reakcija karbonilacije proteina.

Proces karbonilacije proteina je uvođenje karbonilne grupe ( $\text{C}=\text{O}$ ) u proteine, kao posljedica izloženosti oksidacijskom stresu. Uz ostala oksidacijska oštećenja, karbonilacija se izdvaja kao najštetnija, zbog toga što je proces ireverzibilnog karaktera pa nastali karbonilirani proteini nepovratno gube svoju strukturu i funkcionalnost unutar stanice (Nystrom, 2005). Većina karboniliranih proteina se razgrađuju proteolizom, ali ponekad mogu izbjeći degradaciju i s vremenom formirati netopive agregate otporne na proteolitičku razgradnju, koji se akumuliraju tokom starenja. Takvi karbonilirani agregati mogu s vremenom postati citotoksični te uzrokovati različite vrste poremećaja vezanih uz starenje, uključujući Parkinsonovu i Alzheimerovu bolest, rak, dijabetes, sepsu i dr. (Nystrom, 2005).

Zbog ireverzibilne prirode, određivanje koncentracije proteinskih karbonila se, uz proteinske hidroperokside, koristi kao standard za dokazivanje oksidacijskog stresa unutar stanice u većini današnjih istraživanja (Noctor i sur., 2016).

### **Lipidi, lipidna peroksidacija i malondialdehid (MDA)**

Lipidi su vrlo sklони oštećenjima uzrokovanih slobodnim radikalima koja rezultiraju lipidnom peroksidacijom, koja može dovesti do nepovoljnih promjena u strukturi stanice. Oštećenja lipida su najčešće u membrani same stanice. Međutim, putem lipidne peroksidacije nastaju različiti štetni međuprodukti koji mogu djelovati na mjestima puno dalje od njihova nastanka.

Proces lipidne peroksidacije je lančana reakcija oksidacijske promjene polinezasićenih masnih kiselina koji rezultira nastankom raznih citotoksičnih međuprodukata, a jedan od njih je malondialdehid (MDA). Lipidna peroksidacija je složen proces lančane oksidacijske reakcije lipida potaknuta ROS-om i/ili slobodnim radikalima. Proces lipidne peroksidacije se odvija u 3 ključne faze:

1. *inicijacija* – formiranje slobodnih radikala
2. *propagacija* – stvaranje lanaca slobodnih radikala
3. *terminacija* – stvaranje ne-radikalnih produkata

*Inicijacija* započinje s bilo kojim radikalom (najčešće hidroksilni radikal  $\text{OH}^\cdot$ ) (Štefan i sur., 2007) koji može izbaciti vodikov atom iz metilenske skupine ( $-\text{CH}_2$ ) lipida. Tako nastali ugljikov radikal s nesprenim elektronom na ugljikovom atomu ( $\text{CH}^\cdot$ ) nastoji se stabilizirati reorganizacijom molekula pa nastaju konjugirani dieni. Dieni tada reagiraju s molekularnim kisikom ( $\text{O}_2$ ) i stvaraju lipidne peroksilne radikale ( $\text{LOO}^\cdot$ ). Oni reagiraju s drugim lipidima uzimajući vodikov atom i stvarajući lipidne hidroperokside ( $\text{LOOH}$ ) i opet reaktivne ugljikove radikale ( $\text{CH}^\cdot$ ) koji nastavljaju reakciju. Tu govorimo o fazi *propagacije*. U procesu propagacije hemski i nehemiški vezano željezo može katalizirati nastanak novog lipidnog peroksilnog radikala ( $\text{LOO}^\cdot$ ) iz lipidnog hidroperoksida ( $\text{LOOH}$ ) pa se tako grana proces lančane reakcije lipidne peroksidacije. Faza *terminacije* je završna faza gašenja procesa lipidne peroksidacije i uglavnom ide vezanjem nekog antioksidansa (npr. vitamin E) na reaktivni lipidni peroksilni radikal. Takav spoj je puno stabilniji i ne sudjeluje u daljnjoj lančanoj reakciji pa je njegovo uklanjanje olakšano drugim staničnim antioksidansima kao na

primjer vitaminom C ili GSH (Devasagayam i sur., 2004; Štefan i sur., 2007). Proces lipidne peroksidacije uključen je u procese starenja jer lipidi koji ulaze u sastav kože reagiraju sa slobodnim radikalima i prelaze u lipidne perokside koji ubrzavaju starenje. Povećana lipidna peroksidacija povećava nakupljanje kolesterola i rizik za razvoj ateroskleroze, a time i rizik za razvoj kardiovaskularnih oboljenja i drugih upalnih bolesti (Štefan i sur., 2007).

Malondialdehid je jedan od najčešćih i najštetnijih produkata lipidne peroksidacije. MDA je veoma reaktivni aldehid, koji reagira sa okolnim molekulama u stanici i može uzrokovati toksični stres stanice. U stanici se nalazi u obliku enolatnog iona koji pokazuje izraziti afinitet prema lizinskom aminokiselinskome ostatku reagirajući s proteinima. Isto tako, ciljno mjesto napada mu može biti i guanin u DNA, što rezultira nastankom mutagenih oštećenja. Određivanje koncentracije MDA koristi se kao standardni biljeg za lipidnu peroksidaciju i stupanj oksidativnog oštećenja lipida (Noctor i sur., 2016; Bukan i sur., 2003).

Uz reaktivne slobodne radikale lipidne peroksidacije nastaju i razni produkti sa strane, najčešće katalizirani ionima željeza ili bakra. Uz već spomenuti MDA, tu su i razni ugljikovodici, epoksidi, aldehidi i ketoni poput: heksanala, 4-hidroksinonenala, izoprostana i dr. (Štefan i sur., 2007).

Cilj ovog rada je ispitati antioksidacijski učinak polifenola ekstrakta cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) na biomarkere oksidacijskog stresa u mozgu C57BL/6 miševa.

## **2. MATERIJALI I METODE**

### **2.1. Materijali**

#### **2.1.1. Pripravci korišteni u istraživanju**

- a) Fiziološka otopina (F.O.) (Natrii chloridi infundibile, Pliva Hrvatska d.o.o.)
- b) Ekstrakt cvijeta trnine - pripremljen postupkom vodene ekstrakcije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu prema protokolu opisanom u Elez Garofulić i sur. (2018).

#### **2.1.2. Sastav ekstrakta trnine (ECT- ekstrakt cvijeta trnine) upotrijebljen u istraživanju**

#### **ECT i determinacija ukupnog sadržaja polifenola (USP) u ECT (UPLC-MS metodom)**

Način i pojedinosti pripreme vodenog ekstrakta cvijeta trnine (ECT), uključujući izvor biljnog materijala, proces mikrovalne ekstrakcije, mjerenje ukupnog sadržaja polifenola i određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva, detaljno su opisani u istraživanjima Dragović Uzelac i sur. (2014), Lovrić i sur. (2017) i Elez Garofulić i sur. (2018).

Mjerenja koncentracija pojedinih polifenola učinjena su po metodi, detaljno opisano u istraživanju Olszewska i sur. (2001) i Elez Garofulić i sur. (2018). Za kvantifikaciju polifenola u mozgovnom tkivu miševa upotrijebljena je sofisticiranija metoda ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS), prema istraživanju Ganguly i sur. (2016) i Elez Garofulić i sur. (2018) te Serra i sur. (2011). ECT otopina je također kvantificirana po UPLC-MS metodi. Sve navedene UPLC-MS metode napravljene su na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu. U ovom istraživanju sam koristio rezultate tih UPLC-MS mjerenja sa Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta navedene u Tablici 2. prilagođenoj iz Elez Garofulić i sur. (2018). Na temelju koncentracije otopine ECT (25 mg/kg USP) i koncentracije pojedinih polifenola u ECT, moguće je bilo odrediti doze



pojedinih polifenola u ECT i primijeniti ih u obliku doza po mg/kg tjelesne težine (tt) miša. Tablica 2. prikazuje te doze kao i sastav i koncentracije pojedinih polifenola. U Tablici 2. se također nalazi analiza polifenolnog sastava Mucedola hranjivih peleta te procijenjene doze pojedinih polifenola koje su primili tretirani miševi.

Tablica 2. UPLC-MS analiza polifenola u ekstraktu cvijeta trnine (ECT) i u Mucedola hranjivim peletima za miševе te prikaz doza ukupnih i pojedinačnih polifenola primijenjenih na C57BL/6 miševima.

