



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Nikola Ferara

**Učinak promijenjenog sastava glukozinolata i  
polifenola ekstrakata klijanaca brokule  
izazvanog visokom temperaturom na  
fiziološke molekularne biljege miokarda miša  
Swiss**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026.



University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Nikola Ferara

**The effect of the changed composition of  
glucosinolates and polyphenols of broccoli  
seedling extracts induced by high  
temperature on the physiological molecular  
markers of Swiss mouse myocardium**

DOCTORAL DISSERTATION

Mentors:

Prof. Domagoj Đikić, PhD

Vedran Balta, PhD

Zagreb, 2026

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

Ovo istraživanje financirano je sredstvima Hrvatske zaklade za znanost u okviru istraživačkog projekta „Indirektni utjecaj globalnog zagrijavanja na fiziološke parametre sisavaca prehranom biljkama uzgojenim pri visokoj temperaturi (TEMPHYS)", broj potpore IP-2020-02-7585 (I.Š.).

## **Zahvala**

*Posebno zahvaljujem svojim mentorima, prof. dr. sc. Domagoju Đikiću i dr. sc. Vedranu Balti, na stručnom vodstvu, poticajnim raspravama, strpljenju i kontinuiranoj podršci tijekom svih faza izrade rada.*

*Zahvaljujem članovima povjerenstva na vremenu, konstruktivnim komentarima i prijedlozima koji su doprinijeli kvaliteti disertacije. Iskreno zahvaljujem svim suradnicima i kolegama koji su svojim znanjem, radom i kolegijalnošću olakšali provedbu eksperimentalnog dijela istraživanja te interpretaciju rezultata. Na kraju, najveću zahvalnost upućujem svojoj obitelji, majci Sibirki i ocu Goranu, kao i bliskim prijateljima na razumijevanju, ohrabrenju i potpori, bez kojih bi ovaj put bio znatno teži.*

**Učinak promijenjenog sastava glukozinolata i polifenola ekstrakata klijanaca brokule izazvanog visokom temperaturom na fiziološke molekularne biljege miomiokarda miša Swiss**

NIKOLA FERARA

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

Klijanci brokule (*Brassica oleracea* var. *italica*) bogat su izvor glukozinolata i polifenola s dokazanim antioksidacijskim, protuupalnim i kardioprotektivnim djelovanjem, no učinak visoke temperature (HT) uzgoja na njihov fitokemijski sastav i posljedično fiziološke učinke na miokard ostaje nedovoljno istražen. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati kako promijenjen sastav glukozinolata i polifenola u klijancima brokule, izazvan visokom temperaturom uzgoja, utječe na fiziološke i molekularne biljege miokarda zdravih miševa soja Swiss. HT klijanci brokule uzgajani su pri visokoj temperaturi okoline (HT- 38 °C dan/33°C noć), a RT klijanci pri sobnoj temperaturi (RT - 23 °C dan/18°C noć). Zdravim miševima su se intragastrično, jednom dnevno, kroz razdoblje od 28 dana, primjenjivali vodeni ekstrakti HT klijanca, RT klijanaca (300 mg/kg t.j.m.) i vodena otopina glukozinolata sinigrina (10 mg/kg t.j.m.). Kontrolna skupina miševa tretirana je fiziološkom otopinom (0.3 mL). U homogenatima miokarda određeni su strukturni (hs-cTnI), funkcionalni (ANP), metabolički (irizin, adropin, ACOX1), upalni (MMP-2, MMP-9, PTX3, NO) i oksidacijski parametri (MDA, tGSH, SOD, katalaza, antioksidacijski kapacitet). Dodatno su određeni osnovni hematološki parametri. Uzgoj pod uvjetima HT značajno je promijenio fitokemijski sastav klijanaca - ukupni glukozinolati smanjeni su za 28%, fenolne kiseline za 40%, dok su ukupni fenoli porasli za 30%. Ekstrakt HT doveo je do značajnog porasta hs-cTnI u miokardu u odnosu na ekstrakt RT i kontrolu, ukazujući na potencijalno nepovoljan učinak na miokard ili indukciju sinteze. Primjena glukozinolata sinigrina rezultirala je spolno specifičnim promjenama u ženki - sniženim ANP-om, povišenim irizinom, tGSH, aktivnosti katalaze te MMP-2 i MMP-9. Oba ekstrakta značajno su povećala antioksidacijski kapacitet miokarda (FRAP, ABTS), uz izraženiji učinak ekstrakta RT, a koncentracija MDA nije bila značajno promijenjena. Prema dostupnim saznanjima, ovo je prvo istraživanje koje izravno ukazuje da uzgoj pod uvjetima HT može modificirati fitokemijski sastav klijanaca brokule u mjeri koja mijenja njihov učinak na miokard miševa.

Rad sadrži: 185 stranica, 40 slika, 3 tablice, 278 literaturna navoda, jezik izvornika hrvatski

**Ključne riječi:** glukozinolati, polifenoli, klijanci brokule, visoka temperatura uzgoja, sinigrin, miokard, oksidacijski stres, antioksidacijski kapacitet, kardioprotektivno djelovanje

**Mentor:** prof. dr. sc. Domagoj Đikić  
dr. sc. Vedran Balta

**Ocjenjivači:** izv. prof. dr. sc. Ivana Šola  
prof.dr.sc. Maja Jazvinšćak Jembrek  
prof. dr. sc. Irena Landeka Jurčević

**Zamjena:** izv. prof. dr. sc. Duje Lisičić

**The effect of the changed composition of glucosinolates and polyphenols of broccoli seedling extracts induced by high temperature on the physiological molecular markers of Swiss mouse myocardium**

NIKOLA FERARA

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

Broccoli seedlings (*Brassica oleracea* var. *italica*) are a rich source of glucosinolates and polyphenols with proven antioxidant, anti-inflammatory, and cardioprotective effects; however, the impact of high-temperature (HT) cultivation on their phytochemical composition and the subsequent physiological effects on the myocardium remains insufficiently investigated. The aim of this study was to examine how the changed composition of glucosinolates and polyphenols in broccoli seedlings, caused by high cultivation temperatures, affects the physiological and molecular markers of the myocardium in healthy Swiss mice. HT broccoli seedlings were grown at a high ambient temperature (HT - 38 °C day/33 °C night), and RT seedlings were grown at room temperature (RT - 23 °C day/18 °C night). Healthy mice were administered intragastrically, once daily over a period of 28 days, aqueous extracts of HT seedlings, RT seedlings (300 mg/kg body weight), and an aqueous solution of the glucosinolate sinigrin (10 mg/kg body weight). The control group of mice was treated with physiological saline (0.3 mL). Structural (hs-cTnI), functional (ANP), metabolic (irisin, adropin), inflammatory (MMP-2, MMP-9, PTX3, NO), and oxidative parameters (MDA, tGSH, SOD, catalase, antioxidant capacity) were determined in the myocardium homogenates. Additionally, basic hematological parameters were determined. Cultivation under HT conditions significantly altered the phytochemical composition of the seedlings—total glucosinolates were reduced by 28% and phenolic acids by 40%, while total phenols increased by 30%. The HT extract led to a significant increase in hs-cTnI in the myocardium compared to the RT extract and the control, indicating a potentially adverse effect on the heart muscle. The administration of the glucosinolate sinigrin resulted in sex-specific changes in females: decreased ANP, alongside elevated irisin, tGSH, catalase activity, MMP-2, and MMP-9. Both extracts significantly increased the antioxidant capacity of the myocardium (FRAP, ABTS), with a more pronounced effect observed with the RT extract, while the MDA concentration was not significantly altered. To the best of our knowledge, this is the first study directly indicating that cultivation under HT conditions can modify the phytochemical composition of broccoli seedlings to an extent that alters their effect on the mouse myocardium

Ph.D. thesis contains: 185 pages, 40 figures, 3 tables, 278 references, original in Croatian

**Keywords:** glucosinolates, polyphenols, broccoli seedlings, high growing temperature, sinigrin, myocardium, oxidative stress, antioxidant capacity, cardioprotective effect

**Mentors:** Prof. Domagoj Đikić, PhD  
Vedran Balta, PhD

**Reviewers:** Prof. Ivana Šola, PhD  
Prof. Maja Jazvinščak Jembrek, PhD  
Prof. Irena Landeka Jurčević, PhD

**Substitute:** Prof. Duje Lisičić, PhD

## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Ciljevi rada.....	3
1.2. Hipoteze rada .....	4
1.3. Metode .....	4
<b>2. LITERATURNI PREGLED.....</b>	<b>6</b>
2.1. Glukozinolati.....	6
2.1.1. Izvori glukozinolata.....	6
2.1.2. Građa i klasifikacija glukozinolata.....	6
2.1.3. Biosinteza i uloga glukozinolata u biljkama .....	8
2.1.4. Učinak procesiranja na sastav glukozinolata .....	10
2.1.5. Razgradnja glukozinolata .....	11
2.1.6. Metabolizam i biorasploživost glukozinolata u organizmu sisavaca .....	12
2.1.7. Kemoprotektivno, antioksidacijsko i protuupalno djelovanje glukozinolata.....	16
2.1.8. Biocidno djelovanje glukozinolata.....	17
2.1.9. Nepovoljni učinci glukozinolata .....	18
2.2. Polifenoli.....	18
2.2.1. Izvori polifenola .....	18
2.2.2. Građa i klasifikacija polifenola .....	19
2.2.3. Uloga u biljkama i biosinteza polifenola.....	21
2.2.4. Učinak procesiranja na sastav polifenola .....	23
2.2.5. Metabolizam i biorasploživost polifenola u organizmu sisavaca.....	24
2.2.6. Antioksidacijsko i protuupalno djelovanje polifenola .....	26
2.3. Kardiovaskularne bolesti .....	29
2.3.1. Definicija i epidemiologija.....	29
2.3.2. Endotelna disfunkcija, ateroskleroza i arterijska hipertenzija.....	29
2.3.3. Uloga upale i oksidacijskog stresa u aterosklerozi.....	31
2.3.4. Koronarna srčana bolest i srčana hipertrofija.....	32
2.4. Učinak glukozinolata i polifenola na kardiovaskularni sustav sisavaca .....	34
2.4.1. Mehanizmi djelovanja glukozinolata na kardiovaskularni sustav.....	34
2.4.2. Antioksidacijsko i protuupalno djelovanje glukozinolata u kardiovaskularnim bolestima .....	35
2.4.3. Istaknuti predstavnici glukozinolata i njihovi učinci na kardiovaskularno zdravlje	36

2.4.4.	Djelovanje glukozinolata na aterosklerozu, endotelnu funkciju i trombocite...	39
2.4.5.	Djelovanje glukozinolata na miokard .....	43
2.4.6.	Djelovanje polifenola na aterosklerozu i vaskularni tonus .....	47
2.4.7.	Djelovanje polifenola na trombocite .....	49
2.4.8.	Djelovanje polifenola na miokard .....	50
2.5.	Klijanci brokule kao izvor glukozinolata i polifenola .....	51
2.5.1.	Brokula i klijanci brokule.....	51
2.5.2.	Fitokemijski sastav brokule i klijanaca .....	53
2.5.3.	Utjecaj temperature uzgoja na sadržaj glukozinolata u klijancima brokule.....	55
2.5.4.	Utjecaj temperature uzgoja na sadržaj polifenola u klijancima brokule .....	57
2.6.	Djelovanje klijanaca brokule na kardiovaskularni sustav .....	59
2.6.1.	Djelovanje na hematološke parametre .....	59
2.6.2.	Učinak na arterijsku hipertenziju i aterosklerozu.....	60
2.6.3.	Učinak na miokard .....	61
<b>3.</b>	<b>MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>63</b>
3.1.	Klijanci brokule .....	63
3.2.	Eksperimentalne životinje i etička izjava .....	64
3.3.	Pripravci korišteni u pokusu .....	65
3.4.	Priprema i određivanje kvantitativnog i kvalitativnog sastava vodenih ekstrakata klijanaca brokule.....	65
3.5.	Eksperimentalni dizajn.....	66
3.6.	Uzorkovanje krvi i analiza hematoloških parametara.....	68
3.7.	Priprava homogenata srčanog tkiva za mjerenje bioloških biljega.....	68
3.8.	Određivanje koncentracije ukupnih proteina u tkivu miokarda.....	69
3.9.	Određivanje strukturnog parametra tkiva miokarda - visoko osjetljivog srčanog troponina I (hs-cTnI) .....	70
3.10.	Određivanje koncentracije funkcionalnog parametra miokarda- atrijskog natriuretskog peptida (ANP).....	70
3.11.	Određivanje koncentracije metaboličkih parametara u tkivu miokarda .....	71
3.11.1.	Određivanje koncentracija irizina i adropina.....	71
3.11.2.	Određivanje koncentracije peroksisomalne acil-CoA oksidaze 1 (ACOX1) .	71
3.12.	Određivanje koncentracije upalnih parametara u tkivu miokarda .....	72
3.12.1.	Određivanje koncentracija matriks metaloproteinaza 2 i 9 (MMP-2, MMP-9) i pentraksina 3 (PTX-3).....	72

3.12.2.	Određivanje koncentracije dušikova(II) oksida (NO) .....	72
3.13.	Određivanje bioloških biljega oksidacijskog stresa u tkivu miokarda.....	73
3.13.1.	Određivanje koncentracije ukupnog glutationa (tGSH) .....	73
3.13.2.	Određivanje enzimatske aktivnosti katalaze.....	73
3.13.3.	Određivanje enzimatske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD) .....	74
3.13.4.	Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA) .....	74
3.13.5.	Određivanje antioksidacijskog kapaciteta tkiva miokarda metodom FRAP ..	75
3.13.6.	Određivanje antioksidacijskog kapaciteta tkiva miokarda metodom ABTS..	76
3.14.	Statistička analiza.....	76
<b>4.</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>77</b>
4.1.	Spektrofotometrijske analize kvantitativnog sastava glukozinolata i različitih skupina polifenola u klijancima brokule uzgajanim pri različitim temperaturama okoliša..	77
4.2.	Učinak vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na hematološke parametre	77
4.3.	Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na strukturni parametar miokarda, hs-cTnI .....	78
4.4.	Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na koncentraciju parametra srčane funkcije, atrijskog netriuretskog peptida (ANP).....	80
4.4.	Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na metaboličke parametre miokarda.....	82
4.4.1.	Učinak vodene otopine sinigrina na koncentracije irizina i adropina .....	82
4.4.2.	Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na koncentraciju peroksisomalne acil-CoA oksidaze I (ACOX1) .....	84
4.5.	Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na upalne parametre miokarda .....	86
4.5.1.	Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na koncentraciju matriks metaloproteinaza 2 i 9 (MMP-2, MMP-9) .....	86
4.5.2.	Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na koncentraciju pentraksina (PTX3) .....	89
4.5.3.	Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na koncentraciju dušikova(II) oksida (NO) .....	90
4.6.	Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na biološke biljege oksidacijskog stresa u tkivu miokarda .....	92
4.6.1.	Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na koncentraciju ukupnog glutationa (tGSH) .....	92

4.6.2.	Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na enzimsku aktivnost katalaze.....	94
4.6.3.	Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na enzimsku aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) .....	96
4.6.4.	Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na koncentraciju malondialdehida (MDA) .....	98
4.6.5.	Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na antioksidacijski kapacitet tkiva miokarda mjeren metodom FRAP .....	99
4.6.6.	Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na antioksidacijski kapacitet tkiva miokarda mjeren metodom ABTS.....	101
<b>5.</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>104</b>
5.1.	Učinak visoke temperature uzgoja brokule na glukozinololate i različite skupine polifenola u klijancima brokule.....	105
5.2.	Učinak ekstrakata klijanaca brokule na hematološke parametre .....	108
5.3.	Učinak sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule na visoko osjetljivi srčani troponin (hs-cTnI) .....	110
5.4.	Učinak sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule na atrijski natrijuretski peptid (ANP) .....	113
5.5.	Učinak sinigrina na metaboličke parametre miokarda – irizin, adropin i acil-CoA oksidazu (ACOX1) .....	117
5.6.	Učinak sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule na upalne parametre miokarda..	124
5.6.1.	Učinak sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule na MMP-2 i MMP-9 .....	124
5.6.2.	Učinak sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule na PTX3 .....	129
5.6.3.	Učinak sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule na NO.....	131
5.7.	Učinak sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule na parametre oksidacijskog stresa u tkivu miokarda.....	134
5.7.1.	Učinak sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule na ukupni glutation (tGSH)...	134
5.7.2.	Učinak sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule na katalazu i SOD .....	138
5.7.3.	Učinak sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule na MDA .....	144
5.7.4.	Učinak sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule na antioksidacijski kapacitet tkiva miokarda .....	146
<b>6.</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>151</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>154</b>
<b>8.</b>	<b>ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>179</b>

## 1. UVOD

Klimatske promjene i s njima povezane visoke temperature postaju sve značajniji globalni izazov s dalekosežnim posljedicama na poljoprivrednu proizvodnju i prehranu stanovništva (1). Globalne temperature su u porastu i očekuje se da će u sljedećih nekoliko godina prosječna temperatura površine Zemlje biti i do 1,9 °C viša u odnosu na prosječnu temperaturu između 1850.-1900. godine (2) (3). Osim negativnog utjecaja na biomasu i strukturu nadzemnih i podzemnih dijelova biljaka, povišena temperatura djeluje kao stres za biljni organizam, koji može bitno promijeniti njegovu fiziologiju i biokemiju. Toplinski stres utječe na fitohormone, membranske strukture, kloroplast i mitohondrije te potiče proizvodnju slobodnih kisikovih radikala (4). Kao reakcija na stres u biljci dolazi do aktivacije gena povezanih sa stresom te aktivacije međusobno povezanih signalnih puteva koji biljci omogućuju integraciju različitih stresnih signala, ali time i usklađeniji metabolički odgovor u svrhu optimalne prilagodbe na promijenjene okolišne uvjete. Takve metaboličke promjene mogu imati znatan učinak na nutritivni potencijal i biološku aktivnost biljaka (1). Dok je utjecaj visoke temperature na biljke u zreloj fazi razvoja relativno dobro istražen, posljedice toplinskog stresa na mlade biljke, posebice klijance, još uvijek nisu dovoljno razjašnjene. To je osobito važno budući da klijanci, odnosno mikropovrće, predstavljaju sve zastupljeniju komponentu suvremene prehrane (4). Klijanac se može definirati kao mlada biljka, odnosno izdanak i korjenčići dobiveni iz proklijalog sjemena, koji raste 2 do 7 dana (5). Klijanci brokule (*Brassica oleracea* var. *italica*) ističu se iznimno visokim udjelom bioaktivnih spojeva, uključujući glukozinolate i polifenole, koji su prisutni u koncentracijama i do deset puta većim nego u zrelim biljkama. Upravo su navedeni specijalizirani metaboliti odgovorni za brojne pozitivne zdravstvene učinke povezane s konzumacijom kupusnjača, osobito zbog njihovog antioksidacijskog, protuupalnog i kardioprotektivnog djelovanja (4).

Brokula, kupusnjača iz porodice *Brassicaceae*, jedno je od najkonzumiranijih povrća u svijetu. S obzirom na rastuću svijest o povoljnom djelovanju na zdravlje, u posljednjih 20-ak godina zabilježen je značajan, čak 940%-tni porast proizvodnje i potrošnje brokule, i njoj srodne cvjetače (6). Klijanci brokule predstavljaju izuzetan izvor glukozinolata, posebice glukorafanina, prekursora sulforafana, jednog od najpotentnijih induktora enzima faze II metabolizma (4). Osim glukozinolata, klijanci brokule obiluju raznovrsnim fenolnim spojevima, uključujući fenolne kiseline, flavonoide i hidroksicinamične kiseline, koji sinergistički doprinose njihovim zdravstvenim učincima (7). Dosadašnja istraživanja

povezuju konzumaciju brokule i njezinih bioaktivnih spojeva s povoljnim učincima na kardiovaskularni sustav, uključujući smanjenje krvnog tlaka (8), poboljšanje endotelne funkcije (9), usporavanje progresije ateroskleroze (9) te zaštitu miokarda od ishemijsko-reperfuzijske ozljede (10) i fibroze (11).

Međutim, pitanje kako visoka temperatura uzgoja utječe na fitokemijski sastav klijanaca brokule i posljedično na njihove fiziološke učinke nakon konzumacije, ostaje nedovoljno istraženo. Promjene u sastavu glukozinolata i polifenola inducirane toplinskim stresom tijekom uzgoja mogu značajno modificirati biološku aktivnost klijanaca i njihov utjecaj na zdravlje (1). S obzirom na to da su kardiovaskularne bolesti vodeći uzrok smrtnosti u svijetu (12), razumijevanje kako promijenjeni fitokemijski sastav brokule utječe na molekularne i fiziološke biljege miokarda ima izrazitu znanstvenu i praktičnu važnost.