Polifenoli u ECT			USP u suhom cvijetu <i>P. spinosa</i> (mg/100g st)		Doza USP u ECT (mg/kg tt C57BL/6 miša)		
			2508.6		25.00		
Broj.	Naziv polifenola	RT	m/z	m/z (prod.)	Koncentracija pojedinog polifenola u suhom cvijetu <i>P. spinosa</i> (mg/100g st)	Doza pojedinog polifenola iz ECT (µg/kg tt C57BL/6 miša)	Koncentracija pojedinog polifenola u Mucedola hranjivim peletima (µg/100 mg st)
1	kafeinska kiselina	4,387	179	135	34.32	342.023	0.175
2	3-O-kafeoilkvinična kiselina (neoklorogenična kiselina)	3,979	353	191	192	1913.418	<LOD
3	4-O-kafeokvinska kiselina	4,444	353	173	24.04	239.576	0.070
4	klorogenična kiselina	3,776	353	191	55.47	552.798	0.018
5	p-kumarinska kiselina	5,764	163	119	23.67	235.889	0.055
6	3-p-kumaroilkvinična kiselina	3,507	337	163	216	2152.595	<LOD
7	4-p-kumaroilkvinična kiselina	5,181	337	173	61.53	613.191	0.077
8	ferulinska kiselina	6,427	193	134	8.69	86.602	0.098
9	3-O-feruloilkvinična kiselina	4,043	367	193	132.2	1317.468	<LOD
10	galna kiselina	1,245	169	125	1.75	17.440	0.133
11	(+)-katehin	3,796	291	139	85.67	853.763	0.026
12	(-)-epikatehin	4,829	291	139	70.16	699.195	0.068
13	(-)-epikatehin galat	6,583	443	139	0.51	5.083	0.073
14	(-)-epigalokatehin galat	4,98	459	139	0.15	1.495	0.013
15	isorhamnetin-rutinozid	7,355	625	317	4.68	46.640	2.501
16	kempferol-3-rutinozid	6,216	595	287	51.84	516.623	0.005
17	kempferol-acetilrutinozid	9,402	637	287	0.68	6.777	<LOD
18	kempferol-pentozilheksozid	7,291	581	287	50.27	500.977	0.024
19	kempferol-pentozid	8,234	419	287	494.94	4932.432	0.111
20	kempferol-rhamnozid	7,166	433	287	436.62	4351.232	<LOD
21	kempferol-acetilheksozid	11,29	491	287	0.92	9.168	0.010
22	kempferol-rhamnozilheksozid	8,064	595	287	49.79	496.193	0.029
23	kempferol-3-glukozid	7,489	449	287	0.6	5.979	0.009
24	apigenin	11,16	271	153	3.23	32.189	0.029
25	luteolin	9,8	287	153	6.68	66.571	0.013
26	kvercetin-3-rutinozid (rutin)	6,448	611	303	82.35	820.677	0.162
27	kvercetin-acetilrutinozid	8,596	653	303	3.18	31.691	<LOD
28	kvercetin-3-glukozid	6,737	465	303	31.29	311.827	0.015
29	kvercetin-pentozid	7,396	435	303	226.75	2259.727	0.069
30	kvercetin-acetilheksozid	5,096	507	303	2.34	23.320	0.138
31	kvercetin-rhamnozid	7,557	449	303	81.15	808.718	0.057
32	kvercetin-pentozilheksozid	6,605	597	303	56.81	566.152	0.013

ECT- ekstrakt cvijeta trnine; USP – ukupni sadržaj polifenola; st – suhe težine, tt – tjelesne težine; <LOD – ispod granice detekcije.

### 2.1.3. Pokusne životinje

Istraživanje je provedeno na muškim miševima iz jedinice za uzgoj laboratorijskih životinja Zavoda za animalnu fiziologiju na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Pokusne životinje bile su zdravi miševi visokosrodnog soja C57BL/6, u dobi od tri mjeseca prosječne mase oko 30 g. Životinje su držane u slijedećim uvjetima: 12 sati svjetla i 12 sati tame pri 22 °C i 60% vlažnosti. Hrana kojom su hranjeni miševi je standardna hrana za miševе 4RF21 (Mucedola hranjivi peleti, Italija, oblik 12), a sadrži pšenicu, kukuruz, soju, riblji ekstrakt, dikalcijev fosfat, kalcijev karbonat, natrijev klorid, sojino ulje, kvasac i ljuske lješnjaka. Održavanje i njega svih pokusnih životinja provedena je u skladu sa smjernicama koje su na snazi u Republici Hrvatskoj (Zakon o dobrobiti životinja, NN #135, 2006 i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u pokusima ili druge znanstvene svrhe, NN #47, 2011), a provodi se u skladu s Uputama za njegu i korištenja laboratorijskih životinja, DHHS Publ. #(NIH) 86-123. Pokuse je odobrilo Etičko povjerenstvo Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu (No. 251-58-10617-14-21).

U ovo istraživanje je bilo uključeno ukupno 60 životinja. Životinje su bile raspoređene u dvije skupine, kontrolnu koja je primala samo fiziološku otopinu (N=30) i skupinu koja je svakodnevno dobivala ekstrakt cvijeta trnine (N=30) tijekom 28 dana. Po 6 životinja iz svake navedene tretirane skupine žrtvovano je 1., 7., 14., 21. i 28. dana od početka tretmana navedenim otopinama, a radi prikupljanja organa (mozga) u kojima je određivana koncentracija polifenola. Životinje su bile raspoređene po 6 jedinki po pokusnoj skupini odnosno po vremenu žrtvovanja u pojedinom laboratorijskom kavezu. Kavezi za laboratorijske životinje dimenzija 20 cm × 30 cm × 20 cm, na temperaturi od 22 °C, uz neograničen pristup hrani i vodi *ad libitum*. Prije početka i tijekom izvođenja pokusa životinje su pojedinačno označene (vodootpornim markerom na repovima), mjerena im je tjelesna težina na temelju koje je određivana volumen i doza 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:

- Skupina KO – zdrava kontrola (0,3 mL fiziološke otopine)
- Skupina ECT – ekstrakt cvijeta trnine (sa koncentracijom polifenola od 25 mg/kg ukupnih polifenola u otopini trnine koja je dozirana i unesena svakodnevno)

Po 6 životinja iz svake skupine žrtvovano je 1., 7., 14., 21. i 28. dana provedbe pokusa. Tijekom postupka žrtvovanja sve životinje bile su adekvatno anestezirane 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.

## 2.2. Metode

### 2.2.1. Izolacija i priprema tkiva za mjerenje biomarkera oksidacijskog stresa

Biomarkeri oksidacijskog stresa su kod skupina tretiranih intragastričnim unosom ekstrakta cvijeta trnine (ECT) i kontrolne skupine (KO) analizirani 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevnog tretmana navedenim pripravcima. Prije izolacije tkiva životinje su anestetizirane mješavinom Xylapana i Narketana (*ip* 25 mg/kg) te iskrvarene punkcijom iz srca bez antikoagulansa. Mozak je izvađen i izvagan na analitičkoj vagi. Za određivanje markera oksidacijskog stresa i antioksidacijskog kapaciteta, dijelove mozga potrebno je homogenizirati. To se radi sonifikacijom, ali najprije se tkivo pomiješa sa 50 mM fosfatnim puferom (pH = 7) u omjeru 1:10 (w/v). 50 mM fosfatni pufer pripremljen je miješanjem 17 mL 0,2 M otopine  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  i 183 mL 0,2 M otopine  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  te se uskladi pH i nadopuni s  $\text{dH}_2\text{O}$  do 800 mL. Uzorci tkiva sonificirani su ultrazvučnim homogenizatorom Bandelin Sonoplus HD2070 (Bandelin, Njemačka) upotrebom sonde MS73 (Bandelin, Njemačka), snagom od 10%. Uzroci 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 koriste se za trenutačno određivanje markera oksidacijskog stresa ili se pohranjuju na -80 °C za naknadno određivanje njihovih aktivnosti.

Takvi pojedinačni uzorci homogenata mozga odvojeni 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevnog tretmana ekstraktom cvijeta trnine iz ECT gupe i KO grupe poslani su na UPLC-MS analizu na Prehrambeno biotehnološki fakultet, zbog određivanja kvantitativnog i kvalitativnog polifenolnog sastava u mozgu promatranih miševa. Sa dobivenim rezultatima te analize, napraviti će određene usporedbe i zaključke vezane za bioakumulacijsku sposobnost i antioksidacijski sustav mozga.

## 2.2.2. Mjerenje markera oksidacijskog stresa

### Mjerenje lipidne peroksidacije (MDA)

Prisutnost lipidne peroksidacije određena je metodom reaktivnih supstanci tiobarbituric kiseline – TBARS (engl. thiobarbituric acid reactive substances) koju su opisali Jayakumar i sur. (2008). Metoda se temelji na mjerenju koncentracije malondialdehida (MDA). 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 (mozga) s 100  $\mu\text{L}$  8,1%-tne vodene otopine natrij dodecil sulfata (SDS), 750  $\mu\text{L}$  20%-tne vodene otopine octene kiseline ( $\text{pH} = 3,5$ ) i 750  $\mu\text{L}$  0,8%-tne vodene otopine tiobarbituratne kiseline. Smjesa je zagrijavana 60 minuta u vodenoj kupelji pri temperaturi od 95  $^{\circ}\text{C}$ . Nakon inkubacije smjesa je naglo ohlađena na ledu, a potom centrifugirana 15 minuta na 5000 rpm pri +4  $^{\circ}\text{C}$ . 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:

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

gdje  $\epsilon$  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.

### Određivanje proteina metodom po Lowry-u

Koncentracija proteina u homogenatima mozga 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 kiseline i fosfovolframove kiseline (Folin-Ciocalteu reagens),  $\text{Cu}^{+}$ -proteinski kompleks i bočni ogranci aromatičnih aminokiselina reduciraju fosfomolibdensku

kiselinu i fosfovolfamovu kiselinu u molidben i fosfovolfam plavilo (kompleks plavo-ljubičastog obojenja s maksimumom apsorbanije pri  $\lambda = 600$  nm). Intenzitet boje proporcionalan je koncentraciji proteina u uzorku i mjeri se spektrofotometrijski pri  $\lambda = 600$  nm.

Kako bi se mogla odrediti nepoznata koncentracija proteina u uzorku, prethodno je konstruiran baždarni dijagram, tj. dijagram ovisnosti apsorbanije o poznatoj koncentraciji proteina. Kao standard korišten je albumin goveđeg seruma (bovine serum albumin, BSA). Iz početne koncentracije BSA, 20 mg/mL pripremljen je niz otopina poznate koncentracije proteina u rasponu od 0 do 20 mg/mL, 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%  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ,

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 mozga za određivanje koncentracije proteina po Lowry-u razrijeđeni su komercijalnim fosfatnim puferom 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 apsorbanije o koncentraciji BSA određen je nagib pravca i odsječak na y-os. Preko nagiba pravca i odsječka na y-os, izračunate su nepoznate koncentracije proteina u uzorcima prema formuli:

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

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

## 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 mozga dodano je 300  $\mu\text{L}$  10 mM DNPH u 2 M HCl. Tako pripremljeni uzorci inkubirani su pri sobnoj temperaturi tijekom jednog sata uz povremeno miješanje. Proteini su staloženi s 10 % (w/v) trikloroocetnom kiselinom (TCA) na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 5 minuta te nakon toga centrifugirani 10 minuta na  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$  pri 12000 g. Supernatant je bačen, a talog resuspendiran u mješavini etanola i etil acetata u omjeru 1:1 i centrifugiran pri istim uvjetima. Postupak ispiranja taloga je ponovljen sve dok se sav nevezani DNPH nije isprao. Nakon toga je talog otopljen u 6 M otopini gvanidin HCl u kupelji na  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 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  $0,022\text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ , a duljina kivete  $l$  iznosi 1 cm. Koncentracija proteinskih karbonilnih skupina je prikazana kao omjer količine karbonila i koncentracije proteina, te je izražena kao nmol/mg proteina.

## Mjerenje koncentracije ukupnog glutationa (GSH)

Koncentracija ukupnog glutationa u uzorcima mozga određena je prema modificiranoj metodi koju je opisao Tietze (1969). Postupak određivanja koncentracije ukupnog glutationa 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 pločnom čitaču (Plate Reader) 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 (etilendiamintetraoctena kiselina)),

Reakcijska smjesa B: 20  $\mu$ L enzima glutation reduktaze i 980  $\mu$ 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).

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

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

gdje  $\varepsilon$ (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 mozga izražena je kao  $\mu\text{M}/\text{mg}$  proteina.

### 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  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (Štefan i sur., 2007) Aktivnost SOD-a određena je u supernatantima homogenata mozga inhibicijom redukcije citokroma C u sustavu ksantin/ksantin oksidaza prema modificiranoj metodi Flohé i Ötting (1984).

Priprema otopina:

otopina A: otopina 1 mM ksantina (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) pomiješane u volumnom omjeru 1:10, otopina B: pomiješano 20  $\mu$ L enzima ksantin oksidaze (XOD, aktivnosti 0,8 U/mL) u 480  $\mu$ L  $\text{dH}_2\text{O}$ .

U ovoj metodi korištene su dvije slijepe 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 kivetu je pomiješano 1,45 mL otopine A, 25  $\mu$ L PBS-a i 20-40  $\mu$ L 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  $\mu$ L. Nakon postignute optimalne aktivnosti enzima analizirani su uzorci. U svaku reakcijsku smjesu umjesto PBS-a je dodano 30  $\mu$ L razrijeđenog supernatanta uzorka, 1,45 mL otopine A i odgovarajući volumen ksantin oksidaze i odmah nakon toga mjerena je apsorbancija u spektrofotometru. Svaki uzorak termostatiran 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:

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

gdje se naziv slijepa proba odnosi na gore navedenu slijepu probu 2.

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. (jedinica enzimske aktivnosti U= $\mu$ mol/min)

## Mjerenje aktivnosti katalaze (CAT)

Katalazna aktivnost u supernatantu mozga 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 mozga i 980  $\mu\text{L}$  10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , čime započinje enzimski reakcija. Svaki uzorak termostetiran je na 25  $^\circ\text{C}$ . 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  $^\circ\text{C}$  gdje koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  pada od 10,3 do 9,2 mM. Koncentracija katalaze izračunata je prema formuli:

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

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 uzorcima mozga 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).

### 2.2.3. Statistička obrada podataka

Rezultati istraživanja, tj. koncentracije pojedinih polifenola i farmakokinetički parametar  $C_{\text{max}}$ , te markeri oksidacijskog stresa (SOD, CAT, GSH, MDA, PC), su prikazani kao srednje vrijednosti uzoraka u skupini sa pripadajućim standardnim devijacijama. Statistički značajnim vrijednostima smatrane su razlike između skupina za koje je stupanj vjerojatnosti  $p \leq 0,05$ . Statistička analiza podataka napravljena je korištenjem programa Microsoft Excel 2011 (Redmond, Sjedinjene Američke Države) i StatSoft Statistica 7.0 (Tulsa, Sjedinjene Američke Države). Dobiveni podaci izražavani su u obliku srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija srednje vrijednosti. Višestruka usporedba kontrolne skupine i tretiranih skupina miševa izvršena je Kruskal-Wallis ANOVA analizom varijance, pri čemu je interval pouzdanosti određen na  $p \leq 0,05$ .

### **3. REZULTATI**

#### **3.1. Kvantifikacija i farmakokinetička obrada ( $C_{max}$ ) polifenola u mozgu**

Tablica 3. prikazuje vrijednosti maksimalnih koncentracija pojedinih polifenola u mozgu miševa tretiranih ekstraktom cvijeta trine (ECT) u odnosu na maksimalne koncentracije kontrolne skupine (KO) izražene farmakološkim parametrom  $C_{max}$  u vremenu od 28 dana. Od 22 detektirana polifenola ECT grupe u mozgu dobivene UPLC-MS metodom (provedene na Prehrambeno biotehnološkom fakultetu), napravio sam Tablicu 3. u kojoj sam odvojio samo 11 koji su pokazali statistički značajno povećanje u ECT skupini u odnosu na KO skupinu.

Tablica 3. Izdvojene vrijednosti maksimalnih koncentracija ( $C_{max}$ ) pojedinih polifenola u mozgu miševa ECT skupine koji su statistički značajno ( $p \leq 0,05$ ) različite (povećane) u odnosu na maksimalne koncentracije pripadajućih polifenola kontrolne skupine detektiranih u vremenu od 28 dana (mjereno 1., 7., 14., 21. i 28. dana). (Rezultati su dobiveni UPLC-MS analizom provedenom na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu).

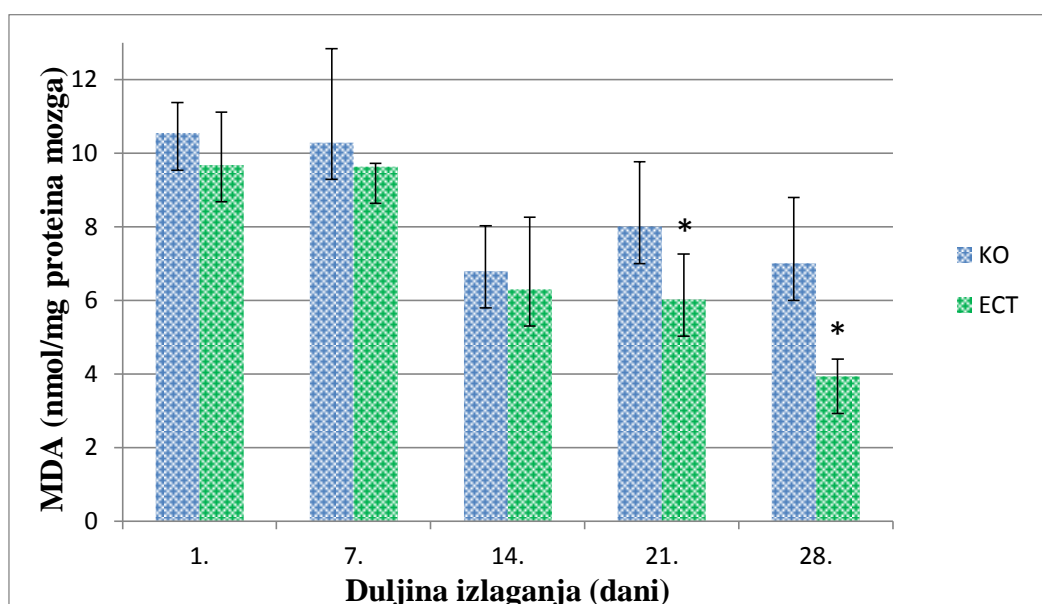
Redni broj	1.-28. dan, subkronična doza	Skupina	$C_{max}$ mozga ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Flavonoli</b>			
1.	kvercetin-3-O-glukozid	Kontrola	0,146±0,010
		ECT	<b>0,247±0,030 #</b>
2.	kvercetin-3-rutinozid (rutin)	Kontrola	1,277±0,150
		ECT	<b>2,841±0,042 #</b>
3.	kvercetin-pentozid	Kontrola	1,508±0,220
		ECT	<b>2,094±0,260 #</b>
4.	kvercetin-pentosilheksozid	Kontrola	0,328±0,030
		ECT	<b>1,959±0,040 #</b>
5.	kvercetin-rhamnoid	Kontrola	0,678±0,020
		ECT	<b>2,916±0,010 #</b>
6.	kempferol-3-rutinozid	Kontrola	0,064±0,010
		ECT	<b>0,287±0,001 #</b>
<b>Flavan-3-oli</b>			
7.	(-)-epikatehin	Kontrola	<LOD
		ECT	<b>0,180±0,001 #</b>
8.	(-)-epigalokatehin-3-galat	Kontrola	0,353±0,001
		ECT	<b>2,137±0,005 #</b>
<b>Fenolne kiseline</b>			
9.	4-O-kafeoilkvinična kiselina	Kontrola	1,562±0,043
		ECT	<b>2,011±0,115 #</b>
10.	4-p-kumaroilkvinična kiselina	Kontrola	0,692±0,250
		ECT	<b>2,142±0,050 #</b>
11.	3-O-feruloilkvinična kiselina	Kontrola	0,488±0,050
		ECT	<b>0,791±0,001 #</b>
UKUPNA KONCENTRACIJA DETEKTIRANIH POLIFENOLA U MOZGU		Kontrola	7,096
(zbroj srednjih vrijednosti statistički značajno većih koncentracija u ECT skupini u odnosu na kontrolnu skupinu)		ECT	<b>17,605 #</b>

# Srednje vrijednosti maksimalnih koncentracija pojedinog polifenola detektirane u mozgu miševa tretiranih ekstraktom cvijeta trnine (ECT) su statistički značajno ( $p \leq 0,05$ ) različite od pripadajuće kontrole istog polifenola u pripadajućem redu. ECT- ekstrakt cvijeta trnine; <LOD – ispod granice detekcije.