Miokard, kao metabolički vrlo aktivan organ, izrazito je osjetljiv na oksidacijski stres, upalne procese i metaboličke poremećaje (13). U svrhu sveobuhvatne procjene utjecaja bioaktivnih spojeva iz hrane na strukturu, funkciju i metabolizam srčanog mišića, u ovom istraživanju praćeni su specifični molekularnih biljezi miokarda, poput visoko osjetljivog srčanog troponina I (hs-cTnI), atrijskog natriuretskog peptida (ANP), metaboličkih parametara (irizin, adropin), upalnih markera (pentaksina-3, matriks metaloproteinaza, dušikova(II) oksida) i bioloških biljega oksidacijskog stresa (MDA, superoksid-dismutaza, katalaza, glutation).

Ovo istraživanje usmjereno je na utvrđivanje učinka promijenjenog sastava glukozinolata i polifenola u klijancima brokule, uzrokovanog visokom temperaturom uzgoja, na fiziološke i molekularne biljege miokarda. Korištenjem animalnog modela, miševa soja Swiss, istraženo je kako subkronična primjena vodenih ekstrakata klijanaca brokule uzgojenih pri sobnoj ( $t = 23^{\circ}\text{C}$  dan/ $18^{\circ}\text{C}$  noć) i visokoj temperaturi ( $t = 38^{\circ}\text{C}$  dan/ $33^{\circ}\text{C}$  noć) te vodene otopine pojedinačnog glukozinolata sinigrina utječu na strukturne, metaboličke, upalne parametre te parametre oksidacijskog stresa miokarda u zdravih životinja. Ovo je istraživanje za cilj imalo, ne samo procjenu potencijala klijanaca brokule kao funkcionalne hrane s kardioprotektivnim svojstvima, već i razumijevanje kako klimatske promjene i toplinski stres tijekom uzgoja mogu modificirati nutritivnu i farmakološku vrijednost biljke. Iako su u literaturi zabilježeni rezultati analiza učinka temperature na sadržaj glukozinolata u brokuli, istraživanja su uglavnom usmjerena na učinke različitih tipova procesiranja već ubrane brokule, odnosno učinke termičkih obrada prije konzumacije. Gotovo svi dokazi o promijenjenom biološkom učinku brokule, kao posljedici promjene temperature uzgoja, dolaze od istraživanja na staničnim kulturama (1). Pregledom dostupne literature, ovo je prvo istraživanje koje izravno

evaluira kako promjena fitokemijskog sastava brokule (izazvanog visokom temperaturom uzgoja) korelira sa strukturnim i metaboličkim odgovorom miokarda sisavaca, demonstrirajući da u biljaka izloženima okolišnom stresu može doći do promjene zdravstvenih učinaka. Rezultati ovog istraživanja doprinose boljem razumijevanju složenih interakcija između biljnih bioaktivnih spojeva i kardiovaskularnog sustava i pružaju važne spoznaje o tome kako okolišni čimbenici tijekom uzgoja biljaka mogu utjecati na njihovu funkcionalnost i zdravstvene učinke nakon konzumacije.

### 1.1. *Ciljevi rada*

Glavni cilj rada je istražiti utjecaj promijenjenog sastava glukozinolata i polifenola u klijanacima brokule, uzrokovanog visokom temperaturom uzgoja, na fiziološke i molekularne biljege miokarda miševa soja Swiss. Ovo je istraživanje osmišljeno kako bi se ispitalo djelovanje na normalnu fiziologiju miokarda, simulirajući unos klimatski promijenjene hrane, uz opću svrhu provjere biosigurnosti takve hrane za opću populaciju.

Specifični ciljevi ovog doktorskog rada su:

1. kvantificirati učinak različitih temperatura uzgoja (sobna temperatura, RT,  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$  dan/ $18\text{ }^{\circ}\text{C}$  noć i visoka temperatura, HT,  $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$  dan/ $33\text{ }^{\circ}\text{C}$  noć) na udio ukupnih glukozinolata, ukupnih polifenola, fenolnih kiselina, flavonoida i hidrokisiciničnih kiselina u kljancima brokule;
2. ispitati učinak ponavljane intragastrične primjene vodenih ekstrakata klijanaca brokule uzgajanih pri RT i HT te vodene otopine sinigrina, na strukturne parametre miokarda, uključujući koncentraciju visoko osjetljivog srčanog troponina I (hs-cTnI);
3. procijeniti utjecaj navedenih eksperimentalnih tretmana na funkcionalne parametre miokarda mjerenjem koncentracije atrijskog natriuretskog peptida (ANP);
4. odrediti učinak sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule na odabrane metaboličke biljege miokarda (irizin, adropin, peroksismalna acil-CoA oksidaza 1 – ACOX1);
5. istražiti promjene upalnih biljega u miokardu : matriks metaloproteinaza 2 i 9 (MMP-2, MMP-9), pentraksina 3 (PTX3) i dušikovog (II) oksida (NO, nakon primjene vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule);
6. procijeniti utjecaj vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na oksidacijsko-redukcijski status miokarda mjerenjem koncentracije ukupnog

glutaciona (tGSH), MDA, aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD) i katalaze (KAT) te ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (metode FRAP i ABTS).

## 1.2. *Hipoteze rada*

1. Visoka temperatura uzgoja klijanaca brokule ( $t = 38\text{ °C}$  dan/ $33\text{ °C}$  noć) značajno mijenja udio glukozinolata i polifenola u odnosu na klijanke uzgojene pri sobnoj temperaturi ( $t = 23\text{ °C}$  dan/ $18\text{ °C}$  noć).
2. Promijenjeni udio glukozinolata i polifenola u klijanima brokule uzgojenih pri HT dovodi do promijenjenog učinka na strukturni biljeg miokarda (hs-cTnI) u odnosu na ekstrakt klijanaca brokule uzgojenih pri uvjetima RT.
3. Vodeni ekstrakti klijanaca brokule nisu hematotoksični i imaju prevladavajuće povoljno djelovanje na osnovne hematološke parametre.
4. Sinigrin i ekstrakti klijanaca brokule moduliraju metaboličke biljege (irizin, adropin) i upalne biljege (NO, PTX-3, MMP-2, MMP-9) miokarda, uz moguće spolno specifične razlike.
5. Sinigrin i ekstrakti klijanaca brokule povoljno utječu na oksidacijsko-redukcijski status miokarda povećanjem tGSH i antioksidacijskog kapaciteta (FRAP, ABTS), uz izostanak porasta i/ili smanjenje lipidne peroksidacije, pri čemu se očekuju razlike između ekstrakata klijanaca brokule uzgojenih pri uvjetima RT i HT.

## 1.3. *Metode*

Identifikacija, karakterizacija i kvantifikacija pojedinačnih spojeva klijanaca brokule odredit će se metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s UV/Vis detektorom (HPLC-UV/Vis) prema Šola i sur. (2024) (1).

Hematološki parametri: broj eritrocita, broj leukocita, broj trombocita, koncentracija hemoglobina, vrijednost hematokrita, srednji volumen eritrocita (eng. *Mean Corpuscular Volume*, MCV), prosječna masa hemoglobina u eritrocitu (eng. *Mean Corpuscular Hemoglobin*, MCH), prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu (eng. *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*, MCHC), širina raspodjele volumena eritrocita (eng. *Red Cell Distribution Width*, RDW) i srednji volumen trombocita (eng. *Mean Platelet Volume*, MPV) odredit će se analitičkim metodama na automatiziranom hematološkom

analizatoru.

Koncentracija ukupnih proteina u homogenatima tkiva miokarda odredit će se spektrofotometrijskom metodom po Lowryju (1951) (14).

Strukturni parametar miokarda, hs-cTnI, odredit će se kemiluminiscentnim imunokemijskim testom na automatiziranom medicinsko-biokemijskom analizatoru.

Metabolički i funkcionalni biljezi miokarda odrediti će se mjerenjem koncentracije ANP-a, ACOX1, irizina i adropina spektrofotometrijskim metodama, korištenjem komercijalnih ELISA Kit testova.

Vrijednosti upalnih parametara odredit će se mjerenjem koncentracije PTX3, MMP-2 i MMP-9 spektrofotometrijskim metodama, korištenjem komercijalnih ELISA Kit testova, dok će se vrijednost NO odrediti spektrofotometrijskom metodom prema Griessu (1879) (15). Lipidna peroksidacija utvrdit će se spektrofotometrijskom metodom mjerenjem koncentracije MDA prema modificiranoj metodi Ohkawa i sur. (1979) (16). Antioksidacijska sposobnost vodene otopine sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule procijenit će se određivanjem koncentracije ukupnog glutationa (tGSH) prema modificiranoj metodi koju je opisao Tietze (1969) (17). Enzimska aktivnost superoksid-dismutaze odredit će se spektrofotometrijskom metodom korištenjem komercijalnog ELISA Kit testa, dok će se enzimska aktivnost katalaze odrediti spektrofotometrijski metodom po Aebiju (1984) (18).

Antikoksidacijski kapacitet tkiva u homogenatima miokarda odredit će se spektrofotometrijskim metodama gašenja 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske) kiseline (ABTS) te željezo reducirajućim antioksidacijskim potencijalom (FRAP) prema metodi Katalinić i sur. (2005) (19) prilagođenoj za životinjske organe i modificiranoj u odnosu na izvorni test autora Benzie i Strain (1996) (20).

Statistička obrada podataka provest će se korištenjem softvera STATISTICA 14 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, SAD), dok će grafički podatci biti prikazani korištenjem softvera GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornija, SAD).

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Glukozinolati

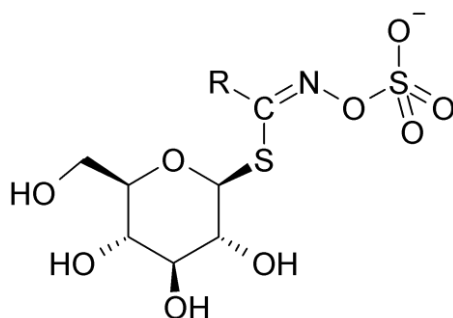
#### 2.1.1. Izvori glukozinolata

Glukozinolati su prirodni specijalizirani biljni metaboliti koji se prvenstveno nalaze u biljkama reda kupusolike (*Brassicales*). Navedeni red obuhvaća oko 30 porodica, među kojima su najpoznatije kupusnjače (*Brassicaceae*), papajevke (*Caricaceae*) i kaparovke (*Capparaceae*). Najveći udio glukozinolata sadrži porodica kupusnjača (*Brassicaceae*) te su ujedno glukozinolati i izravno odgovorni za karakteristična organoleptička svojstva i biološku aktivnost ove nutritivno značajne i izrazito bitne porodice biljaka korištene u ljudskoj prehrani (21, 22). U znanosti poznat predstavnik porodice kupusnjača je sjetvena grbica ili kres salata (*Lepidium sativum* L.), koja je ujedno i najšire istražen model organizma u biljnoj genetici i prva biljka kojoj je sekvenciran cijeli genom (23). Neki od istaknutijih članova ove porodice su cvjetača (*Brassica oleracea* var. *botrytis*), kupus (*B. oleracea* var. *capitata*), brokula (*B. oleracea* var. *italica*), pak choi ili kineski kupus (*B. rapa* ssp. *chinensis*), rotkvica (*Raphanus sativus*) i kelj pupčar (*B. oleracea* var. *gemmifera*) (21). Koncentracije glukozinolata u biljkama se značajno razlikuju ovisno o vrsti te dijelu biljke. Listovi obično sadrže niske do umjerene koncentracije glukozinolata, koje se kreću u rasponu od 1000 ppm pa sve do 3000 ppm, primjerice u kelju pupčaru. Koncentracija glukozinolata u korijenu i sjemenkama može biti znatno veća, od primjerice 30000 ppm u korijenu ljutog hrena pa sve do 60000 ppm u sjemenkama senfa (23).

#### 2.1.2. Građa i klasifikacija glukozinolata

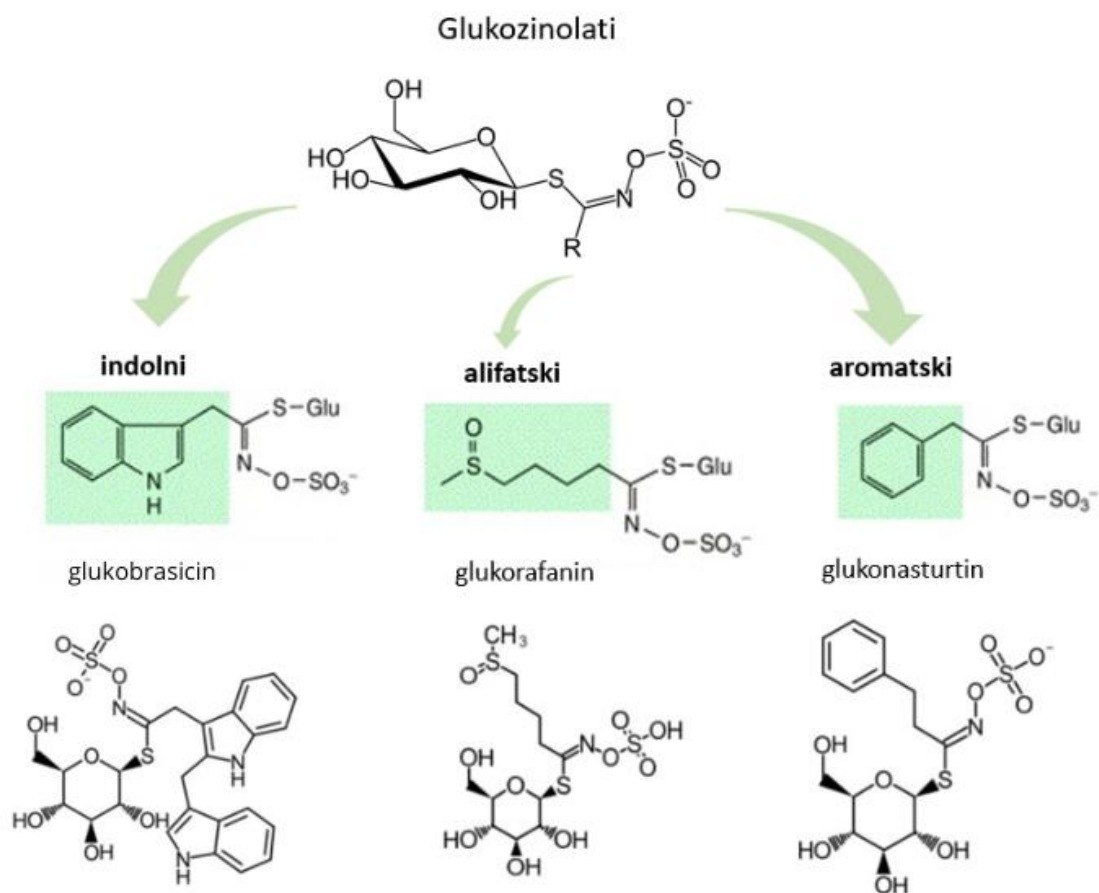
Glukozinolati su dobili ime po svojoj strukturi koja uključuje glukozu ('gluko'), prekursore hlapljivih gorušičinih ulja (eng. 'sinol', hrv. 'zinol'), koji nastaju njihovom razgradnjom i sulfatnu skupinu ('ati') (21). Svi glukozinolati imaju zajedničku osnovnu strukturu sastavljenu od  $\beta$ -D-tioglucoze koja je preko atoma sumpora povezana s (*Z*)-*N*-hidroksiaminosulfatnim esterom i promjenjivim bočnim lancem (*R*) deriviranim od aminokiselina (Slika 1.) (22). Glukozinolat je zapravo tiodroksimat sa sulfatnom esternom skupinom povezanom preko atoma kisika i s glukozom povezanom preko atoma sumpora. Glukozni nastavak je piranozni

oblik D-glukoze povezan s  $\beta$ -glikozidnom vezom, primjerice  $\beta$ -D-glukopiranozid. Preostali dio molekule označava se kao aglikon (24).



**Slika 1.** Osnovna struktura molekule glukozinolata. Kostur molekule sastavljen je od  $\beta$ -tioglukoze koja je preko atoma sumpora povezana s (*Z*)-*N*-hidroksiaminosulfatnim esterom i promjenjivim bočnim lancem (*R*) deriviranim od aminokiselina. Prilagođeno prema Prieto i sur. (23)

Veliki broj i varijabilnost molekula glukozinolata posljedica su modifikacije na aglikonu, točnije na njegovom bočnom lancu, i to poglavito zbog modifikacija aminokiselinskih prekursora, prije formiranja same jezgre glukozinolata, ali i širokog raspona sekundarnih modifikacija, uključujući oksidaciju, desaturaciju, hidroksilaciju, metoksilaciju, sulfataciju i glukozilaciju, kao i supstituciju s acilnim konjugatom na glukozu. Bočni lanac (*R*) izveden je od jedne od osam aminokiselina i sukladno odgovarajućoj kiselini, može biti alifatski (alanin, leucin, isoleucin, metionin, valin), aromatski (fenilalanin, tirozin) ili indolni (triptofan) (23). Analogno tipu bočnog lanca, ustaljena je podjela glukozinolata na alifatske (npr. glukorafanin), indolne (npr. glukobrasicin) i aromatske (npr. glukonasturtin) (Slika 2) (25). Ipak, osim povijesnog, navedena podjela nema velikog biološkog ni kemijskog značaja. Blažević i suradnici (24) su predložili suvremeniji i primjereniji klasifikacijski sustav glukozinolata te su preko 130 potvrđenih glukozinolata klasificirali u devet panela (od A do I) uzimajući u obzir sljedeća tri kriterija: (1) prekursorsku aminokiselinu, (2) vrstu razgradnog produkta, (3) prisutnost ili odsustvo aromatskog nastavka u glukozinolat (24). Navedena se podjela pokazala smislenom, budući da uvažava kemijska i biokemijska svojstva glukozinolata i njihovih razgradnih produkata, istovremeno sadržavajući informaciju o prekursorskoj aminokiselini (26). Kriterij prisutnosti ili odsustva aromatskog dijela molekule je praktičan jer omogućava brzo razdvajanje velike količine glukozinolata korištenjem UV detektora (24).



**Slika 2.** Ustaljena podjela glukozinolata prema tipu bočnog lanca (*R*). Ispod svake skupine naveden je njen predstavnik. Prilagođeno prema Kamal i sur. (25).

### 2.1.3. Biosinteza i uloga glukozinolata u biljkama

Glukozinolati su neravnomjerno raspoređeni u tijelu biljke (26). Biosinteza se uglavnom odvija u listovima, odakle se ovi spojevi onda transportiraju u druge biljne organe. Biosinteza u drugim biljnim organima je aktivnija u ranijoj razvojnoj fazi biljke, a nešto manje u zreloj biljci (21). Glukozinolati su konstitutivne komponente stanice, gdje se sintetiziraju tijekom ranog života biljke i normalno pohranjuju u vakuolama. Ovisno o biljnoj vrsti, također se mogu sintetizirati i sekvestrirati u specifične idioblaste koji su raspoređeni u različitim tkivima biljke. Biosinteza glukozinolata se odvija u tri odvojene faze: (1) elongacija lanca koja se sastoji od umetanja metilenske skupine u bočni lanac alifatskih aminokiselina, (2)

metabolička rekonfiguracija aminokiselinskog nastavka kako bi se formirala osnovna struktura (jezgra) glukozinolata te (3) modifikacija osnovne strukture kako bi se formirali glukozinolati koji nose različite aglikone (26). Postoji veliki broj čimbenika koji mogu utjecati na ekspresiju gena odgovornih za biosintezu glukozinolata: 1) temperatura pri kojoj biljka raste, gdje se pokazalo kako umjerene temperature (15 – 21 °C) pogoduju sintezi glukozinolata, osobito onih alifatskih; 2) podvrsta biljke; 3) gama zračenje kojem se agrikulturni proizvodi često izlažu radi konzervacijske uloge, a zanimljivo je kako pogoduju povećanom sadržaju alifatskih glukozinolata; 4) biljni organ u kojem se glukozinolati proizvode – pokazalo se kako se manje količine pronalaze u floemu, cvjetovima i voću; 5) količini biljci dostupnog dušika i sumpora, koja je obično proporcionalna proizvodnji glukozinolata (23). Kako je već spomenuto, razvojna faza biljke i specifično biljno tkivo koje se promatra, također utječe na koncentraciju glukozinolata. Primjerice, pronađeno je kako tri dana stari klijanci brokule i cvjetače sadrže 10-100 puta veću koncentraciju glukorafanina po gramu, u usporedbi s njihovim odraslim biljkama (27). Očekivano, postoje i sezonske varijacije, a dosad prikupljena saznanja govore u prilog tome da su biljke s najvećom koncentracijom glukozinolata tipično uzgajane u proljetnim mjesecima, u uvjetima umjerene temperature, visokog intenziteta svjetla, duljim danima i sušim uvjetima (27). Iz perspektive biljke, glukozinolati se mogu promatrati kao rezervoari nutrijenata. Naime, u kupusnjača na glukozinolate otpada gotovo 30% svog sumpora u biljci i u uvjetima nutritivne nestašice, moguća je hidroliza glukozinolata i oslobađanje razgradnih produkata, što posljedično omogućava prerazmjestaj sumpora u primarne metabolite poput cisteina. Isto tako, u uvjetima stresa, ovo specijalizirani metaboliti mogu se degradirati za formiranje nekih drugih spojeva (21).

U biljkama glukozinolati imaju svojevrsnu obrambenu ulogu, ublažavajući posljedice biotičkih stresova (nametnici i bolesti), ali i abiotičkih (salinitet, temperaturni ekstremi, zračenje), a njihova konzumacija u ljudi se povezuje s različitim blagotvornim djelovanjem na zdravlje, o čemu će više biti rečeno u nastavku ove disertacije (21). Također su odgovorni za karakterističan okus nekih biljaka, poput gorušice ili ljutog hrena (21). Sami glukozinolati kemijski su inertni, a većina biološke aktivnosti može se pripisati njihovim produktima hidrolize, od čega su najistaknutiji izotiocijanati. Glukozinolati se inače razgrađuju enzimatski, djelovanjem glukozidaze koja se naziva mirozinaza. Ovaj je enzim u biljci obično fizički odvojen, odnosno sekvestriran, od svog supstrata, a u slučaju djelovanja vanjskog štetnog čimbenika (npr. hranjenje biljojeda) struktura stanica se razgrađuje pa enzim dolazi u kontakt s glukozinolatima i hidrolizira ih na toksične ili, šire gledano, aktivne spojeve koji

ostvaruju svoje biološko djelovanje, štiteći na taj način biljku od štetnih vanjskih utjecaja (22). Smatra se kako razgradni produkti glukozinolata mogu na ovakav način biti toksični i spram mikrobioloških patogena, podjednako u podzemnim i nadzemnim dijelovima biljaka. Ipak, u slučaju prekomjerne produkcije toksičnih metabolita glukozinolata, može doći do štetnog djelovanja na samu biljku, u vidu zatvaranja stoma, promjena na mikrotubulima citoskeleta, smanjenje udjela reduciranog glutationa (GSH), inhibicije rasta korijena ili indukcije stanične smrti. Generalno, glukozinolati su izvrstan obrambeni mehanizam protiv općih, a nešto manje i protiv specijaliziranih biljojeda (21).

#### 2.1.4. *Učinak procesiranja na sastav glukozinolata*

Kupusnjače se obično ne konzumiraju odmah netom nakon ubiranja, a pohrana i procesiranje ovog povrća ima značajan učinak na sadržaj glukozinolata i zdravstvene učinke konzumacije. Izgledno je kako zamrzavanje rezultira značajnijim očuvanjem udjela glukozinolata, u odnosu na čuvanje u hladnjaku. Pohranjivanje brokule na temperaturi od 6 °C kroz period od 35 dana rezultiralo je 29% -tnim gubitkom sulforafana (izotiocijanata koji nastaje razgradnjom glukozinolata glukorafanina), u odnosu na 13%-tni gubitak prilikom zamrzavanja na -18 °C kroz 60 dana. Također, pohrana u mraku je smanjila udio alifatskih glukozinolata (27).

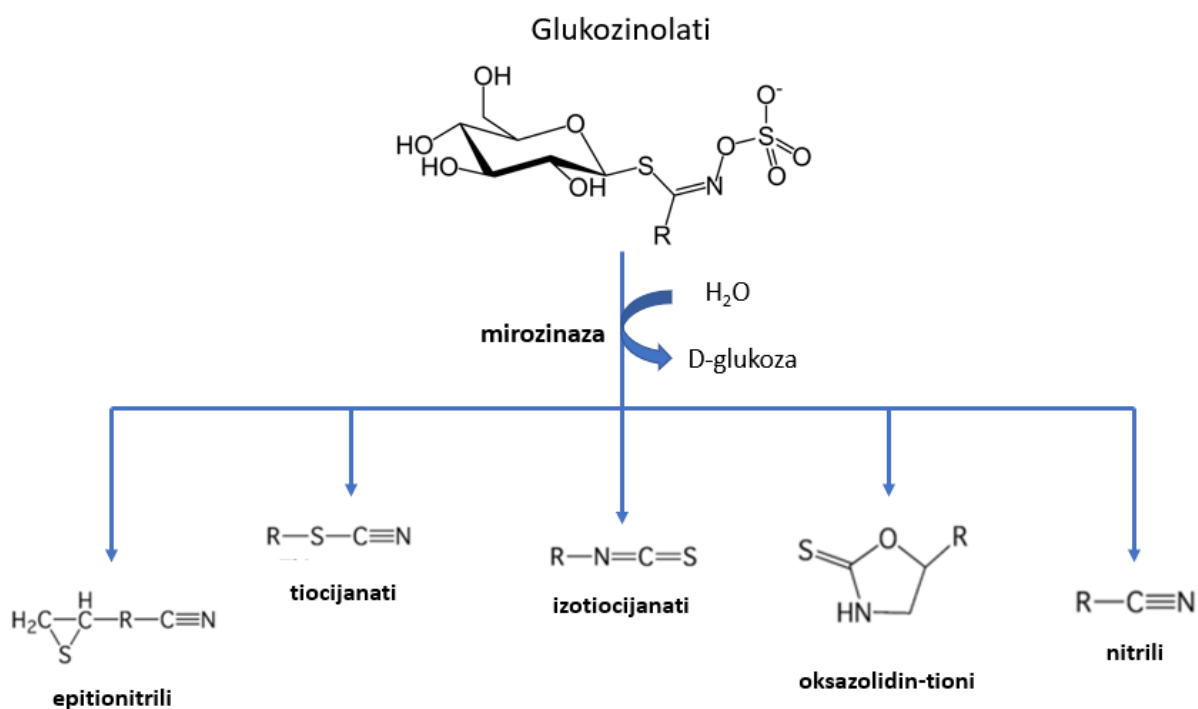
Osim kemijske razgradnje koja uključuje mirozinazu, važno je istaknuti i termičku razgradnju glukozinolata, koja je u mogućnosti temeljito promijeniti sastav glukozinolata, ovisno o primijenjenim kulinarskim tehnikama, poput prokuhavanja, parenja ili mikrovalne obrade (26). Duže kuhanje pri visokim temperaturama ( $> 80$  °C) doprinosi intenzitetu denaturacije mirozinaze. Čini se kako se najveći udio glukozinolata izgubi prilikom klasičnog prokuhavanja povrća zbog ekstrakcije ovih spojeva u vodu pri visokim temperaturama. Druge tehnike poput mikrovalnog kuhanja, parenja i pečenja ne uzrokuju značajan gubitak glukozinolata u povrću (26). Također, alifatski glukozinolati pokazali su se otpornijima na termičku razgradnju pri istoj temperaturi u odnosu na glukobrasacin, najrašireniji indolni glukozinolat (28) Pohranjivanje povrća obično smanjuje količinu glukozinolata, a zamrzavanje sirovih kupusnjača uzrokuje enzimatsku razgradnju glukozinolata koja je potaknuta pucanjem biljne stanice zbog temperaturnih ekstrema. Međutim, zanimljivo je kako se razina glukozinolata u prethodno blanširanom povrću ne mijenja prilikom pohrane u

zamrzivaču. Konzerviranje izrazito smanjuje količinu glukozinolata u biljci, budući da radna temperatura samog procesa premašuje 120 °C, prilikom čega dolazi do opsežne termičke razgradnje ovih spojeva (29).

#### 2.1.5. Razgradnja glukozinolata

Glukozinolati su stabilne molekule u biljnoj stanici koje se generalno smatraju netoksičnim komponentama. Kako je već rečeno, u slučaju štetnog vanjskog djelovanja, koje za posljedicu ima oštećenje tkiva biljke, glukozinolati dolaze u kontakt s razgradnim enzimom, mirozinazom, koja ih hidrolizira do biološki aktivnih metabolita (26). Mirozinaza je  $\beta$ -tioglukozidaza koja razgrađuje glukozinolate na  $\beta$ -D-glukozu i nestabilni aglikon (tiohidroksimat-*O*-sulfonat) (23). Razgradnja supstrata uključuje formiranje kovalentnog enzimskog intermedijera, nakon čega slijedi hidrolitičko oslobađanje glukoze, dok se preostali aglikon spontano preuređuje u konačne produkte. Askorbinska kiselina prepoznata je kao koenzim mirozinaze. Iako nije neophodna za samu hidrolizu glukozinolata, dokazano je da njezina prisutnost može povećati katalitičku aktivnost ovog enzima čak 400 puta. Posljednji korak razgradnje sastoji se od oslobađanja askorbinske kiseline i glukoze s aktivnog mjesta kako bi se enzim povratio u svoju nativnu konformaciju (26). Dosadašnja istraživanja pokazala su kako je sulfatna skupina u glukozinolatima onaj dio molekule koji prepoznaje mirozinazu. Ratzka i suradnici (30) utvrdili su kako kupusni moljac (*Plutella xylostella*), koji je specijalni biljojed kupusnjača, zaobilazi obrambeni mehanizam sastavljen od djelovanja glukozinolata i mirozinaze, vjerojatno uklanjanjem sulfatne skupine u glukozinolatima, na taj način čineći ih nevidljivima mirozinazi, što naposljetku sprječava formiranje toksičnih razgradnih produkata glukozinolata (30). Spontanom reorganizacijom nestabilnog aglikona (tzv. kemijsko preslagivanje po Lossenu) oslobađaju se sulfatni ion i različiti metaboliti. Struktura nastalih metabolita ovisi o sastavu bočnog (*R*) lanca glukozinolata, ali i različitim čimbenicima kao što su pH, dostupnost željeznih iona ( $\text{Fe}^{2+}$ ) te prisutnosti ili odsutnosti proteinskih čimbenika kao što su epitiospecifični proteini (engl. *epithiospecifier proteins* – ESP (21, 23). Najčešći i najviše istraženi razgradni produkti glukozinolata jesu izotiocijanati, ali u specifičnim uvjetima razgradnjom glukozinolata nastaju i oksazolidin-2-tioni, tiocijanati, epitionitrili i nitrili (23). (Slika 3). Pokazalo se da neutralni pH pogoduje nastanku izotiocijanata, koji su izrazito reaktivni i predstavljaju snažne *in vivo* induktore enzima faze II metabolizma, a uočeno je i njihovo djelovanje kao inhibitora mitoze i stimulatora apoptoze u

humanim tumorskim stanicama. Sukladno njihovoj reaktivnosti imaju i fungicidno, fungistatsko, nematocidno i baktericidno svojstvo (23). Ako se bočni lanac glukozinolata hidroksilira na C-3 atomu ugljika, spontana ciklizacija iziotiocijanata rezultira stvaranjem oksazolidin-2-tiona. Ako su prisutni ESP, obično pri niskoj pH vrijednosti ( $\text{pH} < 3$ ) stvaraju se nitrili. Ukoliko je u bočnom lancu prisutna terminalna dvostruka veza, atom sumpora oslobođen tijekom stvaranja nitrila, biva zarobljen dvostrukom vezom, što rezultira stvaranjem epitionitrila. (23).



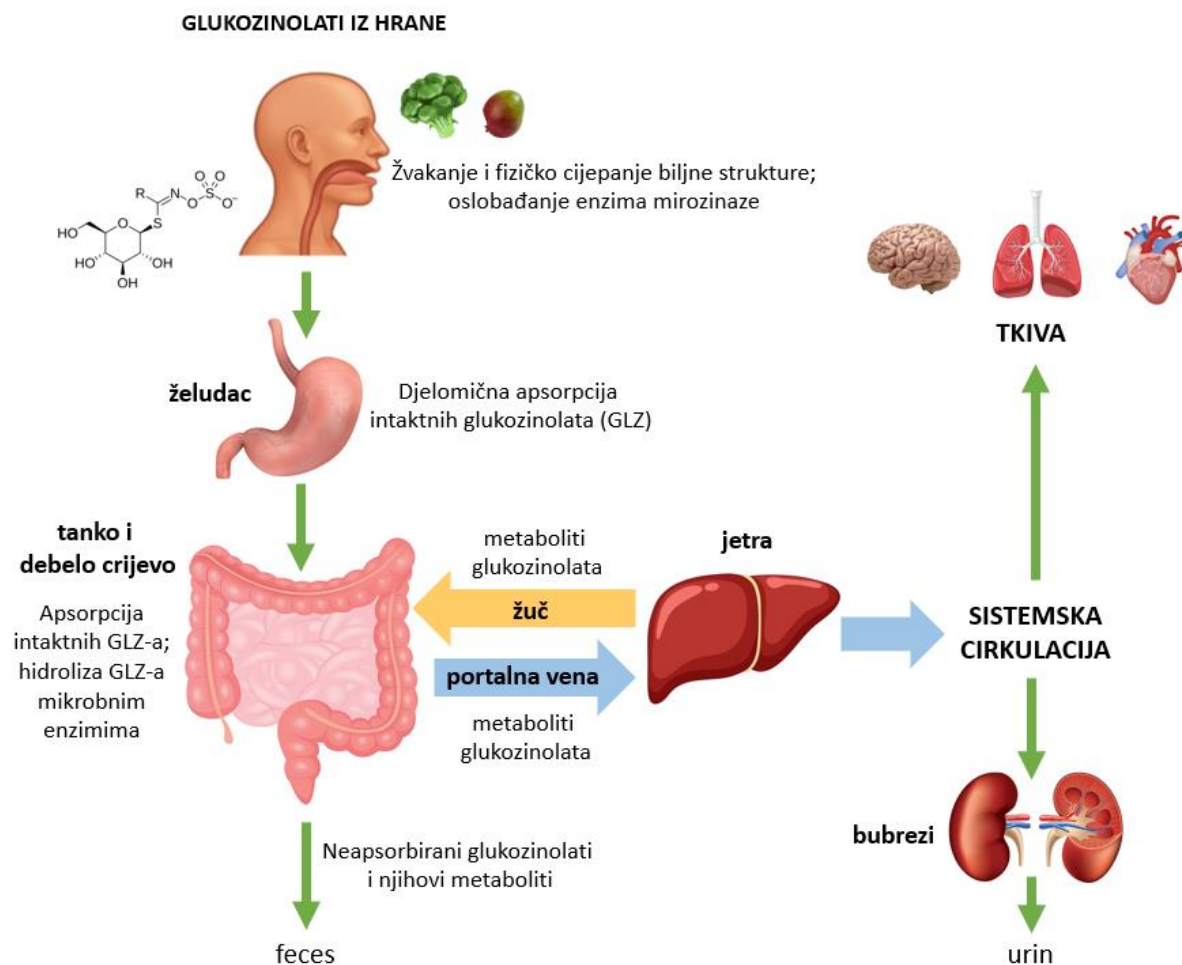
**Slika 3.** Shematski prikaz razgradnje glukozinolata. Prilagođeno prema Kamal i sur. (25).

#### 2.1.6. Metabolizam i bioraspoloživost glukozinolata u organizmu sisavaca

Bioraspoloživost glukozinolata, odnosno njihovih biološki aktivnih razgradnih produkata, pod utjecajem je brojnih egzogenih i endogenih čimbenika, kao što su: 1) priroda samog biljnog materijala; 2) koncentracija glukozinolata i produkata njihove hidrolize u biljnom materijalu; 3) koncentracija i stabilnost mirozinaze u biljnom materijalu; 4) hidroliza tijekom pohrane i procesiranja biljnog materijala; 5) specifična topljivost, stabilnost i fizikalno-kemijska svojstva svakog od glukozinolata ili derivata; 6) intezitet oštećenja stanica tijekom mastikacije; 7) probava u želucu i procesiranje u tankom crijevu; 8)

fermentacija mikrobiote debelog crijeva (23).

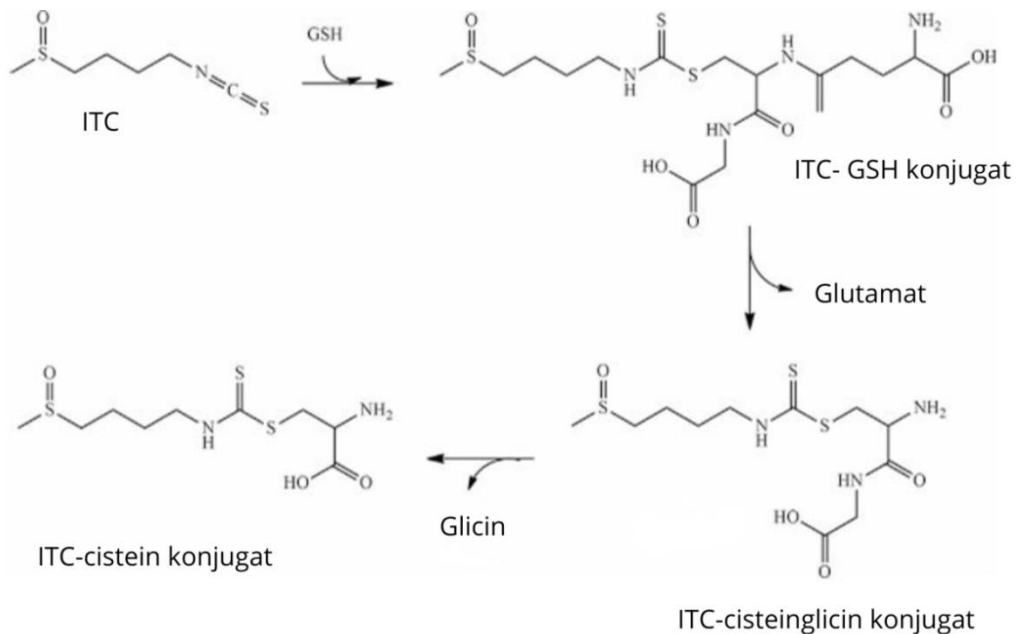
Metabolizam glukozinolata shematski je prikazan na slici 4. Nakon ingestije vrlo mala količina glukozinolata može se direktno apsorbirati u želucu i tankom crijevu (31). Prema rezultatima istraživanja na ovaj način apsorbirani glukozinolati čine do 5% nativnih glukozinolata u urinu (32). Termičkom obradom hrane većinski dio mirozinaze gubi svoju aktivnost zbog denaturacije samog enzima. Ipak, u gornjem dijelu probavnog sustava, uključivši želudac i dvanesnik, može doći do razgradnje glukozinolata posredovanjem manjeg dijela očuvane biljne mirozinaze, koja nije denaturirala zbog termičke obrade te se posljedično tome razgradni produkti glukozinolata mogu apsorbirati preko sluznice spomenutih organa. Sličan proces odvija se i u većem dijelu tankog crijeva, gdje postoji mogućnost da još uvijek funkcionalna biljna mirozinaza (nije se denaturirala posredovanjem želučane kiseline ili crijevnih enzima) razgradi glukozinolate. Preostali, nerazgrađeni, glukozinolati nastavit će svoj put probavnim traktom i dospijet će u kolon gdje će ih razgraditi bakterijska mirozinaza. Naime, sisavci, uključujući i ljude, ne posjeduju enzim mirozinazu te se većinski dio razgradnje glukozinolata odvija posredovanjem bakterijske mikroflore kolona (32). Važna uloga bakterija kolona u razgradnji glukozinolata dokazana je u istraživanju s gnotobiotskim štakorima, kod kojih su se nakon kolonizacije crijeva ljudskom crijevnom mikroflorom i konzumacije čistog glukozinolata sinigrina, u crijevu detektirali razgradni produkti glukozinolata (izotiocijanati) (33). Za neke bakterijske sojeve poput *Bifidobacterium longum*, *B. pseudocatenulatum* i *B. adolescentis*, dokazana je *in vitro* sposobnost razgradnje glukozinolata (23). Razgradni produkti glukozinolata asporbiraju se kroz crijevnu sluznicu u krvotok, a postoje različiti podatci o brzini apsorpcije. Izotiocijanati se mogu u krvotoku detektirati već 15 minuta nakon ingestije, a najveća koncentracija u periodu od jednog do tri sata nakon ingestije, što se odnosi na apsorpciju razgradnih produkata glukozinolata u gornjem dijelu probavnog sustava (23). Podatci o distribuciji glukozinolata i njihovih razgradnih produkata većinom su dobiveni istraživanjima na animalnim modelima i ograničeni su na najistaknutije predstavnike, izotiocijanate. Smatra se kako izotiocijanati prolaze kroz četkastu membranu enterocita uglavnom pasivnom difuzijom, a nakon apsorpcije mogu se putem membranskih transportera povratno izlučiti u crijevo, pasivnom difuzijom ili drugim načinom transporta prijeći u krvnu plazmu ili se metabolizirati u samom enterocitu (31).