U Tablici 3., ukupni zbroj srednjih vrijednosti koncentracije svih detektiranih polifenola u mozgu, u kontrole i u tretiranih životinja (ECT), prikazan u zadnjem redu Tablice 3., ukazuje da je ukupna koncentracija polifenola u ECT skupini u mozgu 2,48 puta veća u odnosu na kontrolnu skupinu.

### 3.2. Lipidna peroksidacija u mozgu - koncentracija malondialdehida(MDA)

Analizom koncentracije MDA u mozgu (Slika 3.) zapaženo je statistički značajno smanjenje MDA kod skupine tretirane ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (KO) 21. i 28. dana tretmana ( $p \leq 0,05$ ).

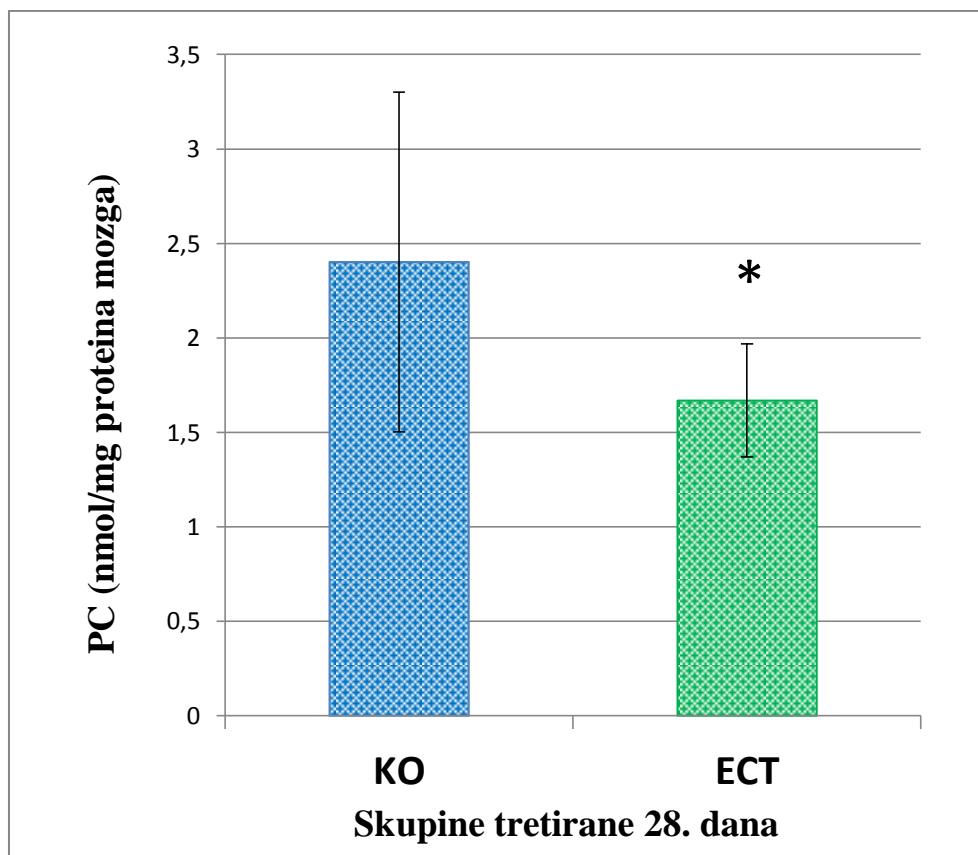


Slika 3. Koncentracija malondialdehida (MDA) u homogenatima tkiva mozga kod kontrolne skupine i skupine tretirane ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevnog tretmana u C57BL/6 miševa. Broj životinja po skupini (n=5). Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ .; Kratice: KO – zdrava kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine; SV – srednja vrijednost; SD – standardna devijacija.

\* statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu istog dana analize ( $p \leq 0,05$ )

### 3.3. Vrijednosti karboniliranih proteina (PC) u mozgu

Analizirajući koncentraciju karboniliranih proteina (PC) u mozgu (Slika 4.) vidljivo je statistički značajno smanjenje karboniliranih proteina u skupini koja je tretirana ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na zdravu kontrolu skupinu (KO) 28. dana tretmana ( $p \leq 0,05$ ).

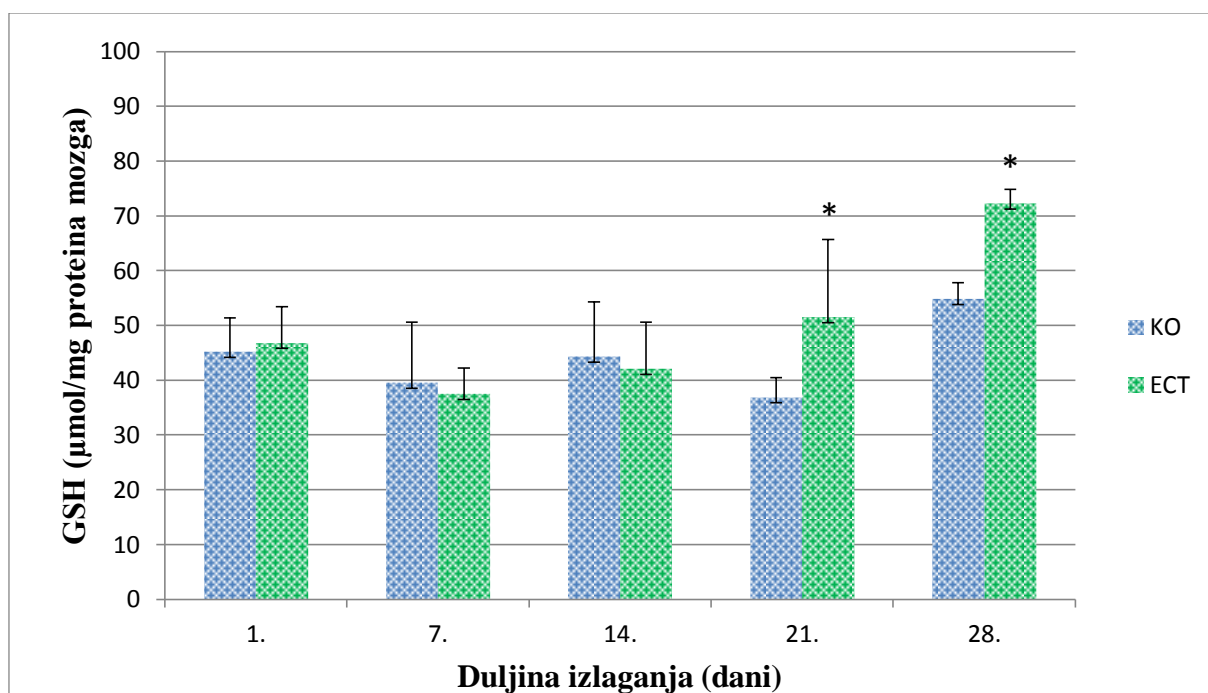


Slika 4. Koncentracija karboniliranih proteina (PC) u homogenatima tkiva mozga kod kontrolne skupine i skupine tretirane ekstraktom cvijeta trnine 28. dana svakodnevnog tretmana u C57BL/6 miševa. Broj životinja po skupini (n=5). Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ . Kratice: KO – zdrava kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine; SV – srednja vrijednost; SD – standardna devijacija.

\* statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,05$ )

### 3.4. Vrijednosti ukupnog glutationa (GSH) u mozgu

Analizom koncentracije GSH u mozgu (Slika 5.) zapaženo je statistički značajno povećanje koncentracije GSH kod skupine tretirane ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (KO) 21. i 28. dana tretmana ( $p \leq 0,05$ ).