**Slika 4.** Shematski prikaz metabolizma glukozinolata u organizmu sisavaca. Prilagođeno prema Prieto i sur. (23).

U istraživanjima koja su koristila radiokativno označene izotiocijanate najveća je distribucija radioktivnosti uočena u crijevnoj mukozii, jetri, bubrezima, mjehuru, plućima i slezeni, dok su niže koncentracije radioktivnosti uočene u srcu i mozgu (23). U sisavaca nije poznato da se glukozinolati mogu akumulirati u mišićima, masnom tkivu, jetri ili bubregu, a u minimalnim količinama detektiraju se u izlučenom mlijeku te mogu uzrokovati promjenu njihovog okusa (23). Metabolički put izotiocijanata predodređen je njihovom elektrofilnom prirodom, koja omogućuje detoksifikaciju putem konjugacije s nukleofilnom tiolnom skupinom (-SH) na GSH, posredovanom glutation transferazom, što se naziva detoksifikacijskom reakcijom faze-II (34) (Slika 5). Ova se detoksifikacija uglavnom odvija u jetri i enterocitima, gdje su konjugati podvrgnuti seriji modifikacija, proizvodeći brojne intermedijarne ditiokarbamate, koji se mogu izlučiti u urinu ili nastaviti metabolički put do prelaska u derivat merkapturične kiseline (*N*-acetil-*S*-(*N*-alkiltiokarbamol)-*L*-cistein) (23).

Postoji alternativni metabolički put izotiocijanata te se u istraživanju s radioaktivno označenim spojevima pokazalo da se prosječno 15 % radioaktivnih spojeva izluči u procesu disanja, u obliku ugljikova(IV) oksida (CO<sub>2</sub>) ili kao nepoznati metaboliti u fecesu. Radioaktivnost je također detektirana u žuči, što znači da postoji cirkulacija metabolita između jetra i crijeva (hepatosplenična cirkulacija) (23).



**Slika 5.** Metabolički put izotiocijanata (ITC). Faza 2 detoksikacijske reakcije sa svrhom inaktivacije ITC-ova putem konjugacije nukleofilne tiolne (-SH) skupine glutationa. Prilagođeno prema Prieto i sur (23).

U svrhu istraživanja bioraspoloživosti glukozinolata etabrirana je upotreba merkapturične kiseline kao urinarnog biološkog biljega, budući da je ona glavni razgradni produkt izotiocijanata u ljudi. Postotna vrijednost merkapturične kiseline u urinu varira u rasponu od 12 do 80%. Uzroci varijacije su količina prisutne biljne mirozinaze (što ovisi o vrsti biljke i postupcima termičke obrade), crijevnoj mikrobioti individualnog organizma i njegovoj sveukupnoj sposobnosti hidroliziranja glukozinolata, kao i strukturnim svojstvima svake molekule glukozinolata. Kada se povrće konzumira sirovo redovno se opažaju više vrijednosti merkapturične kiseline u urinu, dok se kod konzumacije prethodno termički obrađene hrane gotovo nikad ne bilježi postotna vrijednost veća od 20% (32). Ovakva i slična

zapažanja govore u prilog činjenici da je za postizanje veće biodostupnosti izotiocijanata uputno čim više očuvati mirozinazu biljnog podrijetla, prvenstveno smanjujući termičku obradu povrća (23). Iako su pouzdane informacije o tome ograničene, smatra se da se slično izotiocijanatima i nitrili te epitionitrili mogu metabolizirati i izlučiti u urinu kao merkapturična kiselina (32).

#### 2.1.7. *Kemoprotektivno, antioksidacijsko i protuupalno djelovanje glukozinolata*

Glukozinolati, specifičnije njihovi metaboliti, imaju kemoprotektivno djelovanje, ponajviše zbog njihove sposobnosti inhibiranja metabolizma faze I, putem supresije enzima citokroma P450, koji metabolizira i aktivira brojne kancerogene spojeve, ali i putem indukcije detoksifikacijskih enzima metabolizma faze II, kao što su kinon reduktaza, glutation-S-transferaza i glukuronozil transferaze. Glukozinolati mogu biti induktori citoprotektivnih enzima u sisavaca, koji blokiraju stanični ciklus i promiču apoptozu stanica raka (kolona, dojke, pluća i dr.) (23). Znatno broj gena koji kodiraju citoprotektivne proteine dijele zajedničku transkripcijsku regulaciju preko Keap1 (eng. *Kelch-like ECH-associated protein*) – Nrf2 (eng. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)-ARE (eng. *antioxidant response element*) puta. Keap 1 služi kao adaptor za supstrate u Cul3-ovisnom ubikvitin-ligaznom kompleksu, pri čemu veže Nrf2 i usmjerava ga ka ubikvitinaciji putem E2 ubikvitinske ligaze. Ova ubikvitinacija služi kao okidač proteosomalne degradacije Nrf2. Izotiocijanati, kao i drugi tiol-reaktivni spojevi (tzv. induktori), reagiraju sa specifičnim cisteinskim ostacima Keap1, na taj način sprječavajući njegovu sposobnost vezanja i usmjeravanja Nrf2 za ubikvitinaciju i degradaciju. Posljedično, Nrf2 se akumulira i premješta u jezgru gdje formira heterodimer s malim Maf transkripcijskim čimbenikom i veže se za ARE, specifičnu sekvencu DNA u uzvodnim regulatornim regijama citoprotektivnih gena, te naposljetku aktivira transkripciju. Centralni elektrofilni ugljik u molekuli izotiocijanata reagira s tiolnom skupinom. Dokazana je direktna modifikacija cisteinskih ostataka Keap1 od strane sulforafana, i to korištenjem pročišćenog rekombinantnog proteina, ali i ektopično izraženog Keap1, izoliranog iz izotiocijanatima izloženih COS-1 stanica (eng. *CV-1 in Origin with SV40 genetic material*), koje predstavljaju immortaliziranu staničnu liniju nastalu iz bubrežnog tkiva afričkog zelenog majmuna (35). Ovo djelovanje, zajedno sa sposobnosti blokiranja oštećenja DNA, objašnjava zašto bi glukozinolati, odnosno izotiocijanati kao metaboliti koji nastaju od njih, mogli selektivno inhibirati rast tumorskih stanica, čak i nakon

kemijske incijacije kancerogeneze (23). U nastavku, kod predstavljanja predstavnika glukozinolata, naznačeno je za koje su karcinome ustanovljeni pozitivni učinci glukozinolata u vidu inhibicije rasta karcinoma.

Glukozinolati/izotiocijanati imaju protuupalni učinak i svojevrsni su modulatori upalnog odgovora, budući da su sposobni reducirati ili čak inhibirati aktivnosti nuklearnog faktora  $\kappa$ B (eng. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B inače regulira ekspresiju ciklooksigenaze 2 (COX-2), proupalnog enzima odgovornog za povišene razine prostaglandina i ključnog induktora upalnih procesa (36). Ta je činjenica bitna, uzevši u obzir da je upala jedan od temeljnih procesa u bolestima kardiovaskularnog sustava.

#### 2.1.8. Biocidno djelovanje glukozinolata

Glukozinolati imaju antifungalno, antimikrobno, herbicidno, ali i nematocidno djelovanje. Biocidna aktivnost pridaje se produktima hidrolize glukozinolata, koji se proizvode u prisutnosti neke prijatnje biljci, u ovom slučaju nekog od patogena. Reaktivna skupina  $-N=C=S$  izotiocijanata uzrokuje biološku štetu zbog svoje visoke reaktivnosti prema nukleofilima, ponašajući se kao primatelj za bočne lance proteina s tiolom i aminima u fiziološkim uvjetima. Na ovakav način moguće je kovalentno vezanje za proteine, što modificira njihovu terciarnu i kvaternu strukturu te uzrokuje gubitak funkcionalnosti (23). Osim toga, opisani su i drugi mogući mehanizmi biocidnog djelovanja izotiocijanata, poput vezanja za sulfhidrilne (-SH) skupine u aktivnim mjestima mikrobnih enzima, čime se može potaknuti nakupljanje slobodnih radikala, inhibicije ekspresije gena odgovornih za sustav *quorum sensing* (komunikacija i koordinacija između bakterija), indukcije odgovora na toplinski stres, djelovanja kao razdruživača oksidacijske fosforilacije, narušavanja sinteze peptidoglikana bakterijske stijenke te inhibicije enzima uključenih u stanično disanje. (22). Razgradni produkti glukozinolata potentni su inhibitori bakterijske aktivnosti. U jednom je istraživanju proučeno djelovanje izotiocijanata iz kupusnjača na 15 izolata meticilin-rezistentnog *Staphylococcus aureus* (MRSA, eng. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), izoliranog iz ulkusa dijabetičkog stopala. Rezultati su pokazali kako su alil-, benzil- i 2-fenilet-il-izotiocijanati učinkoviti protiv MRSA, s najvećom učinkovitošću zabilježenom za benzil-izotiocijanati koji je imao minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIK) u rasponu od 2.9

do 100 µg/mL i stopom antibakterijske aktivnosti do 87%. Također, uočena antibakterijska aktivnost većinom je bila baktericidna(37).

#### 2.1.9. *Nepovoljni učinci glukozinolata*

Negativni učinci glukozinolata opaženi su u domaćih životinja, a obično se javljaju prilikom unosa ovih spojeva u izrazito visokim koncentracijama. Među istaknutim simptomima često se prijavljuju smanjenje unosa hrane, što uzrokuje zaostajenje u rastu te indukciju deficijencije joda. Koliko je poznato, u literaturi nisu opisani značajni štetni utjecaji glukozinolata na ljudsko zdravlje prilikom uobičajenog unosa prehranom (26).

### 2.2. *Polifenoli*

#### 2.2.1. *Izvori polifenola*

Polifenoli su specijalizirani biljni metaboliti koji sadrže jednu ili više aromatskih jezgri na koje je vezana jedna ili više hidroksilnih (-OH) skupina. Slično kao glukozinolati, sudjeluju u obrani biljaka protiv stresa i omogućuju im prilagodbe na nove životne uvjete. Polifenoli su široko rasprostranjeni u prirodi i izrazito se razlikuju u svojoj molekularnoj strukturi. Mogu se pronaći u plodovima, listovima, stabljikama, korijenu i sjemenkama, a do danas je identificirano preko 8000 različitih polifenola (38). Kemijski gledano, polifenoli se u prirodi mogu nalaziti u slobodnom obliku kao aglikoni ili, češće, vezani za molekule šećera u obliku glikozida. Što se tiče njihove lokalizacije u biljci, mogu biti prisutni u unutarstaničnim odjeljcima ili čvrsto vezani za komponente izvanstaničnog matriksa i stanične stijenke (38). Glavni prehrambeni izvori polifenola su voće i pića poput sokova, vina, čaja, kave, vruće čokolade i piva, povrće, mahunarke te žitarice. U standardnoj prehrani ukupni dnevni unos polifenola je oko 1 gram, od čega jednu trećinu čine fenolne kiseline, dvije trećine flavonoidi, a ostale skupine čine manju količinu polifenola unesenih prehranom (39). Treba istaknuti kako su polifenoli najzastupljeniji antioksidansi u prehrani i to čak 20 puta zastupljeniji od vitamina E i karotenoida te 10 puta zastupljeniji od vitamina C. Polifenoli mogu inhibirati dva enzima koji doprinose nastanku oksidacijskog stresa: nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat (NADPH) oksidazu te ksantin-oksidazu. Zbog njihovih fizikalno-kemijskih svojstava, polifenoli mogu utjecati na aktivnost brojnih enzima, a time i na stanične signalne i prijenosne putove, zbog čega često sudjeluju u brojnim metaboličkim redoks procesima (8).

### 2.2.2. Građa i klasifikacija polifenola

Kemijska građa polifenola uključuje jedan ili više aromatskih prstenova na koje su vezane hidroksilne skupine (40). Zbog velikog broja spojeva i različitosti građe, terminologija i klasifikacija ovih spojeva je kompleksna. Ustaljena je podjela polifenola po kemijskoj strukturi na flavonoide (flavoni, flavonoli, flavononi, flavan-3-oli, antocijanini i izoflavoni), fenolne kiseline (hidroksibenzoične i hidroksicimetne kiseline), stilbene (resveratrol, piceatanol), lignane (sesamol, pinosin, sinol, enterodiol) te druge, poput tanina, lignina, ksantona, kromona i antrakinona (8, 38) (**Slika 6.**).

Flavonoidi se astaoje od dva aromatska i jednog heterocikličkog prstena s tipičnim C6-C3-C6 kosturom (41). Flavonoidi čine otprilike dvije trećine svih polifenola i rasprostranjeni su u gotovo svim tkivima većine biljaka (42). Jedan od flavona, luteolin, prisutan je u češnjaku, čaju od kamilice i celeru, a u animalnim modelima pokazao je svojstvo redukcije krvnog tlaka (41).

Flavonoli su najviše dostupni u luku, čaju, brokuli i voću, a najistaknutiji pripadnici ove skupine su kvercetin i kempferol, oba poznata po antihipertenzivnom djelovanju (8). Osim toga, kvercetin se povezuje sa smanjenjem razine oksidacijskog stresa u srcu i bubrezima, a za kempferol se pokazalo da smanjuje albuminuriju i proteinuriju (8).

U skupinu flavan-3-ola pripadaju monomeri kao što su epikatehin, galokatehin, katehin i oligomeri (proantocijanidini). Katehinski monomeri prisutni su u proizvodima od jabuke, kruške, kaka, čaja i grožđa u formi aglikona. Epigalokatehin-3-galat je u velikoj količini prisutan u zelenom čaju, a povezuje se s antioksidacijskim, protuupalnim i antiaterosklerotskim djelovanjem (8).

Predstavnici skupine flavonona su naringenin i hesperetin, spojevi dominantno prisutni u citrusnom voću, pogotovo njihovoj kori. Imaju izrazito antioksidacijsko svojstvo, a prema recentnim saznanjima i antihipertenzivno te antiaterosklerotsko djelovanje (43).

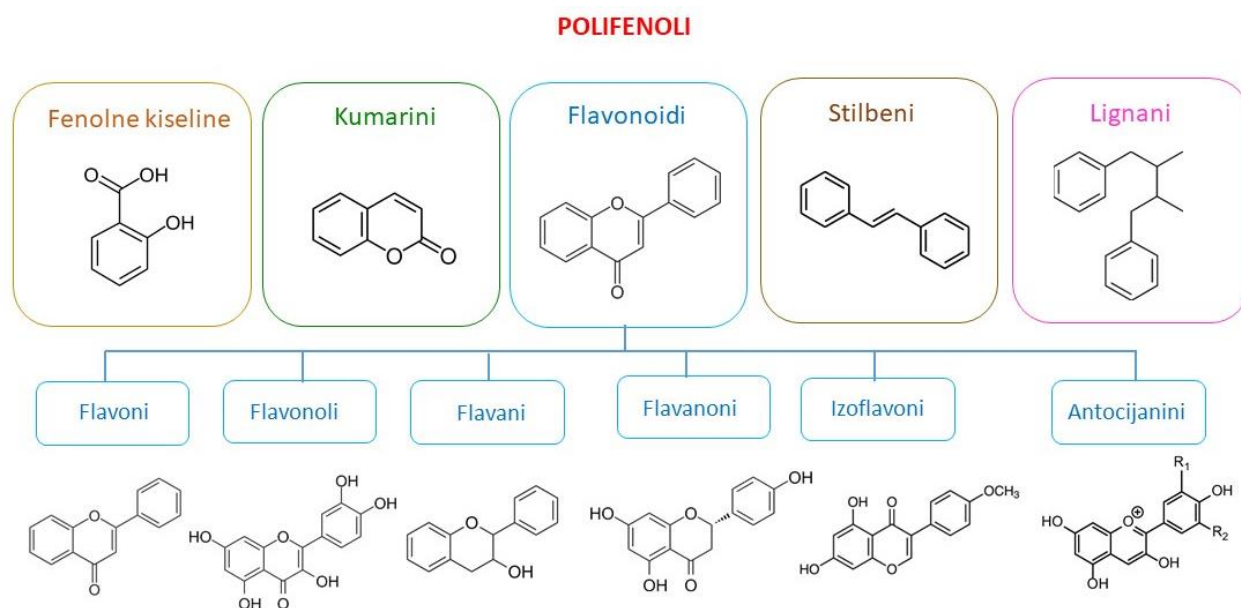
Antocijanini su topljivi spojevi koji su zaslužni za plavu, crvenu ili ljubičastu boju voća i povrća, a najzastupljeniji su u crvenom voću (šumsko voće, grožđe), vinu, žitaricama, ljubičastom kukuruzu i povrću poput kupusa (44). Istraživanja ukazuju na njihovo povoljno djelovanje na zdravlje endotela, antiaterosklerotski učinak i blagotvorno djelovanje na zdravlje srca, u kontekstu smanjenja rizika od srčanog zatajenja (45).

Izoflavoni su strukturno slični estrogenu sisavaca, a njihov su glavni izvor soja, bijela i

crvena djetelina, lucerna i grah. Istaknuti predstavnici ove skupine jesu daizdein i genistein. Često ih se označava „fitoestrogenima“ jer mogu djelovati kao agonisti estrogenskih receptora. Povezuje ih se s povoljnim učinkom na gustoću kostiju u postmenopausalnih žena, ali i nižim kardiovaskularnim rizikom zbog povoljnog djelovanja na razinu triglicerida, kolesterola i bioloških biljega oksidacijskog stresa (46).

Fenolne kiseline čine skupinu organskih spojeva koja se sastoji od aromatskog prstena povezanog s karboksilnom skupinom kiseline, a mogu se podijeliti na hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Mogu se pronaći u sjemenkama, voću i povrću zelene boje. Osim nutritivne vrijednosti, bitno je istaknuti i njihovu široku upotrebu u kozmetici i medicini (47). Fenolne kiseline druga su najveća skupina polifenola i može ih se pronaći u otprilike jednoj trećini biljaka. Visoko antioksidacijsko djelovanje duguju aromatskom prstenu u strukturi molekule, koji ima svojstvo otpuštanja elektrona (42). Hidroksibenzojeve kiseline derivati su benzojeve kiseline ( $C_7H_6O_2$ ), a u tu podskupinu ubrajaju se salicilna, protokatehinska, vanilinska, benzojeva, galna i elaginska kiselina. Hidroksicimetne kiseline aromatske su kiseline izvedene od cimetine kiseline i može ih se pronaći u kavi, bobičastom voću, jabukama, žitaricama i kiviju. Istaknuti predstavnici ove skupine su ferulična, sinapinska, kumarinska i kavena kiselina (8).

Stilbeni sadrže dva fenilna ostatka povezana metilenskim mostom od dva atoma ugljika (1-2 – difeniletilenska jezgra), a ova osnovna struktura može biti glikozirana, metilirana ili prenilirana specifičnim enzimima (42). Najpoznatiji predstavnik stilbena je resveratrol, a većinom se nalazi u grožđu i crnome vinu. Resveratrol se povezuje sa sniženjem krvnog tlaka, protuupalnim djelovanjem, kao i zaštitnim djelovanjem protiv razvoja karcinoma kože (47).



**Slika 6.** Podjela polifenola s odgovarajućom općom molekularnom strukturom. Autor: dr. sc.Vedran Balta.

Drugi poznati pripadnici ove skupine su piceatanol, pinosilvin, pinostilben, kombretastanin, polidatin, mulberosid i drugi oligostilbeni. Sveukupno gledajući, manji udio široko korištenih namirnica sadrži stilbene, u usporedbi s flavonoidima i fenolnim kiselinama (42).

Lignani su bifenolni spojevi koji nastaju kombinacijom dvaju fenil-propanoide (C6-C3). Za biološka svojstva ove skupine odgovorne su eterska, laktonska ili ugljikova veza na bifenolnom prstenu. Proučavani lignani su sekoizolaricirezinol, matairezol i pinorezinol (42).