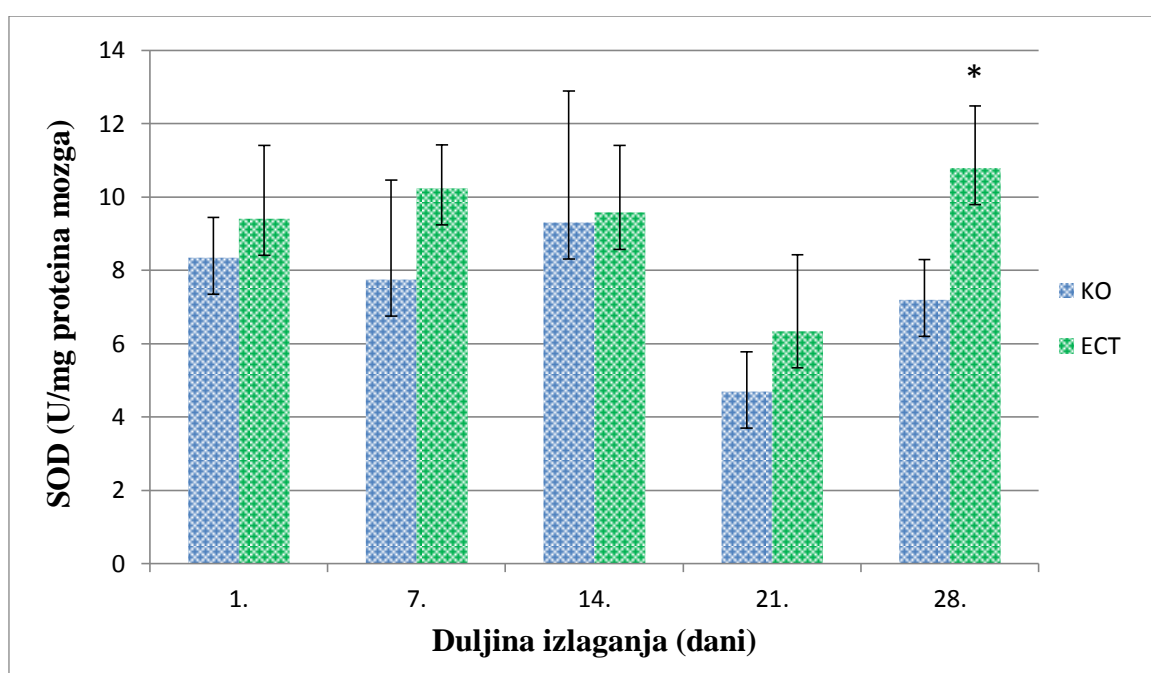
Slika 5. Koncentracija ukupnog glutationa (GSH) u homogenatima tkiva mozga kod kontrolne skupine i skupine tretirane ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevnog tretmana u C57BL/6 miševa. Broj životinja po skupini (n=5). Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ .; Kratice: KO – zdrava kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine; SV – srednja vrijednost; SD – standardna devijacija.

\* statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu istog dana analize ( $p \leq 0,05$ )



### 3.5. Vrijednosti enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) u mozgu

Analizom podataka enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) uzoraka mozga (Slika 6.) utvrđen je statistički značajan porast enzimske aktivnosti kod skupine koja je primala ekstrakt cvijeta trnine (ECT) u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (KO) 28. dana tretmana ( $p \leq 0,05$ ).

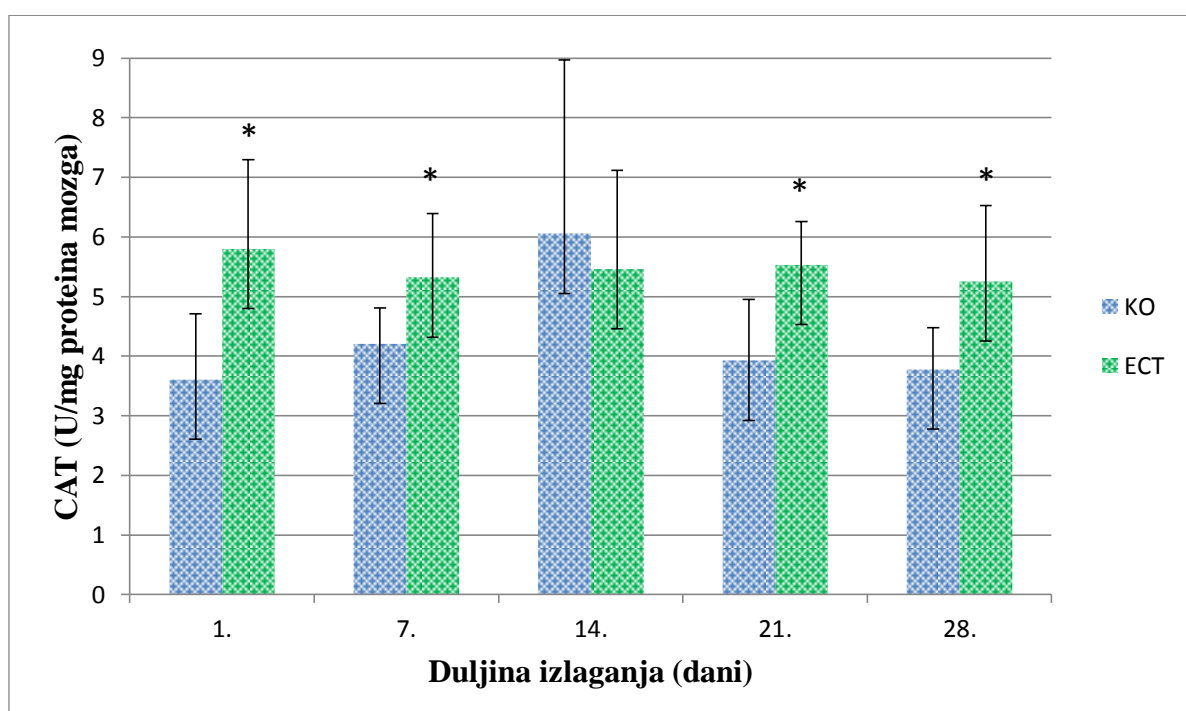


Slika 6. Enzimska aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u homogenatima tkiva mozga kod kontrolne skupine i skupine tretirane ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevnog tretmana u C57BL/6 miševa. Broj životinja po skupini (n=5). Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ .; Kratice: KO – zdrava kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine; SV – srednja vrijednost; SD – standardna devijacija.

\* statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu istog dana analize ( $p \leq 0,05$ )

### 3.6. Vrijednosti enzimske aktivnosti katalaze (CAT) u mozgu

Analizom podataka enzimske aktivnosti katalaze (CAT) uzoraka mozga (Slika 7.) utvrđen je statistički značajan porast enzimske aktivnosti kod skupine tretirane ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u usporedbi s zdravom kontrolom (KO) 1., 7., 21. i 28. dana tretmana ( $p \leq 0,05$ ).



Slika 7. Enzimska aktivnost katalaze (CAT) u homogenatima tkiva mozga kod kontrolne skupine i skupine tretirane ekstraktom cvijeta trnine nakon 1., 7., 14., 21. i 28. dana svakodnevnog tretmana u C57BL/6 miševa. Broj životinja po skupini (n=5). Rezultati su prikazani kao  $SV \pm SD$ .; Kratice: KO – zdrava kontrola; ECT – ekstrakt cvijeta trnine; SV – srednja vrijednost; SD – standardna devijacija.

\* statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu istog dana analize ( $p \leq 0,05$ )

## 4. RASPRAVA

Rezultati ukazuju da od 32 polifenola prisutnih u ekstraktu cvijeta trnine (ECT) detektiranih UPLC-MS metodom (Tablica 2.), njih 11 detektiramo u mozgu sa statistički značajnim povećanjem u usporedbi s kontrolnom grupom (Tablica 3.), što je otprilike 34% od ukupnog broja spojeva prisutnih u ECT. Zbirno, uočava se da je ukupna koncentracija detektiranih bioakumuliranih polifenola u tretirane (ECT) skupine približno 2,5 puta veća nego u kontrolnih životinja. S obzirom na dug biološki put polifenola od crijeva prema mozgu, metabolizmu biomolekula na tom putu i naposljetku prelasku barijere krv - mozak, možemo uvidjeti da je taj udio bioakumuliranih polifenola zapravo prilično dobar omjer. Zaključujem da je mozak organ sa umjerenim bioakumulacijskim kapacitetom prihvaćanja polifenola.

Iz Tablice 2. UPLC-MS analize uočava se da se najveće koncentracije polifenola u ECT javljaju uglavnom u 3 važne skupine. To su flavonoidi; flavonoli i flavan-3-oli, te neflavonoidi; fenolne kiseline. Flavonoli koji prevladavaju su kempferol i kvercetin sa svojim derivatima. Flavan-3-oli su zastupljeni uglavnom sa katehinom i epikatehinom. Dok od fenolnih kiselina prevladavaju neoklorogenična, kumaroilkvinična i feruloilkvinična kiselina te galna kiselina.

Uspoređujući UPLC-MS analizu polifenola u ECT (Tablica 2.) s farmakokinetičkom maksimalnom koncentracijom  $C_{max}$  polifenola u mozgu (Tablica 3.) detektiranih tijekom 28 dana, uočava se da se sve te 3 skupine polifenola pojavljuju i u mozgu. Maksimalne koncentracije pojedinih bioakumuliranih polifenola prelaze vrijednosti od 2  $\mu\text{g/g}$  mozgovnog tkiva miša (Tablica 3.), dok kod kontrolnih životinja niti jedna maksimalna koncentracija ne doseže takvu vrijednost. Spojevi koji u mozgu tretiranih životinja (ECT) dosežu ili prelaze navedenu vrijednost od 2  $\mu\text{g/g}$  mozgovnog tkiva miša su:

- flavonoli; kvercetin-3-rutinozid, kvercetin-pentozid i kvercetin-rhamnoid,
- katehini (flavan-3-oli); (-)-epigalokatehin-3-galat,
- fenolne kiseline; 4-O-kafeoilkvinična kiselina i 4-p-kumaroilkvinična kiselina.

Najvišu izmjerenu koncentraciju u mozgu miševa pokazuje kvercetin-rhamnoid (2,9  $\mu\text{g/g}$  mozgovnog tkiva). Međutim, najveći skok, od oko 6 puta u usporedbi sa kontrolom, pokazuje epigalokatehin-3-galat (kontrola 0,35  $\mu\text{g/g}$  → 2,13  $\mu\text{g/g}$  mozgovnog tkiva) i malo manje od 6 puta kvercetin- pentosilheksozid (kontrola 0,33  $\mu\text{g/g}$  → 1,95  $\mu\text{g/g}$  mozgovnog tkiva) (Tablica

3.). Prema tim navedenim podacima pokazanim u Tablici 3., mogu zaključiti da mozak ima najveći afinitet za akumulaciju katehina (epigalokatehin-3-galat) i kvercetina, a zatim fenolnih kiselina i kempferola iz ekstrakta cvijeta trine.

I dok se koncentracije kvercetina, katehina i fenolnih kiselina u mozgu pojavljuju u sličnim omjerima kao i u ECT, primjećuje se da sa kempferolom to nije baš slučaj. Uočava se da kempferol (i njegovi spojevi) koji se u ECT pojavljuje u velikoj koncentraciji (većoj u usporedbi s kvercetinom), u mozgu nije pronađen u velikoj koncentraciji. U mozgu prevladava kvercetin (i njegovi spojevi), a kempferol se pojavljuje samo u obliku kempferol-3-rutinozida u statistički značajnoj većoj koncentraciji s obzirom na kontrolnu grupu. To nam govori da je biodostupnost kempferola puno manja nego biodostupnost kvercetina (u ovom slučaju vezano uz mozak). Zaključujem da je to tako, na temelju toga što metabolizam preferira kempferol (pred kvercetinom), i/ili se lakše eliminira iz krvi, i/ili teže prelazi barijeru krv-mozak i akumulira se u mozgu. U literaturi pronalazimo slične primjere.

Chen i sur. (2015) su proučavali farmakokinetiku, biodostupnost i distribuciju po regijama mozga, polifenola iz miješanog ekstrakta jabuke sa sjemenkama grožđa te ekstrakta borovnice, u mozgu mladih prašćića. Prašćići su 3 tjedna tretirani navedenim ekstraktima pa im je tada izmjerena količina polifenola u plazmi i mozgu. Rezultati su pokazali da određeni flavonoli i flavan-3-oli iz ekstrakta jabuke sa sjemenkama grožđa i antocijani iz ekstrakta borovnice pronađeni u plazmi, prelaze krvno-moždanu barijeru i akumuliraju se u svim ili određenim regijama mozga. Uočava se da se uglavnom iste grupe polifenola pronađene u ovom istraživanju pojavljuju i u njihovom. Međutim, oni su napravili korak više i detektirali su pojedine polifenole po određenim regijama mozga pa uvidjeli da je najveća akumulacija u malom mozgu. U ovom istraživanju to nije bilo moguće zbog jednostavnog razloga, veličine mišjeg mozga, dok su oni raspolagali sa velikom količinom mozgovnog tkiva u prašćića.

Mendes i sur. (2018) su proučavali pozitivne efekte hrane obogaćene polifenolima iz ekstrakta bijelog vina na mozak miševa kod kojih je izazvano stanje slično Alzheimerovoj bolesti. Dokazali su da određeni polifenoli iz navedenog ekstrakta prolaze krvno-moždanu barijeru i akumuliraju se u mozgu, gdje djeluju preventivno regulirajući biokemijske redoks procese povezane s oksidacijskim stresom, povećavajući koncentraciju GSH, aktivnost katalaze i smanjujući membransku lipidnu oksidaciju. Navedeni polifenoli su iz skupina flavonola (derivati kvercetina), flavan-3-ola (derivati katehina) i fenolnih kiselina (derivati

hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline). Detektirali su najveću koncentraciju katehina, pa tek onda ostalih polifenola u mozgu, kao što je slično zabilježeno i u ovom istraživanju.

Navedena istraživanja zajedno sa podacima iz Tablice 3. ukazuju da određeni polifenoli uneseni hranom bogatom tim bioaktivnim sastojcima, unatoč metabolizmu biomolekula u probavnom traktu, dopijevaju u krvnu plazmu, distribuiraju se po tijelu, te naposljetku dopijevaju i u mozak. Tu određeni polifenoli prelaze barijeru krv – mozak i akumuliraju se u moždanim stanicama.

Može se pretpostaviti da ti akumulirani i dokazani polifenoli u mozgu doprinose antioksidacijskoj zaštiti mozgovnih stanica, reducirajući lipidnu peroksidaciju i koncentraciju karboniliranih (oštećenih) proteina, smanjujući tj. uklanjajući oksidacijski stres u mozgovnim stanicama. Rezultati mjerenja oksidacijskih biomarkera ukazuju da se ovi procesi vjerojatno zbivaju na 2 načina; uklanjanjem slobodnih radikala (vezanjem u strukturu polifenolnih molekula) uz istodobno stimuliranje antioksidacijskih zaštitnih biokemijskih puteva preko povećanja koncentracije reduciranog glutaciona (GSH), superoksid dismutaze (SOD) i vjerojatno i katalaze (CAT). Mjerenjem oksidacijskih bioloških markera u mozgu (MDA, PC, SOD, GSH, CAT), pokazana je funkcionalnost bioakumulacije polifenola u sprečavanju oksidacijskog stresa i lipidne peroksidacije u mozgu miša (Slike 3. – 7.).

Rezultati (Slika 3.) ukazuju statistički značajno smanjenje ( $p \leq 0,05$ ) malondialdehida u skupini ECT u odnosu na zdravu kontrolu skupinu 21. te 28. dan. Smatram kako polaganom bioakumulacijom dokazanih polifenola u mozgu, dolazi do izražaja antioksidacijska sposobnost tih polifenola da uklanjaju slobodne radikale i time prekidaju lančanu reakciju lipidne peroksidacije. To se vidi u postupnom smanjenju razine MDA i statistički značajnom smanjenju 21. i 28. dana. u ECT skupini u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Isto tako, iz rezultata (Slika 4.) se uočava statistički značajno smanjenje ( $p \leq 0,05$ ) koncentracije karboniliranih proteina (PC) u skupini tretiranom ECT u usporedbi s kontrolnom skupinom 28. dana. Postupak određivanja proteina i kasnije mjerenje karboniliranih proteina veoma su opsežni i operativno zahtjevni (s velikom mogućnošću pogreške), stoga sam prikazao rezultate samo 28. dana promatranja vjerujući da će najvjernije prikazati statistički odskok, tj. pad koncentracije PC u ECT skupine u odnosu na KO skupinu. To statistički značajno smanjenje koncentracije nam govori da u skupini tretiranoj s ECT

imamo smanjenu koncentraciju karboniliranih proteina, što je posljedica djelovanja bioaktivnih polifenola iz samog cvijeta trnine. I u literaturi pronalazimo slične primjere.

Marchelak i sur. (2017) su u svom opsežnom studiju, uz sve ostalo, istraživali i izravnu interakciju ekstrakata cvijeta trnine sa slobodnim radikalima i ionima prijelaznih metala pa su proučavali neke od tih učinaka u modelu lipidne peroksidacije. Koristili su kemijske *in vitro* modele (TBARS i druge testove), ali za bolju aproksimaciju *in vivo* efekta proširili su te testove proučavanjem na modelu ljudske plazme izložene oksidativnom stresu. Stresni uvjeti inducirani su peroksinitritom ( $\text{ONOO}^-$ ), snažnim oksidansom uključenim u patofiziologiju raznih upalnih, neurodegenerativnih i osobito kardiovaskularnih poremećaja. Rezultati tih bioloških modela potvrdili su da analizirani ekstrakti trnine aktivno povećavaju ukupnu antioksidativnu sposobnost plazme, a time učinkovito smanjuju razine poznatih biomarkera oksidativnog stresa i lipidne peroksidacije (MDA). Mehanizam djelovanja polifenola iz ekstrakta trnine u zaštiti proteina plazme i lipida, uključuje izravno uklanjanje slobodnih radikala, i/ili sekundarnih međuprodukata nastalih u lančanim reakcijama.

Guimarães i sur. (2013) su proučavali antioksidacijska i antitumorna svojstva polifenola iz plodova nekoliko biljnih vrsta, među njima je bila i trnina (*P. spinosa*). Isto kao i u ovom istraživanju, koristeći TBARS metodu, mjerenjem apsorbancije intenziteta boje malondialdehid-tiobarbiturne kiseline, dokazali su inhibitorno djelovanje polifenola iz ekstrakta ploda trnine na lipidnu peroksidaciju u homogenatima mozga svinje. Također, polifenoli pokazuju i antitumorski potencijal što su testirali na određenim tumorskim ljudskim staničnim linijama (pluća, jetra).

Subash i sur. (2014) su proučavali učinak polifenola iz nara na ublažavanje oksidacijskog oštećenja mozga u transgeničnih miševa s modelom Alzheimerove bolesti (AD). Transgenične miševe s AD stare 4 mjeseca su podijelili u dvije skupine i hranili ih idućih 15 mjeseci. Kontrolnu skupinu sa normalnom hranom, a drugu skupinu hranom sa dodatkom 4% nara. U kontrolnoj grupi je utvrđeno značajno povećanje oksidacijskog stresa dokazanog s povećanjem razine lipidne peroksidacije (LP) i proteinskih karbonila (PC), a istodobno je opaženo smanjenje aktivnosti antioksidacijskih enzima. Dodatak s 4% nara smanjuje oksidacijsko oštećenje, što se dokazuje smanjenjem razine LP i PC te obnavljanjem aktivnosti antioksidacijskih enzima (SOD, CAT i GSH). Na temelju rezultata, izvlači se zaključak da je terapijski potencijal 4% nara u liječenju AD povezan sa suzbijanjem oksidacijskog stresa zbog prisutnosti aktivnih fitokemikalija (polifenola) u njemu.