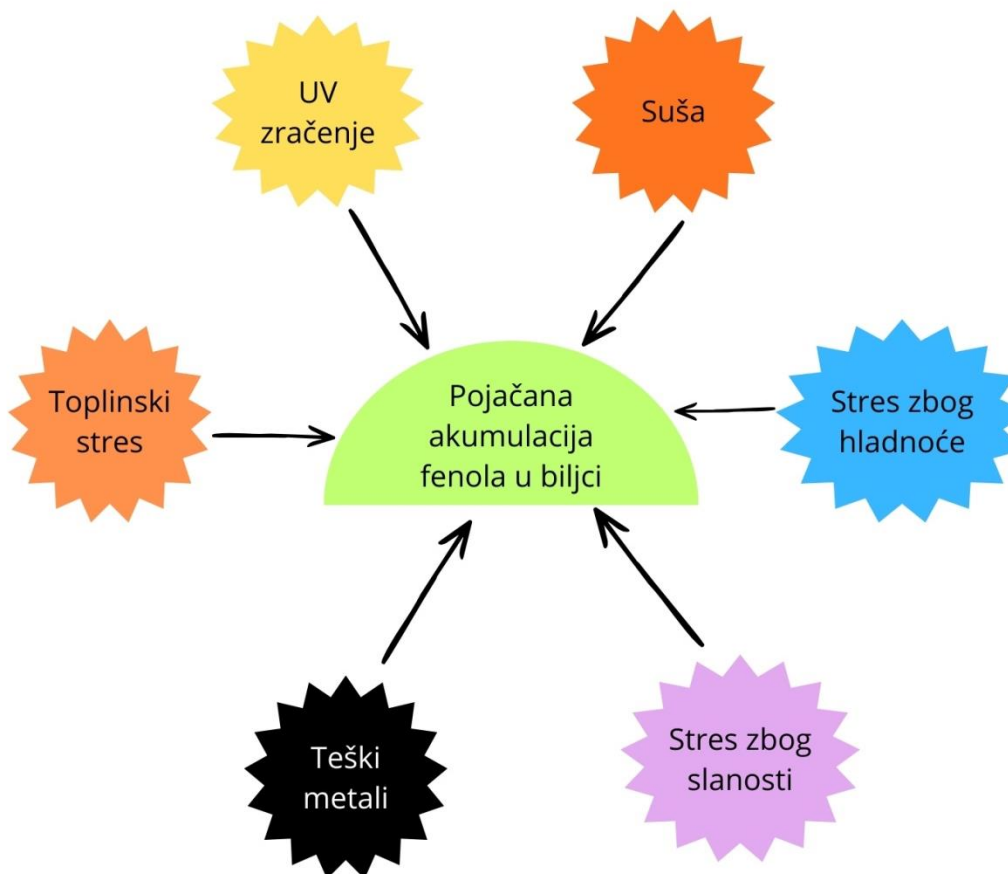
### 2.2.3. Uloga u biljkama i biosinteza polifenola

Biosinteza polifenola u biljkama primarno se odvija putem šikimata i fenilpropanoidnog puta, uz značajno sudjelovanje i acetat-malonatnog puta (48). Put šikimata služi kao polazna točka za sintezu aromatskih aminokiselina, poput fenilalanina, tirozina i triptofana, koje su esencijalni prekursori za sintezu mnogih polifenolnih spojeva. Iz šikimatnog puta proizlaze intermedijeri koji su ključni za daljnje grane biosinteze (49). Fenilpropanoidni put započinje s L-fenilalaninom, produktom šikimatnog puta. Ključni

enzim, fenilalanin amonija-lijaza, katalizira pretvorbu fenilalanina u *trans*-cimetnu kiselinu, koja je prekursor za širok spektar fenilpropanoida (50). Ovaj put generira ogroman niz specijaliziranih metabolita, uključujući flavonoide, lignane i hidroksicimetne kiseline te je ključan za interakcije biljke s okolišem (51). Acetat-malonatni put je važan za sintezu pojedinih skupina polifenola, pogotovo flavonoida i stilbena. U sintezi flavonoida, jedan aromatski prsten potječe iz fenilpropanoidnog puta (izvedenog iz puta šikimata), dok drugi prsten nastaje putem acetat-malonatnog puta, koristeći malonil-CoA kao prekursor. Enzimi poput halkon sintaze igraju ključnu ulogu u kondenzaciji ovih prekursora, formirajući halkone, koji su preteče flavonoida (52).

Polifenoli imaju iznimno važnu i svestranu ulogu u gotovo svim fazama životnog ciklusa biljke, služeći ne samo kao obrambeni mehanizmi već i kao ključni elementi za rast i razvoj. Esencijalni su za procese kao što su starenje (senescencija) i razvoj cvijeta te djeluju kao kemijski glasnici i unutarnji fiziološki regulatori, utječući na diobu stanica, regulaciju hormona, aktivnost fotosinteze, mobilizaciju hranjivih tvari i reprodukciju (53). Važno je istaknuti da proizvodnja polifenola od strane biljke predstavlja obranu protiv biotičkih stresora poput patogena (bakterije, virusi, gljive) i biljojeda (insekti, sisavci), a mnogi polifenoli posjeduju antimikrobna svojstva i mogu djelovati kao repelenti ili toksini, čime smanjuju štetu uzrokovanu prethodno nabrojanim biotičkim stresorima (54).

Jedna od najvažnijih uloga polifenola je zaštita biljaka od nepovoljnih uvjeta okoliša (**Slika 7.**). U uvjetima stresa kao što su suša, ekstremne temperature (visoke/niske), salinitet, prisutnost teških metala i UV zračenje, biljni organizmi pojačavaju sintezu polifenola (48, 55). U tim uvjetima, polifenoli djeluju kao snažni antioksidansi, neutralizirajući slobodne radikale i reaktivne kisikove spojeve koji nastaju kao odgovor na stres (50). Osim obrambenih funkcija, polifenoli doprinose i senzornim karakteristikama biljaka, kao što su boja i okus plodova i povrća, što može biti ključno za privlačenje oprašivača i raspršivača sjemena, čime se osigurava reprodukcija biljke (56).



**Slika 7.** Shematski prikaz utjecaja abiotičkih stresora na akumulaciju polifenola u biljnom organizmu. Prilagođeno prema Sharma i suradnici (50).

#### 2.2.4. Učinak procesiranja na sastav polifenola

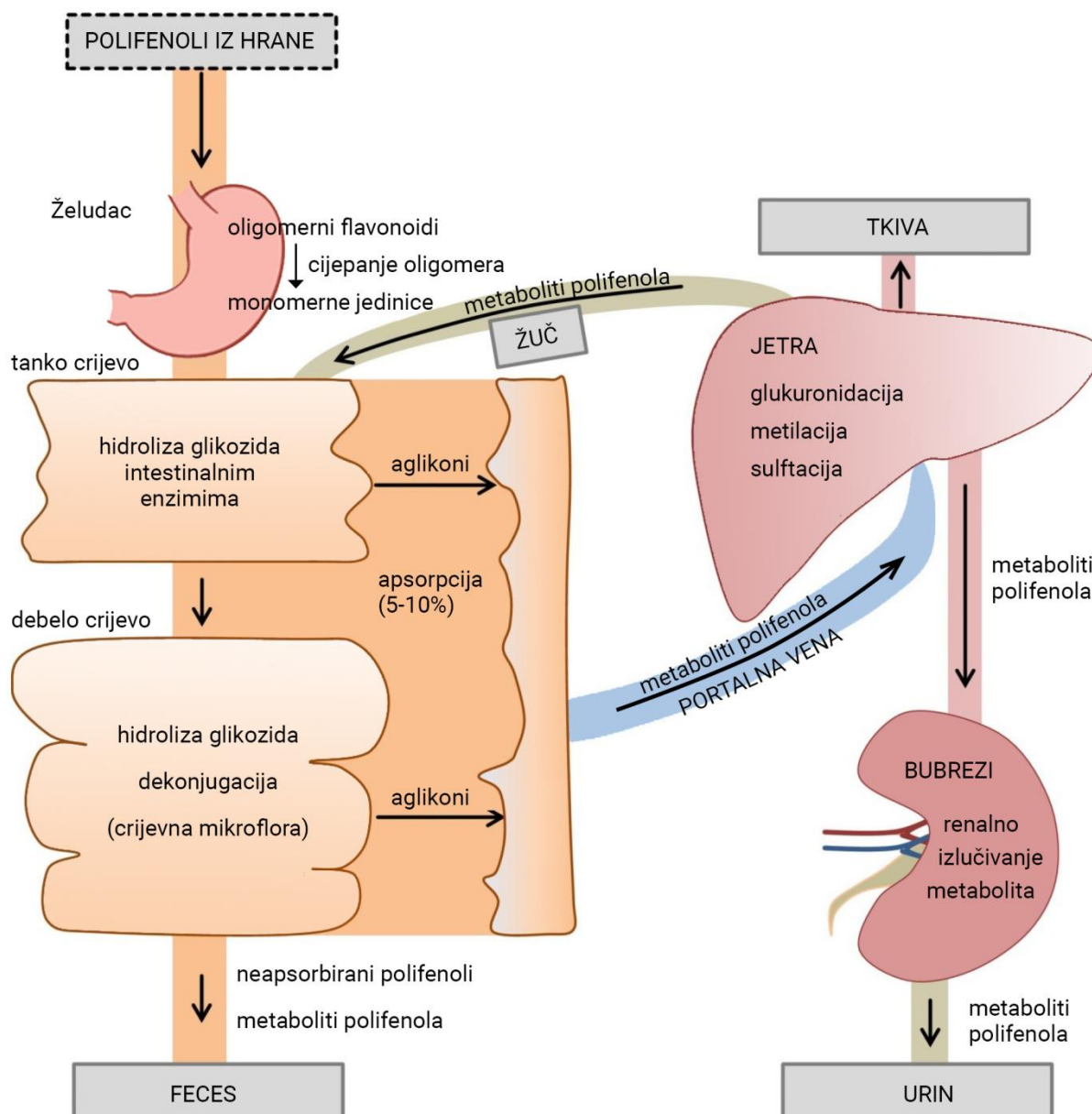
Procesiranje može dovesti do promjena u udjelu, stabilnosti, bioraspoloživosti i bioaktivnosti polifenola. Polifenoli su osjetljivi na različite uvjete tijekom komercijalne obrade, što može rezultirati gubitkom izvornih oblika polifenola ili stvaranjem novih spojeva koji proizlaze iz procesa. Ključni parametri procesiranja koji utječu na stabilnost polifenola uključuju fizikalno odvajanje, prisutnost enzima i kisika, pH-vrijednost te toplinu (57). Termička obrada, poput kuhanja, prženja, pečenja, blanširanja i sterilizacije, imaju značajan utjecaj na polifenole. Visoke temperature mogu uzrokovati kemijsku oksidaciju, polimerizaciju i degradaciju polifenola, što obično dovodi do smanjenja ukupnog udjela fenolnih spojeva. Na primjer, kod konzerviranja i skladištenja marelica, visoke temperature uzrokuju kemijsku oksidaciju koja dovodi do polimerizacije i degradacije polifenola. Neke

termičke obrade mogu dovesti do izomerizacije ili hidrolize polifenola. Primjerice, prženje može značajno povećati udio hidroksicimetnih kiselina u tamnojubičastom patlidžanu zbog izomerizacije i hidrolitičkih reakcija, dok kuhanje, roštiljanje i pečenje imaju negativne učinke (58). Nadalje, guljenje namirnica može značajno smanjiti količinu fenolnih kiselina. Kuhanje može smanjiti udio kvercetina u rajčicama i luku do tri četvrtine, a mikrovalno kuhanje do dvije trećine, dok prženje ima manji učinak (59). Brokula i tikvice gube značajan dio ukupnog fenolnih spojeva pri kuhanju i prženju. Iznenadujuće, neke termičke obrade mogu poboljšati bioraspoloživost polifenola razgradnjom staničnih stijenki biljaka i oslobađanjem vezanih polifenola, čineći ih dostupnijima za apsorpciju (60). Kombinacije termičkih obrada s drugim tehnikama, uključujući primjenu mikrovalova, ultrazvuka ili vakuuma, mogu smanjiti negativne učinke zagrijavanja na polifenole. Netermičke tehnologije procesiranja, kao što su liofilizacija, obrada visokim tlakom, pulsirajuća električna polja i bioprociranje (npr. fermentacija), postaju sve popularnije zbog njihove sposobnosti očuvanja ili čak povećanja udjela i bioraspoloživosti polifenola (61). Hladna plazma, kao nova tehnologija, može povećati udio ukupnih fenolnih spojeva u soku borovnice razgradnjom kovalentnih veza i staničnih membrana, što dovodi do oslobađanja polifenolnih spojeva (59).

#### *2.2.5. Metabolizam i bioraspoloživost polifenola u organizmu sisavaca*

Polifenoli se općenito u organizmu sisavaca odlikuju slabijom apsorpcijom budući da se većina njih u biljkama nalazi u obliku glikozida, odnosno vezani su za šećere, što ih čini hidrofилnima. Prije nego što se mogu apsorbirati, moraju se hidrolizirati kako bi nastali slobodni aglikoni koji mogu proći kroz stijenku crijeva. Na apsorpciju polifenola utječe nalaze li se u kompleksu s nekim drugim spojem. Također, bitan je i zajednički unos s drugim sastojcima hrane, poput vlakana, hrane s visokim udjelom masnoća, kao i alkoholnih pića. Slobodni polifenoli, ali i oni u kompleksima, izloženi su strukturalnim promjenama u probavnom traktu i jetri, koje uključuju oslobađanje polifenola, spajanje s kompleksnim sastavnicama, dodavanje (adicija) konjugata i stvaranje metabolita. Polifenoli se mogu apsorbirati u želucu, tankom i debelom crijevu ili se eliminirati putem fecesa (38). Shematski prikaz metabolizma i apsorpcije polifenola u organizmu sisavaca prikazan je na **Slici 8**. Biodostupnost polifenola u gornjem probavnom traktu, preciznije želucu, ovisi o mehaničkoj dezintegraciji i ostatnom matriksu prisutnom u progutanom bolusu. Žvakanje, drobljenje u želucu, želučani pokreti te trenje između sastojaka hrane olakšava oslobađanje polifenola i

poboljšava njihovu apsorpciju u želucu. Općenito, u želucu se apsorbiraju jedino slobodni polifenoli (62). Apsorpcija se u tankom crijevu odvija putem pasivne difuzije ili u ko-transportu s natrijem, a stanice tankog crijeva imaju sposobnost proizvodnje fenolnih kompleksa koje onda mogu izlučivati u lumen crijeva, na taj način smanjujući ukupnu apsorpciju. (63). Na apsorpciju u tankom crijevu zasigurno, u različitoj mjeri, utječe i individualni mikrobiom crijeva (62). Polifenoli koji se ne apsorbiraju u želucu i tankom crijevu mogu se metabolizirati od strane crijevne mikrobiote i dospjeti do kolona, gdje se dalje mogu apsorbirati ili se eliminirati putem fecesa (64). U kolonu se polifenoli vrlo lako mogu dekonjugirati – primjerice kvercetin-3-glukozid i kvercetin-3-*O*-rutinozid se ne mogu hidrolizirati djelovanjem humanog endogenog enzima, ali ih lako razgradi crijeva flora, uključivši mikroorganizme poput *Bacteroides distansis* (koji posjeduju  $\alpha$ -ramnozidazu i  $\beta$ -glukozidazu), *B. uniformis* i *B. ovatus* (posjeduje  $\beta$ -glukozidazu) (65). Treba napomenuti kako je crijeva flora, za razliku od humanih endogenih enzima, sposobna razgraditi polifenole do jednostavnijih spojeva poput fenolnih kiselina (38). Zbog svih prethodno navedenih metaboličkih puteva polifenola, njihova bioraspoloživost je izrazito varijabilna. Općenito se smatra kako polifenoli imaju nisku bioraspoloživost zbog nekoliko čimbenika: interakcija s matriksom hrane, metabolički procesi posredovani jetrom (faza I i II metabolizma), crijevom i mikrobiotom. S druge strane, vrlo je izgledno da polifenoli ostvaruju biološku aktivnost putem svojih metabolita, koji nastaju *in vivo* (66). Nakon apsorpcije polifenoli mogu biti transportirani krvotokom na tri načini – u slobodnoj formi, udruženi s proteinima ili lipoproteinima/lipidima, iako su većinski udruženi s proteinima (8). Putem portalnog krvotoka polifenoli dolaze do jetre, gdje prolaze kroz drugu fazu metabolizma te se formiraju različiti konjugirani spojevi – sulfati, glukuronidi i metilirani derivati, djelovanjem enzima sulfattransferaza (SULTs), uridin-5'-difosfat glukuronosiltransferaze (UGT) i katehol-*O*-metiltransferaze (COMTs). Naposljetku, polifenoli i njihovi razgradni produkti primarno se izlučuju renalnim putem. To je omogućeno gore navedenim reakcijama faze II, čime ponovno stječu visoku hidrofilnost neophodnu za izlučivanje urinom ((9).



**Slika 8.** Shematski prikaz metabolizma i apsorpcije polifenola u organizmu sisavaca. Prilagođeno prema Gessner *i sur.* (64).

### 2.2.6. Antioksidacijsko i protuupalno djelovanje polifenola

Polifenoli imaju istaknuto antioksidacijsko svojstvo, koje podlogu ima u njihovoj kemijskoj strukturi – npr. postojanje 3-hidroksi skupine u flavonima ili manjak elektrona u antocijaninima. Prisutnost kateolskog prstena u strukturi polifenola pozitivno je povezana s njihovim antioksidacijskim djelovanjem. Antioksidacijsko djelovanje ostvaruje se putem direktne interakcije sa slobodnim radikalima, ili, što je izglednije važniji način, putem djelovanja na različite enzime uključene u održavanje redoks ravnoteže. Reaktivne kisikove

vrste poput superoksidnog aniona ( $\cdot O_2^-$ ), vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) i hipokloraste kiseline (HOCl), mogu biti izrazito toksični za proteine, lipide i DNA. Polifenoli mogu direktno učiniti reaktivne kisikove vrste manje reaktivnima doniranjem elektrona ili vodikovog atoma stabilizirajući radikalne oblike rezonancijom. Indirektni utjecaj na reaktivne kisikove vrste ostvaruje se djelovanjem na katalazu (CAT), superoksid dizmutazu (SOD) i glutation peroksidazu, ali i inhibitornim djelovanjem na enzime koji proizvode same radikale, uključivši ksantin oksidazu i NADPH oksidazu. Osim proizvodnje reaktivnih kisikovih vrsta, važno je i povećanje koncentracije slobodnih iona metala koji mogu katalizirati nastanak reaktivnih kisikovih vrsta. Flavonoidi mogu kelirati ove metale, a sam taj čin sprječava daljnju proizvodnju kisikovih radikala. Istraživanja upućuju na to kako je kvercetin flavonoid s najvećim kapacitetom keliranja metalnih iona. Sveukupno gledajući, antioksidacijski učinak polifenola je puno izraženiji *in vitro*, nego li *in vivo*, poglavito zbog metaboličkih promjena kojima su podvrgnuti; primjerice, samo inhibiranje -OH skupine dovodi do drastičnog gubitka antioksidacijskog svojstva. Upravo zato, valja uzeti s dozom opreza magnitudu antioksidacijskog djelovanja polifenola *in vivo*, a uzrok povoljnog djelovanja na kardiovaskularni sustav izgledno se ostvaruje i drugim mehanizmima, osim direktnog antioksidacijskog djelovanja (8), što je detaljnije opisano u nastavku (poglavlja 2.4.6.-8.) Ipak, za jedan od najistaknutijih polifenola, resveratrol, pokazalo se kako direktno neutralizira višak reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva, uključujući superoksidni i hidroksilni radikal, vodikov peroksid i peroksinitrite. Resveratrol također smanjuje proizvodnju slobodnih kisikovih spojeva, inhibirajući raspon NADPH oksidaza (NOX izoforme) i modulirajući aktivnost enzima mitohondrijskog dišnog lanca. Reducira aktivnost NOX izoformi putem poticanja SIRT1 (eng. *Silent Information Regulator 2 homolog 1; sirtuin*) što naposljetku dovodi do deacetilacije transkripcijskog čimbenika NF- $\kappa$ B; potiče sintezu SOD-a posredovanu transkripcijskim čimbenikom Forkhead box O1 (FOXO1), kao i ekspresiju katalaze i glutation peroksidaze 1 (GPx1) (42).