Stoga, mogu reći da su rezultati dobiveni ovim istraživanjem potkrijepljeni navedenim istraživanjima i dokazuju da bioaktivne tvari iz cvijeta trnine – polifenoli, aktivno povećavaju antioksidacijsku sposobnost stanica mozga, direktno uklanjajući slobodne radikale i pomažući u uklanjanju međuprodukata lančane reakcije (MDA) i karboniliranih proteina (PC), štiteći time stanične proteinske strukture i membranske lipide te same stanice od daljnje lipidne peroksidacije i proteinskih oštećenja.

Iz rezultata aktivnosti antioksidacijske enzimske zaštite (GSH, SOD, CAT) uočavaju se povećanja u skupinama ECT u usporedbi sa kontrolnim skupinama. Statistički značajna povećanja ( $p \leq 0,05$ ) uslijedila su za vrijednosti ukupnog glutationa (GSH) 21. i 28. promatranog dana (Slika 5.), za vrijednosti superoksid dismutaze (SOD) 28. promatranog dana (Slika 6.) i za vrijednosti katalaze (CAT) 1., 7., 21. i 28. promatranog dana (Slika 7.). Uočava se da vrijednosti katalaze (CAT) pokazuju statistički odskok već 1. te 7. promatranog dana, a 14. dana je zabilježen čak i nepravilan obrnut malen pad ECT skupine naspram KO skupine (Slika 7.) pa ti rezultati malo odmiču uspoređujući ih s rezultatima vrijednosti SOD i GSH. To objašnjavam da je tako, vjerojatno zato što je katalazna aktivnost veoma osjetljiva i često su rezultati pomalo kaotični, a najveća koncentracija katalaze se nalazi u jetri, pa bi rezultati iz jetre najpouzdanije prikazivali predviđena statistička povećanja. Koncentrirao sam se na rezultate 21. i 28. dana, djelomično zanemarujući rezultate 1. i 7. dana, vjerujući da će oni vjernije doprinijeti željenom rezultatu.

Stoga, navedena statistička povećanja enzimske antioksidacijske zaštite izmjerena 21. i 28. dana nastaju tek tada, zbog toga što treba proći određeno vrijeme u postupnoj bioakumulaciji polifenola u stanicama mozga ( $C_{max}$  Tablica 2.). Smatram da ti akumulirani polifenoli tada postepeno induciraju proizvodnju navedene antioksidacijske enzimske zaštite, koja dolazi do maksimalnog izražaja tek nakon 2 – 3 tjedna, što se i uočava s ovih navedenih rezultata. U literaturi se pronalaze također slični primjeri.

Yulug i sur. (2018) su proučavali bioaktivnost polifenola iz ekstrakta cimeta u njihovoj neuroprotektivnoj, antioksidativnoj i antiupalnoj ulozi u mozgu miševa u kojih je izazvana trauma mozga. Miševе sa induciranom traumom mozga podijelili su u dvije skupine, jedna skupina je tretirana polifenolima iz ekstrakta cimeta, dok je druga služila kao kontrola. Mjerili su poznate oksidacijske biomarkere (SOD, CAT, GSH i MDA). Uspoređujući rezultate s

kontrolnom skupinom, potvrdili su važnu neuroprotektivnu ulogu polifenola iz ekstrakta cimeta koja proizlazi iz njihove sposobnosti da suzbiju upalu i oksidativna oštećenja.

Ramos-Escudero i sur. (2012) su određivali ukupni sastav polifenola u ekstraktu kukuruza i bioaktivni učinak tih polifenola u jetri, bubregu i mozgu miševa. Rezultati su pokazali da polifenoli iz navedenog ekstrakta značajno smanjuju lipidnu peroksidaciju (niže koncentracije MDA), a istodobno povećavaju aktivnosti endogenih antioksidacijskih enzima (CAT, GSH i SOD) u promatranim organima. Na temelju dobivenih rezultata, zaključeno je da ekstrakt kukuruza sadrži različite bioaktivne polifenolne spojeve koji pokazuju značajnu *in vitro* antioksidacijsku aktivnost.

Uspoređujući rezultate navedenih istraživanja polifenola iz ekstrakta cimeta i ekstrakta kukuruza sa ovdje promatranim ekstraktom cvijeta trnine, uočava se da se ti rezultati poklapaju u povećanju enzimske aktivnosti u tretiranim skupinama usporedno s kontrolnim skupinama. Ta povećanja pripisujemo bioaktivnim polifenolima iz cvijeta trnine koji uvelike doprinose osnovnom antioksidacijskom sustavu zaštite promatranih stanica. Samim time se smanjuje oksidacijski stres, te pojačava obrana stanica od njega.

Dokazivanjem određenih polifenola u mozgu i mjerenjem bioloških markera oksidacijskog stresa i lipidne peroksidacije pa potkrepljujući rezultate sa mjerenjima u sličnim istraživanjima, potvrđujem hipotezu da su bioaktivni sastojci - polifenoli zapravo zaslužni za protektivno djelovanje u stanicama mozga. Uočava se da oni doprinose učinkovitijoj antioksidacijskoj zaštiti mozgovnih stanica od oksidacijskog stresa i lipidne peroksidacije, djelujući direktno na uklanjanje slobodnih radikala te indirektno potičući enzimsku zaštitu na efikasnije djelovanje. To nam pokazuju smanjene razine PC i MDA te povišene koncentracije GSH, SOD i CAT u mozgovnim stanicama zaštićenim polifenolima (Slika 3. –7.). Međutim, ne može se sa sigurnošću tvrditi koji od navedenih mehanizama više dolazi do izražaja, već nam ovo istraživanje ukazuje da polifenoli djeluju na te načine, doprinoseći ukupnoj antioksidacijskoj zaštiti i time uvelike rasterećujući stanice od oksidacijskog stresa i lipidne peroksidacije.



## 5. ZAKLJUČAK

- Od 32 polifenolna spoja u ekstraktu cvijeta trnine detektiranih UPLC-MS analizom, u mozgu miševa pronalazimo 11 polifenolnih spojeva koji su statistički značajno povećani u ETC skupini u odnosu na kontrolnu skupinu.
- Ukupna prosječna koncentracija bioakumuliranih polifenolnih spojeva približno je 2,5 puta veća u mozgu životinja koje su izložene ekstraktu cvijeta trnine u odnosu na zdravu kontrolu, što ukazuje da je mozak organ s umjerenim bioakumulacijskim kapacitetom prihvatanja polifenola.
- Bioakumulirani polifenoli povećanjem aktivnosti antioksidacijskih enzima i neutralizacijom slobodnih radikala i nastalih nusprodukta oksidacijskih reakcija pridonose antioksidacijskoj zaštiti moždanih stanica – smanjuju oksidacijski stres u tkivu mozga, umanjuju lipidnu peroksidaciju i karbonilaciju (oštećenje) proteina.

## 6. LITERATURA

Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. Meth. Enzymol., 105: 121-126.

Adlercreutz, H., Mazur, W., (1997). Phyto-oestrogens and western diseases. Ann. Med., 29: 95–120.

Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Santos-Buelga, C., (2009). Phenolic acids determination by HPLC–DAD–ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. Food Chem. Toxicol., 47(6): 1076–9.

Bukan, N., Sancak, B., Yavuz, Ö., Koca, C., Tutkun, F., Özcelikay A.T., Altan, N., (2003). Lipid peroxidation and scavenging enzyme levels in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. Indian J. Biochem. Bio., 40(6): 447-50.

Chen, T.-Y., Kritchevsky, J., Hargett, K., Feller, K., Klobusnik, R., Song, B.J., Cooper, B., Jouni, Z., Ferruzzi, M.G., Janle, E.M., (2015). Plasma bioavailability and regional brain distribution of polyphenols from apple/grape seed and bilberry extracts in a young swine model. Mol. Nutr. Food Res., 59: 2432-2447.

Christ, B., Müller, K.H., (1960). Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen. Arch. Pharm., 293(12): 1033-1042.

D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Masella, R., (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. Int. J. Mol. Sci., 11(4): 1321-1342.

Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J.P., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A., (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. Antioxid. Redox. Sign., 18(14): 1818-92.

Devasagayam, T.P.A., Tilak, J.C., Bloor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., Lele, R.D., (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. J. Assoc. Physician. I., 52: 794-804.

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 fruits. Poster session presentation at the meeting of the 7th Central European Congress on Food, F. Ch. Int., Skopje, Macedonia.

Elez Garofulić, I., Zorić Z., Pedisić, S., Brnčić, M., Dragović-Uzelac, V., (2018). UPLC-MS<sup>2</sup> profiling of blackthorn flower polyphenols isolated by ultrasound-assisted extraction. J. Food Sci. 83(11): 2782-2789.

Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A., Simeon-Rudolf, V., Reiner, E., (2003). Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. Anal. Biochem., 312(2): 224-227.