Pojedini flavonoidi mogu direktno djelovati, odnosno blokirati djelovanje enzima koji su uključeni u razvoj upale, uključivši ciklooksigenazu, lipooksigenazu, tirozin kinazu, fofolipazu A1 i protein kinazu C (8). Jedna od važnih funkcija organizma na koje flavonoidi imaju utjecaj je sinteza prostaglandina. COX-1 i COX-2 izoforme enzima ciklooksigenaze ključni su katalizatori u biosintezi prostaglandina te imaju važnu ulogu u upalnim procesima. Vaskularne endotelne i mišićne endotelne stanice veliki su izvor prostaglandina. Arahidonska kiselina oslobađa se iz fosfolipida stanične membrane endotela djelovanjem fosfolipaze A2 (PLA2), a zatim se metabolizira enzimima COX-a kako bi se generirali prostaglandini (kao

što su PGD2, PGE2, PGI2) i tromboksan (TX) A2. Proinflamatorni citokini, interleukin-1 (IL-1) i tumorski faktor nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ), igraju ključnu ulogu u aktivaciji biosinteze PG-a u stanjima kronične upale pojačavanjem signalnih puteva NF- $\kappa$ B i mitogen aktivirane proteinske kinaze (eng. *Mitogen-activated protein kinase, MAPK*). Upravo zato, sposobnost nekih polifenola da inhibiraju COX-1 i COX-2 doprinosi njihovom značajnom protuupalnom (inhibicija COX-2) i antitrombocitnom djelovanju (inhibicija COX-1) (42). Primjerice resveratrol može smanjiti ekspresiju COX-2 snižavanjem razine transkripcijskih faktora p65, c-Jun, Fos i NF- $\kappa$ B putem aktivacije SIRT1, čime se smanjuje proizvodnja eikozanoida (PGE2, TXA2) i posljedično smanjuje upala. Štoviše, SIRT1 može inhibirati (acetilirati) transkripcijske faktore AP-1 (aktivirane posredovanjem MAPK) koji su bitni za ekspresiju gena COX-2 i za oslobađanje PGE2 tijekom upale, kao i za proliferaciju endotela (67). Povoljno djelovanje na srce kroz protuupalno djelovanje reveratrola potvrđeno je i u istraživanju na ljudima. Naime, pokazalo se kako dodatak resveratrola standardnoj terapiji za srčano zatajenje rezultira poboljšanom srčanom funkcijom u pacijenata sa sistoličkim srčanim zatajenjem. U kliničkom nasumično raspoređenom istraživanju, koje je uključivalo 60 pacijenata sa sistoličkim srčanim zatajenjem (srčano zatajenje s reduciranom ejekcijskom frakcijom), klasificiranom kao NYHA (New York Heart Association) II-III, u skupine koja je, uz standardnu terapiju za srčano zatajenje, primala i 100 mg resveratrola dnevno, u odnosu na placebo skupinu, na kraju analiza utvrđena su poboljšanja u sljedećim parametrima: sistolička i dijastolička funkcija, globalno uzdužno (longitudinalno) naprezanje; kapacitet vježbanja, ventilacijski parametri; kvaliteta života; razine NT-proBNP-a (eng. *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide*) i galektina-3; razine upalnih citokina. Jedan od glavnih pronalazaka ovog istraživanja je saznanje kako je nakon suplementacije resveratrolom došlo do znatnog sniženja razine proupalnih citokina, kao posljedica smanjene ekspresije proteina mitohondrijskog transportnog lanca elektrona u leukocitima. Drugim riječima, resveratrol je utjecao na proizvodnju proteina transportnog lanca elektrona u leukocitima, smanjujući time proces oksidacijske fosforilacije u samim leukocitima, što je direktno proporcionalno s njihovom aktivnosti. Upravo je zato smanjena proizvodnja proupalnih citokina (IL-6 i IL-1) vjerojatno posljedica utjecaja na aktivnost leukocita. Ovakav protuupalni učinak resveratrola može biti važan aspekt u liječenju pacijenata sa srčanim zatajenjem (68).

## 2.3. *Kardiovaskularne bolesti*

### 2.3.1. *Definicija i epidemiologija*

Kardiovaskularne bolesti obuhvaćaju heterogenu skupinu bolesti, u čijoj je podlozi predominantno proces ateroskleroze te uključuje hipertenziju, infarkt miokarda, kardiomiopatije, aritmije i srčano zatajenje (8). Ova skupina bolesti i dalje je vodeći uzrok smrti na globalnoj razini, kontinuirano narušava zdravlje svjetske populacije i proizvodi znatne medicinske troškove povezane s liječenjem (12). 2019. godine je u svijetu zabilježeno 17.9 milijuna smrti od kardiovaskularnih bolesti, od čega je 85 % smrtnih slučajeva bilo zbog infarkta miokarda. Iako postoji široki spektar lijekova koji djeluju na kardiovaskularni sustav, poput statina, blokatora kalcijevih kanala, inhibitora angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACEI), inhibitora angiotenzinskog receptora (ARBs), fibrata i  $\beta$ - blokatora, činjenica je da značajan broj ovih lijekova ima istaknute nuspojave te se i dalje nameće jasna klinička potreba za otkrivanjem i razvijanjem inovativnih terapijskih opcija za kardiovaskularne bolesti (8). U ovom kontekstu bi polifenoli i glukozinolati, kao sekundarni biljni metaboliti koji imaju svestrane biološke učinke i široku prisutnost u svakodnevnoj prehrani, mogli imati značajnu ulogu. Epidemiološka istraživanja pokazala su kako se prehrambene navike, poput onih baziranih na visokom unosu voća i povrća, povezuju s dužim očekivanim trajanjem života, kao i značajnim smanjenjem incidencije i prevalencije nekoliko kroničnih bolesti s upalom u podlozi, kao što su npr. kardiovaskularne bolesti. Veliki dio blagotvornog učinka takve prehrane pripisuje se polifenolima, poglavito njihovom antioksidacijskom djelovanju, ali recentna istraživanja ukazala su i na antiaterosklerotski potencijal vidljiv u njihovoj sposobnosti istovremenog moduliranja signalnih i mehanicističkih puteva. (69).

### 2.3.2. *Endotelna disfunkcija, ateroskleroza i arterijska hipertenzija*

Sveukupno gledajući, endotelna disfunkcija je jedan od prvih i najvažnijih procesa koji dovode do razvoja kardiovaskularnih bolesti. Razvoj aterosklerotskih plakova najizgledniji je na mjestima bifurkacija, grananja krvnih žila ili na velikim zavojima, budući da su to mjesta koja najčešće proizvode promijenjeni ili turbulentan tok krvi. Endotelne stanice izložene su različitom stupnju i vrstama smicanja (posmika) koji utječu na njihov oblik, unutarstaničnu signalizaciju i gensku ekspresiju (69). U stanju mirovanja endotel konstitutivno proizvodi

NO, koji održava njegov protuupalni i vazoprotektivni fenotip. To postiže S-nitrozilacijom kritičnih cisteinskih ostataka u komponentama signalnog puta NF- $\kappa$ B, čime se smanjuje njegova aktivacija i transkripcijska aktivnost, te modulacijom mitohondrijske respiracije i stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (70). Endotel je također prekriven glikokaliksom, odnosno slojem koji je sastavljen od proteoglikana i komponenti izvanstaničnog matriksa, a uključen je u transport kroz endotel, primjerice transport lipoproteina, koji se može poremetiti, reducirati ili potpuno izgubiti u stanjima upale zbog povišenih razina inhibitora aktivatora plazminogena. U homeostazi, endotelne stanice sprječavaju aktivaciju trombocita, stvaranje ugrušaka i prijanjanje leukocita, proizvodeći spojeve poput NO, prostaciklina, t-PA i antitrombina III (71). U stanju upale povišene su razine adhezijskih molekula (E-selektina, ICAM i VCAM), koje sudjeluju u migraciji leukocita kroz endotel. Zajedno s leukocitima, u endotel penetrišu i lipoproteini te bivaju zarobljeni u subendotelni prostor, gdje se događa proces njihove oksidacije. Reaktivne kisikove vrste poput  $H_2O_2$  pristižu do regulatornih molekula i aktiviraju stanice. Ovome pogoduje činjenica da je endotelna membrana propusna za male spojeve poput NO i  $H_2O_2$ , koje uzrokuju aktivaciju transkripcijskih faktora i proteaza. Također, proizvodnja endotelnih reaktivnih kisikovih vrsta dodatno je potaknuta procesom upale, odnosno leukocitima i faktorima raste. Drugi mehanizmi koji uzrokuju endotelnu disfunkciju jesu formiranje peroksinitrita, oslobađanje NO sintaze, inhibicija proizvodnje prostaciklina, stimulacija ekspresije endotelina i reducirana NO signalizacija zbog inhibicije aktivnosti topljive gvanilat ciklaze (71). Svi ovi mehanizmi doprinose vazokonstriktivnom i prokoagulantnom stanju. Isto tako, endotelne stanice mogu se transformirati u mezenhimalne stanice koje pojačano proizvode izvanstanični matriks što uzrokuje disregulaciju junkcijskih proteina (npr. okcludin i kladin-5) i dovodi do gubitka međustaničnog kontakta. Posljedično, endotel gubi integritet s medijom što uzrokuje povišenu aktivnost u tom polju. Naposljetku makrofagi, kolesterol i upalne stanice ulaze u mediju i otpočinje proces ateroskleroze (69).

Arterijska hipertenzija je jedna od najčešćih kardiovaskularnih bolesti, koja uzrokuje malobrojne ili gotovo nikakve simptome, ali predstavlja izraziti rizik za razvoj infarkta miokarda, inzulta, bubrežnog zatajenja i periferne vaskularne bolesti. Najčešće se definira kao vrijednost krvnog tlaka od 140/90 mmHg ili više, mjereno u liječničkoj ordinaciji i potvrđeno 24-satnim ambulantnim praćenjem krvnog tlaka (holter tlaka) ili ponavljanim kućnim mjerenjima. Istaknuti čimbenici rizika jesu dob, spol, pušenje, dislipidemija, šećerna bolest, pretilost, sedentarni način života, obiteljska sklonost i drugi (72).

### 2.3.3. Uloga upale i oksidacijskog stresa u aterosklerozi

Oksidacijski stres i upala međusobno su isprepleteni i zajednički ostvaruju štetno djelovanje na kardiovaskularni sustav, međusobno se potičući. Poznato je kako upalne stanice proizvode oksidacijski stres, što i nije iznenađujuće, uzevši u obzir da su neke linije imunoloških stanica precizno evoluirale na način da mogu kontrolirati infekciju koristeći lokalni oksidacijski stres, odnosno 'prask' kisikovih radikala. Primjer za to su neutrofil i makrofagi, koji svoje protektivno imunološko djelovanje ostvaruju putem NADPH oksidaze. Jednom kad se nađu u zidovima krvnih žila, upalne stanice, uključivši T-limfocite i stanice mijeloidne loze, mogu sudjelovati u oštećenju vaskulature direktno, putem aktivirane NADPH oksidaze, ili mijenjajući lokalni citokinski milje, proizvodnjom TNF- $\alpha$ , IL-1 i TGF- $\beta$  (eng. *Transforming Growth Factor Beta*) (73). S druge strane, oksidacijski stres može efektivno potaknuti upalni proces, i to na razini genske transkripcije, putem regulacije nekolicine unutarstaničnih signalnih puteva, uključujući Nrf2, NF- $\kappa$ B, Ets-1 i put MAP kinaze p38.

Aterosklerozu odlikuje nakupljanje lipida i upalnih stanica poput makrofaga, T-limfocita i mastocita u oštećenim stjenkama arterija i intimi. Modificirani lipidi aktiviraju upalne stanice u intimi, producirajući kemokine i citokine poput TNF- $\alpha$ , interferona gama (IFN- $\gamma$ ), IL-1, IL-4 i IL-6, koji aktiviraju druge leukocite, endotelne stanice i gore spomenute adhezijske molekule. Potonje dovode do regrutiranja drugih upalnih stanica te posljedično makrofagi, nastali od monocita, oslobađaju enzime te modificiraju lipoproteine koji naposljetku postaju aterosklerotski plak. Potom makrofagi apsorbiraju i u sebe ugrađuju kolesterol bogate lipoproteine iz LDL-a, ali i proizvode prooksidacijske spojeve koji doprinose procesu ateroskleroze – reaktivne kisikove i dušikove radikale. Ovo su isti spojevi koji sudjeluju u razvoju endotelne disfunkcije koja narušava stanje endotela, što govori u prilog činjenici da se proces samostalno obnavlja i potiče. Daljnje oštećenje stanične funkcije biomolekula (proteini, ugljikohidrati i lipidi) može rezultirati lipidnom peroksidacijom i oksidacijom LDL-a. Oksidirani LDL (oxLDL) naziva se kliničkim biljekom upale plaka, budući da oksidirani fosfolipidi otpočinju upalu svojim ekstenzivnim vezanjem za TLR (toll-like receptore), koji pak mogu aktivirati put transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B i time proizvodnju proupalnih citokina. Sumarno se oxLDL povezuje sa sljedećim učincima: 1) pro-aterosklerotska aktivacija endotelnih stanica putem inicijacije endotelina, adhezijskih molekula i pro-inflamatornih kemo-atraktanata; (2) poticanje stvaranja 'pjenastih stanica'; (3) stimuliranje endotelne disfunkcije putem proizvodnje ADMA (asimetrični dimetilarginin) (9). Smatra se kako je upravo oksidacija LDL jedan od ključnih elemenata u progresiji

ateroskleroze (74). Endotelna disfunkcija, kao i visoka koncentracija monocita/makrofaga unutar vaskularne intime, i to pod utjecajem kemokina i adhezijskih molekula, stvaranje 'pjenastih stanica' i proliferacija mišićnih stanica krvnih žila, redom su povezani s upalnom osnovom aterosklerotske lezije. Također, postoji stanoviti odgovor izvanstaničnog matriksa koji se zadebljava oko mjesta upale, što doprinosi razvoju plaka koji blokira protok kroz arteriju, doprinoseći gubitku prirodnog kapaciteta relaksacije arterije (8). Naposljetku, aterosklerski plak sastoji se vezivnog tkiva, mišićnih stanica i mnoštva upalnih stanica. Povećani obrtaj stanica izgledno dovodi do povećane propusnosti za makromolekule, što povećava ugradnju lipida u regijama s poremećenim protokom. Spomenuto dovodi do ekspresije aterosklerotskog fenotipa vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (VEGF). Kao odgovor na smicanje niskog stupnja, dovodeći do još veće endotelne propusnosti. Dodatno, u žilama stanje hiperglikemije doprinosi prekomjernoj proizvodnji reaktivnih kisikovih vrsta putem mitohondrijskog lanca transporta elektrona. Suvišni superoksidi dovode do pucanja DNA uzvojnice i aktivacije jezgrine poli ADP riboza polimeraze (PARP). Ovi procesi inhibiraju gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GADPH), preusmjeravajući rane intermedijarne produkte glikolize u patogene signalne puteve tijekom upalnog procesa (69).

#### 2.3.4. *Koronarna srčana bolest i srčana hipertrofija*

Koronarna arterijska bolest je učestala srčana bolest uzrokovana suženjem i/ili blokadom velikih ili magistralnih krvnih žila srca – koronarnih arterija. Uzrokovana je primarno formiranjem aterosklerotskog plaka unutar intime stijenke arterija, što naposljetku dovodi do poteškoća u snabdijevanju kardiomiocita s dovoljnom količinom krvi, kisika i nutrijenata (69). Plak je sastavljen od upalnih stanica, staničnog debrisa, stanica glatkih mišića i različitih količina kolesterola i kolesterolskih estera, od čega se neki nalaze u obliku kolesterolskih kristala. S vremenom može doći do erodiranja ili rupture plaka, što inicijalno može dovesti do tromboze, a onda i zatvaranja krvne žile, odnosno razvoja infarkta miokarda, inzulta, ishemijske kome ili smrti, ovisno o magistralnoj žili, odnosno organu koji ona snabdijeva (75). Drugi čimbenici važni za ovo stanje jesu bolest endotela, upala niskog stupnja i akumulacija lipida (76).

Srčana hipertrofija je morfološki adaptivni odgovor srca na kronični prekomjerni rad, a karakterizirana je povećanjem veličine kardiomiocita, povećanom sintezom proteina i re-ekspresijom fetalnog genskog programa srca. Iako inicijalno predstavlja kompenzatorni

mehanizam, kronična i patološka hipertrofija je pogubna, budući da nosi izrazito povišeni rizik za srčano zatajenje i preranu smrt (11). Patološka srčana hipertrofija posljedica je promjena u metabolizmu kardiomiocita i prometa kalcija, upalnim procesima u srcu, stanične smrti (apoptoza i autofagija), odlaganja izvanstaničnog matriksa, fibroze i angiogeneze. Substancične promjene u srcu, uključujući oksidacijski stres, pojačani ulazak kalcijevih iona u stanicu te stimulaciju proteaza, u kombinaciji s upalom, dovodi do srčanog remodeliranja, patološke hipertrofije i naposljetku do srčanog zatajenja. Za održavanje zdrave kontraktilnosti srčanog mišića od izrazite je važnosti zadržavanje balansiranih razina adenozin-trifosfata (ATP-a) i kalcijevih iona. Metaboličke promjene u patološkoj hipertrofiji srca dovode do pojačanog iskorištavanja glukoze kao izvora energije, umjesto oksidacije masnih kiselina. U uvjetima hipertrofije poželjno je koristiti manje kisika za proizvodnju ATP-a. Kako potreba za energijom nadmašuje opskrbu istom, snižuju se razine ATP-a u miokardu, a kontraktilnost biva sve više kompromitirana. Također, tijekom hipertrofije, u svrhu poboljšanja kontraktilnosti miokarda, dolazi do povišenja unutarstanične koncentracije kalcijevih iona (77). S druge strane, uslijed metaboličkih promjena, smanjuje se aktivnost  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-aze sarkoplazmatskog/endoplazmatskog retikuluma (SERCA2a) – ionske crpke zadužene za povrat kalcijevih iona natrag u sarkoplazmatski retikulum. Disfunkcija ovog enzima onemogućuje adekvatno uklanjanje kalcija, što posljedično dovodi do njegovog patološkog nakupljanja u citosolu. Višak iona kalcija u stanici potiče signalne puteve proteolitičkih enzima, koji doprinose srčanom zatajenju. Postojano visoka razina vazoaktivnih hormona dovodi do dominacije oksiradikala u odnosu na antioksidanse, potiče redoks-osjetljive signale i rezultira oksidacijskim stresom i proizvodnjom proupalnih citokina, poput TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-1. Osim toga, upalni odgovor aktivira makrofage i T limfocite (CD3+, CD8+, CD4+), koji doprinose abnormalnom remodeliranju srca i disfunkciji lijeve klijetke (77). Fibroblasti imaju ulogu u održavanju srčane kontrakcije i signalnih puteva putem proizvodnje izvanstaničnog matriksa. Oni proizvode izvanstanični matriks sekrecijom humoralnih medijatora, proizvodnjom kolagena tipa I i III, fibronektina, matriks metaloproteinaza (MMP) i inhibitora tkivnih matriks metaloproteinaza (eng. *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*, TIMP) (78). Tijekom upalom posredovanog srčanog remodeliranja, fibroblasti se pretvaraju u miofibroblaste, čija konstantna aktivacija i proliferacija dovodi do abnormalnog odlaganja izvanstaničnog matriksa, a posljedična akumulacija kolagena u srcu dovodi do defektne električne provodljivosti srca i manjkave kontraktilnosti srca, što naposljetku dovodi do disfunkcije srca i njegovog zatajenja. Istovremeno, gubitak kardiomiocita posljedica je apoptoze, fibroze i nekroze u miokardu (77).

## 2.4. Učinak glukozinolata i polifenola na kardiovaskularni sustav sisavaca

### 2.4.1. Mehanizmi djelovanja glukozinolata na kardiovaskularni sustav

Postoji nekoliko pretpostavljenih načina na koji glukozinolati ostvaruju svoj kardioprotektivni učinak. Ipak, ne treba zaboraviti da glukozinolati biološki učinak ostvaruju putem svojih razgradnih produkata, nakon enzimatske razgradnje posredovane enzimom mirozinazom. Prvenstveno, izotiocijanati su poznati kako jaki aktivatori Nrf2 putem aktivacije ARE-potaknutih gena, kao i jaki supresori upalnog odgovora putem NF- $\kappa$ B puta (79). Dva prethodno spomenuta mehanizma predstavljani su u ranijem odjeljku o glukozinolatima. Isto tako, supresija apoptoze zaustavljanjem mitohondrijskog apoptotskog puta važan je segment u kardioprotektivnom svojstvu ovih spojeva (79).