- Flohé, L., Ötting, F., (1984). Superoxide dismutase assays. *Meth. Enzymol.* 105: 93-104.
- Francetić, I., Vitezić, D., (2007). *Osnove kliničke farmakologije*. Medicinska naklada, Zagreb.
- Ganguly, S., G, T.K., Mantha, S., Panda, K., (2016). Simultaneous determination of black tea-derived catechins and theaflavins in tissues of tea consuming animals using ultra-performance liquid-chromatography tandem mass spectrometry. *PLOS One.*, 11(10): e0163498.
- Gelenčir, N. (1989). *Prirodno liječenje biljem i ostalim sredstvima*. 14. Izd., Digitalizacija knjige: Equilibrium, Beograd.
- González-Sarriás, A., Núñez-Sánchez, M.Á., Tomás-Barberán, F.A., Espín, J.C., (2017). Neuroprotective effects of bioavailable polyphenol-derived metabolites against oxidative stress-induced cytotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Agr. Food Chem.*, 65(4): 752-758.
- Guimarães, R., Barros, L., Calheta, R.C., Carvalho, A.M., Queiroz, M.J.R.P., Ferreira, I.C.F.R., (2013). Bioactivity of different enriched phenolic extracts of wild fruits from northeastern Portugal: a comparative study. *Plant Food Hum. Nutr.*, 69(1): 37-42.
- Halprin, K.M., Ohkawara, A., (1967). The measurement of glutathione in human epidermis using glutathione reductase. *J. Invest. Dermatol.*, 48(2): 149.
- Jayakumar, T., Sakthivel, M., Thomas, P.A., Geraldine, P., (2008). *Pleurotus ostreatus*, an oyster mushroom, decreases the oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rat kidneys, heart and brain. *Chem. Biol. Inter.*, 176(2-3): 108-120.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E., (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.*, 233: 346-357.
- Linčir, I. (2012). *FARMAKOLOGIJA - udžbenik za srednje medicinske i zdravstvene škole*. Medicinska naklada, Zagreb.
- Lovrić, V., Putnik, P., Bursać Kovačević, D., Jukić, M., Dragović-Uzelac, V., (2017). Effect of microwave-assisted extraction on the phenolic compounds and antioxidant capacity of blackthorn flowers. *Food Technol. Biotech.*, 55(2): 243-250.
- Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Maky Orel (2017). *Prunus spinosa* L. blackthorn spring flowers. Pixabay <<https://pixabay.com/en/prunus-spinosa-blackthorn-2308289/>> pristupljeno 24.7.2019.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79(5): 727-47.

- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C., (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81(1 suppl): 230S-242S.
- Marchelak, A., Owczarek, A., Matczak, M., Pawlak, A., Kolodziejczyk-Czepas, J., Nowak, P., & Olszewska, M. A., (2017). Bioactivity potential of *Prunus spinosa* L. flower extracts: phytochemical profiling, cellular safety, pro-inflammatory enzymes inhibition and protective effects against oxidative stress *in vitro*. *Front. Pharmacol.*, 11(8): 680.
- Mendes, D., Oliveira, M.M., Moreira, P.I., Coutinho, J., Nunes, F.M., Pereira, D.M., Valentao, P., Andrade, P.B., Videira, R. A. (2018). Beneficial effects of white wine polyphenols-enriched diet on Alzheimer's disease-like pathology. *J. Nutr. Biochem.*, 55: 165–177.
- Milke, L., Aschenbrenner, J., Marienhagen, J., Kallscheuer, N., (2018) Production of plant-derived polyphenols in microorganisms: current state and perspectives. *Appl. Micro. Biotech.*, 102(4): 1575-1585.
- Nabavi, S.F., Sureda, A., Dehpour, A.R., Shirooie, S., Silva, A.S., Devi, K.P., Ahmed, T., Ishaq, N., Hashim, R., Sobarzo-Sánchez, E., Daglia, M., Braidly, N., Volpicella, M., Vacca, R.A., Nabavi, S.M., (2017). Regulation of autophagy by polyphenols: paving the road for treatment of neurodegeneration. *Biotech. Adv.*, S0734-9750(17)30153-2
- Noctor, G., Mhamdi, A., Foyer, C.H., (2016). Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation. *Plant, Cell Environ.*, 39: 1140-1160.
- Noorhajati, H., Tanjung, M., Aminah, N.S., Suwandi, J.S.A., (2012). Antioxidant activities of extracts of trengguli stem bark (*Cassia fistula* L.). *Int. J. Basic Appl. Sci.*, 12: 85-89.
- Nyström, Thomas, (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.*, 24(7): 1311-1317.
- Olszewska, M., Głowacki, R., Wolbiś, M., Bald, E., (2001). Quantitative determination of flavonoids in the flowers and leaves of *Prunus spinosa* L.. *Acta Pol. Pharm.*, 58(3): 199-203.
- Olszewska, M., Wolbiś, M., (2001). Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L.. *Acta Pol. Pharm.*, 58(5): 367-372.
- Olszewska, M., Wolbiś, M.. (2002). Further flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L.. *Acta Pol. Pharm.*, 59(2): 133-137.
- Pasinetti, G.M., Wang, J., Ho, L., Zhao, W., Dubner, L., (2015). Roles of resveratrol and other grape-derived polyphenols in Alzheimer's disease prevention and treatment. *BBA – Mol. Basis Dis.*, 1852(6): 1202-8.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységou, L., (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 50(3): 586-621.

- Ramos-Escudero, F., Muñoz, A.M., Alvarado-Ortíz, C., Alvarado, Á., Yáñez, J.A., (2012). Purple corn (*Zea mays* L.) phenolic compounds profile and its assessment as an agent against oxidative stress in isolated mouse organs. *J. Med. Food*, 15(2): 206-15.
- Ruiz-Rodriguez, B.M., De Ancos, B., Sanchez-Moreno, C., Fernandez-Ruiz, V., Sanchez-Mata, M. de C., Camara, M., Tardio, J., (2014). Wild blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) fruits as valuable sources of antioxidants. *Fruits*, 69: 61-73.
- Scalbert, A., Williamson, G., (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 130: 2073S–85S.
- Serra, A., Macià, A., Romero, M.P., Piñol, C., Motilva, M.J., (2011). Rapid methods to determine procyanidins, anthocyanins, theobromine and caffeine in rat tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chrom. B*, 879(19): 1519-28.
- Sies, Helmut, (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.*, 82(2): 291-295.
- Smoliga, J.M., Baur, J.A., Hausenblas, H.A., (2011). Resveratrol and health – A comprehensive review of human clinical trials. *Mol. Nutr. Food Res.*, 55: 1129-1141.
- Spencer, Jeremy P. E., (2003). Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J. Nutr.*, 133(10): 3255S-3261S.
- Spencer, J.P., Chowrimootoo, G., Choudhury, R., Debnam, E.S., Srai, S.K., Rice-Evans, C., (1999). The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett.*, 458(2): 224-230.
- Subash, S., Essa, M.M., Al-Asmi, A., Al-Adawi, S., Vaishnav, R., Braidy, N., Manivasagam, T., Guillemin, G., (2014). Pomegranate from Oman alleviates the brain oxidative damage in transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Tradit. Compl. Med.*, 4(4): 232-8.
- Štefan, L., Tepšić, T., Zavidčić, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R., (2007). Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Med. Flum.*, 43: 84-93.
- Tietze, F., (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.*, 27(3): 502-522.
- Tressera-Rimbau, A., Arranz, S., Eder, M., Vallverdú-Queralt, A., (2017). Dietary polyphenols in the prevention of stroke. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 10 str.
- Tsao, Rong, (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutr.*, 2(12): 1231–1246.

Veličković, J.M., Kostić, D.A., Stojanović, G.S., Mitić, S.S., Mitić, M.N., Ranđelović, S.S., Đorđević, A.S., (2014). Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. Chem. Indust., 68: 297-303.

Wakamatsu, T.H., Dogru, M., Tsubota, K., (2008). Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases. Arq. Bras. Oftalmol., 71(6): 72–79.

Wang, J., Tang, C., Ferruzzi, M.G., Gong, B., Song B.J., Janle, E.M., Chen, T.Y., Cooper, B., Varghese, M., Cheng, A., Freire, D., Bilski, A., Roman, J., Nguyen, T., Ho, L., Talcott, S.T., Simon, J.E., Wu, Q., Pasinetti, G.M., (2013). Role of standardized grape polyphenol preparation as a novel treatment to improve synaptic plasticity through attenuation of features of metabolic syndrome. Mol. Nutr. Food Res., 57(12): 2091–2102.

Ward, L., Pasinetti, G.M., (2016). Recommendations for development of botanical polyphenols as "natural drugs" for promotion of resilience against stress-induced depression and cognitive impairment. Neuro. Med., 18(3): 487-95.

Yuksel, Arzu Kavaz, (2015). The effect of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) addition on certain quality characteristics of ice cream. J. Food Qual., 38: 413-421.

Yulug, B., Kilic, E., Altunay, S., Ersavas, C., Orhan, C., Dalay, A., Tuzcu, M., Sahin, N., Juturu, V., Sahin, K., (2018). Cinnamon polyphenol extract exerts neuroprotective activity in traumatic brain injury in male mice. CNS Neurol. Disord-Dr., 17(6): 439-447.

## 7. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 1984. godine u Čakovcu. U sedmoj godini s obitelji selim u Ivanovec, selo kraj Čakovca, gdje pohađam i završavam osnovnu školu. Nakon osnovne škole upisujem Gimnaziju u Čakovcu prirodoslovno-matematički smjer gdje sam stekao temelje za daljnje školovanje na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. Volim provoditi vrijeme u prirodi i tada primjenjivati te nadopunjavati znanje stečeno školovanjem.