Oslobađanje plinovitog prijenosnika vodikovog sulfida ( $H_2S$ ) iz glukozinolata smatra se novom mehanističkom značajkom kardioprotektivnog učinka izotiocijanata. Naime, vodikov sulfid je endogena ubikvitarna singalna molekula, poznata po svom povoljnom djelovanju na različite organske sustave sisavaca. Uglavnom se proizvodi od L-licteina putem katalitičke aktivnosti dvaju enzima cistationin- $\beta$ -sintaze (CBS) i cistationin- $\gamma$ -liaze (CSE). Treći put biosinteze  $H_2S$  je združenim djelovanjem 3-merkaptopiruvat sumporne transferaze (3-MST) i cistein aminotransferaze (CAT).  $H_2S$  pokazuje kardioprotektivnu aktivnost koja se ogleda u njegovoj aktivnosti protiv ishemijske/reperfuzijske ili hipoksijske ozljede. Mehanizam ovog kardioprotektivnog djelovanja vjerojatno uključuje mitohondrijske, na ATP osjetljive, kalijeve kanale (mitoKATP), anti-apoptotski odgovor te inhibiciju fosfodiesteraze tipa 5.  $H_2S$  se također ponaša kao antioksidacijska molekula, budući da može aktivirati Nrf-2 posredovan sustav i reducirati reaktivne kisikove vrste. Zbog navedenih bioloških učinaka na kardiovaskularni sustav, spojevi koji mogu proizvesti egzogeni  $H_2S$  smatraju se obećavajućim kardioprotektivnim agensima. Za prirodne i sintetske izotiocijanate poznato je kako mogu proizvesti  $H_2S$ , no sa sporom kinetikom i na način ovisan o L-cisteinu. U istraživanju talijanskih autora koje je ispitalo svojstvo otpuštanja  $H_2S$  *in silico* pristupom kod 45 izotiocijanata iz biblioteke, 3-piridil-izotiocijanat (spoj 25) identificiran je kao onaj koji najviše obećava. Štoviše, kardioprotektivna svojstva ovog spoja dodatno su definirana *ex vivo* i *in vivo* esejima, potvrđujući snažnu pretpostavku kako bi na izotiocijanatima bazirani spojevi koji oslobađaju  $H_2S$ , poput spoja 25, mogli biti okidač 'farmakološkog pre-kondicioniranja' i potencijalno predstavljaju odgovarajuću farmakološku opciju u anti-ishemijskoj terapiji za miokard (80).

#### 2.4.2. *Antioksidacijsko i protuupalno djelovanje glukozinolata u kardiovaskularnim bolestima*

Sulforafan je primjer izotiocijanata s temeljito istraženim učinkom na kardiovaskularno zdravlje te je dokazano da ublažava oksidacijski stres, upalu i apoptozu, što znači da djeluje putem svih gore navedenih mehanizama kojim glukozinolati mogu djelovati na kardiovaskularni sustav. Ovaj je spoj tipični aktivator Nrf2/Keap signalnog puta i kao takav modificira Keap1, reagirajući s tiolnim skupinama određenih cistenskih nastavaka Keap1, što naposljetku rezultira oslobađanjem Nrf2 i otpočinjanjem signalnog puta, koji je u fiziološkim uvjetima dormantan zbog djelovanja Keap1 (25). Smatra se da je upravo poticanje Nrf2 najodgovornije za dugoročni i značajan protektivni učinak sulforafana za kardiovaskularno zdravlje. Sulforafan može suprimirati lipidnu peroksidaciju i smanjiti ukupne slobodne kisikove radikale za 40% u zrelih kardiomiocitima putem djelovanja na Nrf2 i PGC-1 $\alpha$  (eng. *Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1- $\alpha$* ) i posljedično povećanu ekspresiju i aktivnost SOD-a, jednako citosolne (SOD1) i mitohondrijske izoforme (SOD2). Glutation je najistaknutiji endogeni antioksidans koji se koristi za sprječavanje oksidacijskog stresa na dnevnoj bazi, a uputem aktivacije Nrf2/ARE puta, sulforafan značajno povišuje koncentraciju aktivnog glutaciona (81). Osim na SOD, djelujući putem Nrf2/ARE signalnog puta, sulforafan potiče pojačanu ekspresiju i aktivnost brojnih drugih ciljnih gena reguliranih faktorom Nrf2, uključujući gene koji kodiraju enzime NADPH:kinon oksidoreduktazu 1 (NQO1), hem-oksigenazu 1 (HO-1) te glutamat-cistein ligazu (GCL) (25). Ublažavanje upale u kardiovaskularnim bolestima ostvaruje putem moduliranja MAPK/AP-1/NF- $\kappa$ B puta, odnosno putem suprimiranja aktivacije p38, ERK-a (eng. *Extracellular Signal-Regulated Kinase*) i JNK (c-jun N-terminalna kinaza); smanjenja ekspresije c-Jun i c-Fos; inhibicijom aktivacije I $\kappa$ B $\beta$  (I $\kappa$ B kinaza); degradacijom I $\kappa$ B (inhibitor NF- $\kappa$ B) i NF- $\kappa$ B /p65) (82). Fenetil izotiocijanat (PEITC), razgradni produkt glukonastrutina, iako nešto slabije istražen u aspektu kardiovaskularnih bolesti u odnosu na sulforafan, također ima antioksidacijsko djelovanje, vidljivo kroz inhibiciju degradacije I $\kappa$ B- $\alpha$ , translokacije NF- $\kappa$ Bp65 u jezgru i vezanje na DNA te posljedično inhibitorno djelovanje na aktivnost luciferaze - NF- $\kappa$ B (83). Za moringin se smatra kako je u aktivaciji Nrf2/ARE transkripcije čak potentniji od samog sulforafana. Moringin smanjuje ekspresiju niza gena uključenih u upalu i oksidacijski stres, uključujući gene koji kodiraju TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6; povećava ekspresiju Nrf2 i njegovu nuklearnu akumulaciju; smanjuje nuklearnu translokaciju NF- $\kappa$ B i njegovo vezanje za promotorska mjesta ciljnih gena; smanjuje stvaranje

reaktivnih kisikovih vrsta, osobito vodikova peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) te normalizira mitohondrijski membranski potencijal i mitohondrijsku funkciju, čime značajno ublažava sistemsku upalu (84). Erucin, razgradni produkt glukozinolata glukoerucina, strukturno je sličan sulforafanu, a u odnosu na njega posjeduje bolji učinak na indukciju enzima metabolizma faze II. Štoviše, u komparativnim istraživanjima, erucin je inducirao transdukcijske puteve ovisne o ERK1/2, JNK i p38, u većoj magnitudi, odnosno s većim mRNA i većim razinama odgovarajućih efektorskih proteina nuklearnog Nrf2 i HO-1, u usporedbi s alil iziotiocijanatom (AITC), PEITC i sulforafanom (85). AITC, razgradni produkt glukozinolata sinigrina, iako istaknutog djelovanja na pretilost i smanjenje opsega metaboličkog sindroma, ima dodatno antioksidacijsko i protuupalno djelovanje. Naime, AITC ima sposobnost supresije proizvodnje proupalnih citokina poput IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  u kulturi humanih endotelnih vaskularnih stanica (HUVEC), a nanočestice ovog spoja još su više suprimirale proizvodnju TNF- $\alpha$ , IL-6, NO i iNOS. AITC se može direktno vezati za lizin i arginin na genu *NF- $\kappa$ B*, fomirajući vodikovu i hidrofobnu vezu, što djelomično može objasniti supresiju transkripcijske aktivnosti NF- $\kappa$ B, skupa s inhibicijom JNK; ERK i p38 (86). Slično spomenutom učinku, AITC stimulira AhR i Nrf2 putem interakcije hidrofobne i vodikove veze te povisuje sintezu enzima metabolizma faze II, kao i antioksidacijsku aktivnost te reducira lipidnu peroksidaciju (87). Indol-3-karbinol (I3C), razgradni produkt glukobrasacina, ima kardioprotektivno djelovanje koje se ogleda kroz povišenje GSH i enzima metabolizma faze II, suprimiranje oksidacijskog i dušičnog stresa te lipidne peroksidacije, poticanje signalnog puta Nrf2/ARE, inhibiciju puta NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ Bp50, iNOS, COX-2, IL-6), kao i uravnoteživanje ekspresije markera apoptoze (Bcl2, casp3, Bax) (88).

#### 2.4.3. *Istaknuti predstavnici glukozinolata i njihovi učinci na kardiovaskularno zdravlje*

Iako je prethodno spomenuta Blaževićeva klasifikacija glukozinolata smisljena i pozitivno validirana, i dalje su ustaljena trivijalna imena za pojedine istaknute predstavnike ovih spojeva. Također, unatoč tome što je potvrđeno i definirano ukupno 130 glukozinolata, prema istraživanju EPIC (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*), ustanovljeno je da je svega pet glukozinolata uobičajeno prisutno u ljudskoj prehrani, a to su glukobrasacin, sinigrin, glukorafasatin (dehidroerucin), glukorafanin i glukoi berin (89, 90). Kao što je već istaknuto, glukozinolati su biološki inaktivni te se tek razgradnjom, posredovanom mirozinazom, prevode u biološki aktivne razgradne produkte, poglavito

izotiocijanate. Razlike u bočnom lancu glukozinolata rezultira širokim spektrom različitih izotiocijanata; primjerice od glukorafanina (GRA) nastaje sulforafanin; od sinigrina nastaje AITC; od glukonastrutiina nastaje PEITC; od glukoerucina nastaje erucin; od glukotropaeolina nastaje benzil izotiocijanat (BITC); od glukomoringina nastaje moringin (25).

Izvori sulforafana su brokula, cvjetača, kelj, kelj pupčar (prokulice) i kupus (25). Ovaj izotiocijanat inicijalno je otkriven sredinom 20. stoljeća kao antibiotik izoliran iz crvenog kupusa i sivkaste grbice (*Lepidium draba*). Njegov je biološki prekursor glukorafanin, poslije u znatnoj količini pronađen u kljancima brokule. U netaknutoj (neoštećenoj) biljci minimalne su količine sulforafana, budući da je gotovo u potpunosti prisutan kao biološki inaktivan glukorafanin. Glukorafanin je prisutan u svim tkivima brokule, iako je najprisutniji u zračnim dijelovima biljke, zatim u cvjetnim pupovima i naposljetku u sjemenkama, koje su najbogatije ovim spojem. Iako vlada mišljenje kako je glukorafanin široko raširen, u jednom je istraživanju utvrđeno kako je prosječni sadržaj ovog spoja u glavama brokule oko 0.36  $\mu\text{mol}$  po gramu mase svježeg povrća (91). Dosadašnja istraživanja povezuju ga sa sljedećim pozitivnim učincima na zdravlje: smanjenje pretilosti; normalizacija serumskih lipida; povišenje plazmatskog inzulina; smanjenje krvnog tlaka; usporavanje progresije ateroskleroze; prevencija vaskularnih komplikacija diabetes mellitusa; smanjenje ozljede srčanog mišića i smanjeno područje infarkta tijekom infarkta miokarda; poboljšanje srčane funkcije kod aritmija, infarkta miokarda i srčanog zatajenja; regulacija srčanog ritma u aritmijama; redukcija desnostranog srčanog zatajenja i plućne hipertenzije; smanjenje disfunkcije srčanog mišića u starijih pojedinaca (25).

Izvori PEITC su repa (*Brassica rapa* L.), rotkvica (*Raphanus sativus* L.), ljekovita potočarka (*Nasturtium officinale* L.) i brokula. Biološki prekursor PEITC-a je glukozinolat glukonasturtin, od kojeg može nastati djelovanjem mirozinaze. Ingestijom oko 100 grama brokule i ljekovite potočarke može se osloboditi i do 200  $\mu\text{mol}$  PEITC-a u ljudi. (92). Isto tako, za razliku od većine ostalih fitokemijskih spojeva, PEITC ima povoljnu farmokokinetiku prilikom oralnog unosa, s visokom bioraspoloživosti, jakim vezanjem za proteine plazme i slabim isplavlivanjem iz organizma. Oralna primjena PEITC-a u štakora rezultirala je visokom sistemskom biodostupnošću, koja je u pojedinim eksperimentalnim uvjetima iznosila približno 90–114% (92). U istraživanjima se, osim toga, ovaj spoj povezuje sa sljedećim učincima: smanjenim unosom hrane, smanjenjem tjelesne mase, odlaganjem masti i ateroskleroze; normalizacijom plazmatskog inzulina i glukoze u krvi; suprimiranjem disfunkcije lijeve klijetke u pacijenata oboljelih od HIV/AIDS (25).

Glavni izvori moringina jesu sjemenke i listovi konjske rotkvice (*Moringa oleifera*

L.), tropske i suptropske biljke koja je raširena po cijelom svijetu, a od davnina se koristi u tradicionalnoj medicini (93). Odgovarajući prekursor ovog izotiocijanata jest glukozinolat glukomoringin. Ekstrakti konjske rotkvice privukli su pažnju brojnih istraživača zbog izglednog antioksidacijskog, antimikrobnog, antifungalnog, protuupalnog i hipoglikemijskog djelovanja (93). U istraživanjima se moringin povezuje sa smanjenim područjem infarkta miokarda; smanjenom vrijednosti kreatin kinaze MB (CK-MB); poboljšanom srčanom funkcijom i reduciranim mortalitetom nakon infarkta miokarda; smanjenom težinom bolesti u srčanom zatajenju; smanjenom akumulacijom masti, povećanjem mišićne mase i s poboljšanom kontrolom glukoze u krv (25).

Izvori erucina su povrtna riga (*Eruca sativa* Mill.), brokula, kupus, cvjetača, kelj pupčar i rotkvice. Prekursor erucina jest glukozinolat glukoeucin (34). Dosad je pokazao značajno antioksidativno, protuupalno, antimikrobno i djelovanje protiv raka, ali i uočljivo povoljno djelovanje na kardiovaskularne, neurološke i metaboličke bolesti (34). Erucin se u istraživanjima povezuje sa sljedećim učincima: reduciranje indeksa tjelesne mase, akumulacije lipida, serumskih triglicerida, glukoze natašte, hemoglobina A1C; snižavanje krvnog tlaka; suprimiranje agregacije trombocita i tromboze; poboljšanje protoka kroz koronarnu cirkulaciju; smanjenje CK-MB i laktat dehidrogenaze (LDH) (25).

AITC je izotiocijanat koji nastaje hidrolizom sinigrina, glukozinolata koji se u visokoj koncentraciji može pronaći u sjemenkama senfa (jednako smeđeg i žutog), rotkvici i wasabiju (japanskom hrenu). AITC je prepoznatljiv po tome što daje opor okus i snažnu aromu povrću u kojem se nalazi. Tijekom sjeckanja, žvakanja ili drugog načina komadanja dijelova biljke, enzim mirozinaza katalizira konverziju sinigrina u AITC, što oslobađa njegov karakteristično snažan okus. AITC se zbog svoje istaknute antifungalne i antibakterijske aktivnosti može smatrati prirodnim aditivom u hrani i kao takav je poznat pod imenom 'senfovo ulje' (94). U pogledu kardiovaskularnog zdravlja, AITC se povezuje sa suprimiranom inzulinskom rezistencijom, smanjenjem razine glukoze u krvi, reduciranom pretilosti, smanjenjem sinteze kolesterola i smanjenim inicijalnim srednjim arterijskim krvnim tlakom (MABP – inital mean arterial blood pressure) (25).

I3C jedan je od razgradnih produkata široko rasprostranjenog glukozinolata indol-3-ilmetilglukozinolata (I3M-GS), kojeg se u većim koncentracijama može pronaći u brokuli, kelju pupčaru i kupusu (95). U pogledu kardiovaskularnog zdravlja, istraživanja ga povezuju sa sljedećim povoljnim učincima: antitrombocitna i antitrombotska aktivnost; sprječavanje hipertrofije miokarda; stimuliranje parasimpatičkog učinka na srce; normalizacija srčanog NO; smanjenje razine enzima CK-MB; povišenje razine inzulina, smanjenje razine glukoze u

krvi, HbA1c (glikirani hemoglobin) i kolesterola te suprimiranje odlaganja lipida u stjenkama krvnih žila (25).

Zaključno se može reći kako svi istaknuti predstavnici glukozinolata/izotiocijanata, uključujući sulforafan, PEITC, morginin, erucin, AITC i I3C, posjeduju antioksidacijsko i protuupalno svojstvo, koja se djelomično razlikuju u opsegu i krajnjem učinku. Antioksidacijsko svojstvo uglavnom ostvaruju poticanjem signalnog puta Nrf2/ARE, a protuupalno inhibitornim djelovanjem na signalni put NF- $\kappa$ B. U nastavku će se istaknuti djelovanje na pojedinačne segmente kardiovaskularnih bolesti, koje između ostalih, ostvaruju ovdje spomenutim antioksidacijskim i protuupalnim mehanizmima.

#### 2.4.4. Djelovanje glukozinolata na aterosklerozu, endotelnu funkciju i trombocite

U različitim modelima ateroskleroze, uključujući lipopolisaharidom stimulirane endotelne stanice goveđe aorte (eng. *bovine aortic endothelial cells*), endotelne stanice transfecirane plazmidom (eng. *plasmid-transfected endothelial cells*), endotelne stanice pupčane vena čovjeka (eng. *human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) i glatke mišićne stanice aorte (eng. *vascular smooth muscle cells*, VSMC), sulforafan je smanjio ekspresiju adhezijskih molekula ICAM-1, VCAM-1, E-selektina i monocit kemotaktičkog proteina-1(MCP-1), čime je značajno inhibirano vezanje monocita za endotelne stanice. Također je smanjio proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta i oštećenja endotela prouzrokovana djelovanjem oksidiranog LDL-a (ox-LDL) (25). Inhibicija ekspresije ICAM-1 ostvarena je putem suprimiranja signalnog puta Rho A/ROCK/ NF- $\kappa$ B, što je također doprinijelo supresiji upale unutar aterosklerotskih plakova (96). Sulforafan je također smanjio ekspresiju 8- hidroksi-2'-deoksigvanozina (8-OHdG), markera oksidacijskog stresa, kao i aktivnost NADPH oksidaze. Smatra se kako je glutation u središtu mehanizma kojim sulforafan sprječava adheziju monocita za endotel, budući da niže koncentracije unutarstaničnog GSH koleriraju s jačim inhibitornim djelovanjem sulforafana (97). U istraživanju na zečevima s hiperkolesteremijom sulforafan je pokazao sposobnost ublažavanja progresije aterosklerotskih lezija uzrokovanih dijetom s visokim udjelom kolesterola, i to vjerojatno kroz snižavanje razine kolesterola, antioksidacijski učinak, ali i suprimiranje upale posredovane sa signalnim putem NF- $\kappa$ B. U istraživanju su zečevi bili podijeljeni u tri skupine – skupina I, hranjena 'regularnom' hranom (eng. chow meal - mješavina žitarica, soje i riblje hrane); skupina II, hranjena 1%-tnom visokokolesterolskom hranom (HCD); skupina III,

hranjena kombiniranom hranom (HCD + sulforafan u dozi 0.25 mg/kg/dan). Ispitivani parametri mjerili su se nakon dva, odnosno četiri tjedna. Rezultati su pokazali kako je prehrana s visokim udjelom kolesterola rezultirala značajnim povećanjem serumskih razina triglicerida, ukupnog kolesterola, LDL (eng. *low-density lipoproteins*) kolesterola, LDH, C-reaktivnog proteina (CRP), kao i aortalnog MDA i SOD-a, kao i značajnom redukcijom serumskih razina lipoproteina visoke gustoće HDL (eng. *high-density lipoproteins*) kolesterola te aortalnog GSH i NOx. Suprotno tome, dodatak sulforafana prehrani s visokim udjelom kolesterola značajno je smanjio visokokolesterolskom prehranom inducirano povišenje serumskih razina ukupnog kolesterola, LDL-a, CRP-a i LDH, uz istovremeno značajno povišenje razina HDL-a i GSH-a te normalizaciju aortalne SOD i NOx. Dodatno, sulforafan je u aorti zeca značajno poboljšao endotel-ovisnu relaksaciju izazvanu acetilkolinom te značajno smanjio I/M omjer (omjer debljine intime i medije krvne žile), što je potvrđeno patohistološkom analizom. Unatoč impresivnim rezultatima, ograničenje ovog istraživanja je činjenica da se nije proučavao direktan učinak sulforafana, već njegov dodatak visokokolesterolskoj prehrani (98). Generalno, sulforafan se povezuje sa značajnom redukcijom razvoja neointime – pogoduje proširenju arterijskog lumena i suprimira ekspresiju jezgrinog antigena proliferirajućih stanica (PCNA, eng. *proliferating cell nuclear antigen*), koji je inače marker zaustavljanja staničnog ciklusa. U istraživanju na štakorskim aortalnim vaskularnim stanicama glatkih mišića, sulforafan u koncentraciji od 0.5, 1 i 2.9  $\mu\text{M}$  značajno je inhibirao proliferaciju stanica glatkih mišića, induciranu trombocitnim čimbenikom rasta (PDGF, eng. *platelet-derived growth factor*), i to na o koncentraciji ovisan način, određen brojanjem stanica. IC50 (polovica maksimalne inhibitorne koncentracije) vrijednost sulforafanom inhibirane proliferacije stanica glatkih mišića bila je 0.8  $\mu\text{M}$ . Pretpostavka je kako se ova inhibicija proliferacije ostvaruje kroz zaustavljanje staničnog ciklusa u fazi G1/S, i to putem poticanja p53 signalnog puta, što kolerira s pronađenim povišenim vrijednostima p21 i p53, a smanjenim vrijednostima CDK2 i ciklina E u prethodno spomenutom istraživanju (99).

Od svih proučavanih učinaka na kardiovaskularno zdravlje, PEITC ima istaknuto snažno svojstvo sprječavanja nastanka i zaustavljanja progresije ateroskleroze, i to dominantno putem epigenetskih mehanizama. U istraživanju na miševima C57BL/6, koji su najosjetljiviji na aterosklerozu od svih sojeva miševa, pronađeno je kako PEITC reducira formiranje aterosklerotskog plaka prevenirajući sužavanje lumena arterija, specifično putem suprimiranja odlaganja LDL-a u arterijama. Nadalje, PEITC se povezuje sa snažnom inhibicijom progresije aterosklerotskog plaka, što ostvaruje poticanjem reverznog

transportnog puta kolesterola, koji je ključan u reduciranju razina kolesterola u perifernim tkivima i krvi, kao i u inhibiranju formiranja plaka u aorti. Ključni protein ovog puta je ABCA1 (eng. *ATP binding cassette subfamily A member 1*), koji modulira lipidni metabolizam, posredujući reverzni transport kolesterola prema apoA1 i potičući formiranje HDL-a. Put PPAR $\gamma$  (eng. *peroxisome proliferator activated receptor gamma*)–LXR $\alpha$  (eng. *liver-X-receptor  $\alpha$* ) - ABCA1 važan je u homeostazi kolesterola, lipidnom metabolizmu i upali. LXR $\alpha$  inducira ekspresiju gena *ABCA1* i PPAR inducira transkripciju *LXR $\alpha$*  i *ABCA1* da bi se pojačao efluks kolesterola. U spomenutom istraživanju, u skupine miševa koji su se hranili hranom s visokim udjelom kolesterola, uz dodatak PEITC-a u količini 75 mg/kg/dan (skupina HFCD + P75), zabilježene su povišene razine ekspresije PPAR $\gamma$ , LXR- $\alpha$  i ABCA1 u mišjim jetrama, mjereno imunoblotom i metodom qPCR, u odnosu na kontrolnu skupinu (regularna hrana) i skupinu koja je hranjena hranom s visokim udjelom kolesterola, ali bez dodatka PEITC-a. Sagledavši ove rezultate, moguće je utvrditi kako PEITC značajno potiče reverzni transport kolesterola (100). Također, PEITC može ograničiti progresiju aterosklerotskog plaka inhibirajući formiranje pjenastih stanica, suprimirajući internalizaciju lipida i potičući efluks (izbacivanje) kolesterola iz pjenastih stanica. Spomenuti učinci uglavnom se ostvaruju suprimirajućim djelovanjem na lipidne receptore na pjenastim stanicama, uključivši LOX-1 (eng. *lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1*), SR-A1 (eng. *scavenger receptor A1*) i CD36 (eng. *cluster of differentiation 36*), kao i poticanjem ekspresije proteina gore spomenutog puta PPAR $\gamma$ –LXR $\alpha$ - ABCA1 (101). PEITC pokazuje zaštitno djelovanje na endotelne stanice i sprječava negativne učinke oksidiranog oxLDL na njih. Taj se zaštitni mehanizam ostvaruje dvostruko: blokiranjem proizvodnje adhezijskih molekula koje su inducirane aktivacijom NF- $\kappa$ B te poticanjem antioksidacijskog odgovora ovisnog o Nrf2. Preciznije rečeno, PEITC smanjuje reaktivnih kisikovih vrsta te pojačava transkripciju gena reguliranih putem osi Nrf2/ARE (*HO-1*, *GCLC*, *GCLM*), što dovodi do povećane sinteze odgovarajućih proteina. Istovremeno, PEITC smanjuje razinu proteina ICAM-1, VCAM-1, E-selektina, NF- $\kappa$ B-p65 i fosforiliranog I $\kappa$ B- $\alpha$  (p-I $\kappa$ B- $\alpha$ ), čime inhibira adheziju monocita na endotel (102).

Erucin, odnosno njegov prekursor glukoerucin, imaju svojstvo održavanja integriteta endotela. U istraživanjima je erucin reducirao intracelularno nakupljanje lipida inhibicijom ekspresije adipocitnih proteinskih markera/ adipogenih gena, uključivši PPAR $\gamma$ , CCAAT/pojačivač veznog proteina alfa (C/EBP $\alpha$ ), sintaze masnih kiselina (FAS), proteina koji veže regulatorni element sterola-1c (SREBP-1c) i puta Raf/MEK/ERK/p90RSK. U uvjetima hiperglikemije, erucin je spriječio prekomjernu endotelnu permeabilnost,

održavajući funkciju endotelnih uskih spojeva (eng. 'tight junctions'), putem poticanja ekspresije vaskularnog endotelnog kadherina (VE-kadherin), kao i proteina zonule occludens-1 (ZO-1 proteini), koji čini kontaktne veze između stanica (25). U istraživanju je ekstrakt *E. sativa* pokazao antitrombocitnu i antitrombotsku aktivnost - inhibirao je aktivaciju NF- $\kappa$ B p65 u trombocitima i ekspresiju P-selektina, trombokšana B2, CCL5 (kemokin (C-C motiv) ligand 5), TGF- $\beta$  i IL-1 $\beta$ , što je doprinijelo supresiji agregacije trombocita i smanjenju stvaranja arterijskog tromba (103).

AITC, uz antioksidacijsko i protuupalno djelovanje, ima svojstvo smanjenja pretilosti i ublažavanja metaboličkog sindroma, što postiže jednako potičući lipolizu i sprječavanjem odlaganja lipida, koje inače predstavlja jedan od temeljnih etiopatogenetskih mehanizama u aterosklerozi. Istraživanje na mišjem modelu pokazalo je kako AITC uspješno smanjuje nakupljanje lipida i smanjuje upalu kod nealkoholne bolesti jetre. AITC je u istraživanju značajno smanjio razinu proteina sterolnog regulatornog elementa veznog proteina 1 (SREBP1) i njegove ciljne gene za lipogenezu te povećao razinu proteina uključenih u  $\beta$ -oksidaciju masnih kiselina, kao i razinu uzvodnih medijatora, Sirtuin 1 i AMP-aktivirane protein kinaze  $\alpha$  (AMPK $\alpha$ ), u jetri miševa izloženih prehrani s visokim udjelom masti (104). Ekstrakt lista japanskog hrena ili wasabija, koji sadrži pozamašne količine AITC-a, u istraživanjima je značajno suprimirao metaboličku disregulaciju proizašlu iz hipertrofije adipocita, djelujući inhibitorno na ekspresiju gena uključenih u nakupljanje lipida, uključivši: *PPAR $\gamma$* , jetrenu *acetil-CoA karboksilazu 1 (ACCI)*, *leptin* u masnom tkivu, *C/EBP $\alpha$* , *C/EBP $\beta$* , *FAS*, *SREBP1c* i jetrenu *AMPK $\alpha$ 1* i *AMPK $\alpha$ 2* (105). Ekstrakt lista japanskog hrena ili wasabija, koji sadrži pozamašne količine AITC-a, u istraživanjima je značajno suprimirao metaboličku disregulaciju proizašlu iz hipertrofije adipocita, djelujući inhibitorno na ekspresiju gena uključenih u nakupljanje lipida, uključujući: *PPAR $\gamma$* , jetrenu *acetil-CoA karboksilazu 1 (ACCI)*, *leptin* u masnom tkivu, *C/EBP $\alpha$* , *C/EBP $\beta$* , *FAS*, *SREBP1c* i jetrenu *AMPK $\alpha$ 1 (Prkaa1)* i *AMPK $\alpha$ 2 (Prkaa2)*. Ekstrakt lista hrena, u dozi od 50 mg/kg/dan, u periodu od 84 dana, pokazao je povoljni inhibitorni učinak na nakupljanje lipida, inducirano dijetom s visokim udjelom masti, kao i inhibitorno djelovanje na hipertrofiju adipocita. Potpuna afirmacija hipolipidemijskog učinka ovog ekstrakta vidljiva je i kroz aktivno snižavanje serumskih koncentracija LDL-a, triglicerida i ukupnog kolesterola, kao i podizanje razina HDL-a u miševa hranjenih dijetom s visokim udjelom masti. Budući da su spomenuti učinci ovog ekstrakta u dozi od 50 mg/kg/dan potpuno usporedivi s učinkom metformina u dozi od 250 mg/kgdan, u miševa na dijete s visokim udjelom masti, moguće je kako barem dio hipolipidemijskog učinka ekstrakt japanskog hrena dužuje inhibitornom djelovanju na

proizvodnju i oslobađanje enzima gušterače, što naposljetku dovodi do smanjene razgradnje i apsorpcije masti, kao i istovremenog pojačanog izlučivanja masti putem fecesa (105).

I3C može smanjiti serumske koncentracije kolesterola u modelu hiperkolesteremičnih miševa – pokazalo se kako u znatnoj mjeri inhibira proizvodnju jetrenog apoB-100, što dovodi do promjena u sintezi lipida u stanici. Jedan od mogućih načina inhibicije proizvodnje apoB-100 jest reducirana sinteza lipida putem SREBP-1, koji modulira homeostazu kolesterola, i njegovog nizvodnog gena, FAS (106). I3C je u istraživanjima spriječio povećanje tjelesne mase, pretilost i upalu, kao posljedicu pretilosti, modulirajući ključne putove uključene u adipogenezu, termogenezu i upalu; inhibirao regrutaciju makrofaga u masno tkivo, smanjio sintezu masnih kiselina, smanjio proliferaciju i preživljavanje adipocita, inhibirao nakupljanje lipida i potaknuo metabolizam lipida (25). U istraživanju na staničnim kulturama endotelnih stanica I3C je reducirao akumulaciju lipidnih kapljica u adipocitima i suprimirao adipocitima stimuliranu angiogenezu u endotelnim stanicama. I3C je inhibirao medijem (eng. *conditioned medium*) stimulirano formiranje endotelne tube, strukture koja je nalik kapilarama, a formiraju je endotelne stanice kao odgovor na angiogenetske signale iz medija. Ova je inhibicija izgledno ostvarena moduliranjem sekrecije angiogenetskih čimbenika podrijetla adipocita, uključivši VEGF, IL-6, metaloproteinaze matriksa i NO. Ovaj bi spoj u budućnosti mogao postati snažni terapeutik u liječenju debljine i s njom povezanih poremećaja (107).

#### 2.4.5. Djelovanje glukozinolata na miokard

Sulforafan doprinosi ublažavanju fibrotičkih procesa u miokardu, što može umanjiti progresiju srčanog remodeliranja u postinfarktnom periodu. Naime, u štakorskom modelu infarkta miokarda, primjena sulforafana u dozi od 5 mg/kg/dan u periodu od 25 dana, rezultirala je 2.1 puta manjom fibrozom miokarda i malim ublažavanjem srčanog remodeliranja, uz stimulaciju citoprotektivnog enzima HO-1, što može stvoriti redoks okruženje u srčanom tkivu koje je povoljno za aktivaciju putova preživljavanja i deaktivaciju putova smrti (108). U *in vivo* modelu srčane ishemije-reperfuzije, sulforafan je ublažio reperfuzijsku ozljedu miokarda kod štakora učinkovitije od ustaljene metode post-kondicioniranja (PostC), koja zapravo predstavlja mehanički manevar intermitentne obnove krvne opskrbe kroz tri ciklusa reperfuzije i okluzije (svaki u trajanju od 10 s), prije prolongirane reperfuzije. Iako su obje strategije smanjile reperfuzijsku ozljedu, smanjile

veličinu infarkta, oksidacijski stres i upalu, sulforafan je bio učinkovitiji u smanjenju razina LDH i interleukina. Predloženo je kako sulforafan, osim aktivacije Nrf2, posjeduje dodatni mehanizam djelovanja te se vrlo vjerojatno radi o djelovanju na receptor arilnih ugljikovodika (Ahr, eng. *aryl hydrocarbon receptor*), čija je nizvodna meta ujedno i sam Nrf2. Međudjelovanje između Ahr i Nrf2 inducira jednako enzime faze I (putem vezanja Ahr/XRE), kao i enzime faze II (putem vezanja Nrf2/ARE), pružajući jači antioksidacijski odgovor i reducirajući zatajenje srca u hipertenzivnih štakora (109). U istraživanju na kardiomiocitima novookočenih miševa u modelu ishemijske/reperfuzijske ozljede, pokazalo se da tretman stanica sa sulforafanom, u koncentraciji od 5  $\mu\text{mol/L}$ , reducira slobodne kisikove radikale, proizvodnju MDA, podiže razinu SOD-a i ublažava ozljedu nastalu od metaloproteinaza matriksa, aktivacijom Nrf2/HO-1 puta, odnosno inhibiranjem apoptoze. U istom su istraživanju zabilježene i znatne redukcije kreatin kinaze i povišenje razina NO (110). U modelu kroničnog srčanog zatajenja u zečeva, izazvanog suženjem aorte, 12-tjedna primjena sulforafana dovela je do smanjenja razine ANP-a i BNP-a i smanjenja ekspresije kolagena I i III u srčanom tkivu (što smanjuje srčanu fibrozu, rezultirajući poboljšanom srčanom funkcijom i preoblikovanjem srca (111). U istraživanju na staničnim kulturama kardiomiocita, kao i u *in vivo* modelu miša, sulforafan je uspješno suprimirao srčanu hipertrofiju, inhibirajući ekspresiju GATA4/GATA6 i signalne puteve MAPK. Transkripcijski faktori GATA4 (GATA vezni faktor 4) i GATA6 (GATA vezni faktor 6) ključni su regulatori srčanih gena u normalnom razvoju srca, kao i u patološkoj hipertrofiji, a vezna mjesta GATA potrebna su za *in vivo* aktivaciju srčanih promotora tijekom srčane hipertrofije. U spomenutom istraživanju pretretman sulforafanom spriječio je srčanu hipertrofiju izazvanu adrenergičkim agonistima (fenilepinefrin, endotelin-1) i dodatno je suprimirao povišenje markera hipertrofije u kardiomiocitima, uključivši ANP, BNP i  $\beta$ -MHC (112). Rezultati istraživanja pokazali su kako sulforafan može prevenirati sa staranjem povezanu srčanu i mišićnu disfunkciju, i to djelujući jednim od svojih osnovnih mehanizama – poticanjem signalizacije Nrf2. Kohorte mladih miševa (starosti dva mjeseca) i starih miševa (starosti 21-22 mjeseca) hranjene su regularnom hranom za glodavce ili hranom obogaćenom sulforafanom, kroz period od 12 mjeseci. U skupini starijih miševa hranjenih sulforafanom uočena je obnovljena aktivnost Nrf2, mitohondrijska funkcija, srčana funkcija, kapacitet za tjelovježbu, tolerancija glukoze te aktivacija/diferencijacija satelitskih stanica skeletnih mišića. Specifičnije, u pogledu srčane funkcije, sulforafan je statistički značajno poboljšao ejskijsku frakciju srca, frakcijsko skraćivanje, volumen udara i srčani minutni volumen u starih miševa, dovodeći srčanu funkciju starih miševa u mirovanju na razinu one u mladim

miševa (113). Sulforafan ima dokazano kardioprotektivno djelovanje protiv brojnih kardiotoksičnih spojeva, uključivši angiotenzin II, cuprizon, vodikovov peroksid i metamfetamin. U većini slučajeva radi se u povećanju aktivnosti antioksidacijskih enzima, dominantno putem aktivacije faktora Nrf2 (114). U jednom recentnom istraživanju na mišjem modelu ozljede miokarda, izazvane intraperitonealnom primjenom metamfetamina, pretretman sulforafanom ublažio je toksično djelovanje metamfetamina, aktiviranjem Nrf2, što je rezultiralo smanjenjem ekspresije srčanog troponina, ocjene srčane ozljede, smanjenjem koncentracije MDA, povišenjem ekspresije SOD-a i Bcl-2, ali i smanjenjem ekspresije kaspaze-3 i Bax (115). Iako se sulforafan pokazao jako sigurnim za ljude te su on i njegove stabilizirane varijante recentno dobile odobrenje za klinička istraživanja u ljudi u svrhu liječenja neuroloških bolesti i raka, postoji bojazan od njegovih nepovoljnih učinaka na srce u pojedinaca, pogotovo onih s drugim kardiovaskularnim komorbiditetima. Naime, u istraživanju Rhoden i sur. ustanovljeno je da sulforafan u akutnim (30  $\mu$ M) i kroničnim (1  $\mu$ M tijekom 3 tjedna) koncentracijama izaziva oštećenje funkcije mitohondrija te Frank-Sterlingov efekt rastezanja kardiomiocita s negativnim inotropnim učinkom. Ovi su se učinci pokazali u *in vitro* modelu srčanih tkiva (eng. *engineered heart tissues* – EHTs) iz neonatalnih (0 do 3 dana starih) kardiomiocita štakora Wistar (NRCMs) i kardiomiocita izvedenih od ljudskih induciranih pluripotentnih matičnih stanica (*hiPSC-CMs*), kao i u *ex vivo* istraživanjima na srcima odraslih mužjaka miševa C57 Black Swiss. Autori smatraju kako je sulforafanom uzrokovanoj kontraktilnoj disfunkciji doprinijela i mitohondrijska disfunkcija te se savjetuje redovno praćenje srčane funkcije kako bi se izbjegao razvoj kardiotoksičnog učinka kod primjene sulforafana i njegovih varijanti (116).

Ekstrakt sjemenki konjske rotkvice (*Moringa oleifera* L.), koji u znatnoj količini sadrži moringin, u istraživanju je ublažio ozljedu miokarda i spriječio ventrikularno zatajenje srca inducirano infarktom miokarda. U modelu infarkta miokarda, u skupini miševa koji su hranjeni ekstraktom sjemenki konjske rotkvice kroz period od 28 dana, opaženo je bolje preživljenje, poboljšana srčana funkcija sa značajno povećanom ejakcijskom frakcijom i frakcijskim skraćanjem, a područje zahvaćeno infarktom bilo je značajno smanjeno, u odnosu na skupinu miševa koje se hranilo regularnom prehranom. Mehanizam djelovanja vjerojatno se sastoji od inhibicije infarktom potaknute apoptoze, kao i smanjenja stupnja srčane fibroze, a sveukupni kardioprotektivni učinak ostvaren je supresijom oksidacijskog stresa u srcu (117).

Ekstrakt povrtne rige (*Eruca sativa* Mill.), koji u znatnoj količini sadrži erucin, u animalnom modelu štakora je uspješno spriječio toksični učinak nanočestica hidroksiapatita, što je bilo vidljivo kroz inhibiciju povišenja razina srčanih markera poput CK-MB, LDH i

mioglobina, povišene razine antioksidacijskih enzima (SOD, CAT, GSH), reduciranu sintezu radikala tiobarbituratne kiseline, inhibiciju ekspresije p53 te sprječavanje histoloških promjena miokarda (118).

Oguri i sur. bili su prvi koji su dokazali kako alil-izotiocijanat, razgradni produkt sinigrina, može aktivirati  $\text{Ca}^{2+}$  propusne neselektivne kationske kanale u humanim srčanim fibroblastima, i to vjerojatno djelujući na TRPA1 (eng. *transient receptor potential ankyrin 1*), kao selektivni agonist. Ovo djelovanje povećava ulazak  $\text{Ca}^{2+}$  u stanicu i povisuje njegovu unutarstaničnu koncentraciju (119). TRPA 1 je inače  $\text{Ca}^{2+}$ -propusni neselektivni kationski kanal u plazmatskoj membrani, za kojeg se smatra da ima esencijalnu ulogu u razvoju i progresiji nekolicine kardiovaskularnih bolesti, uključivši aterosklerozu, srčano zatajenje, ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu, fibrozu miokarda, aritmiju i hipertenziju. Aktivacija TRPA1 ima protektivnu ulogu protiv razvoja ateroskleroze, a sama aktivacija proizvodi perifernu vazodilataciju i inducira bifazični odgovor krvnog tlaka. S druge strane, gubitak ekspresije ovog kanala, ili njegova blokada, suprimirala je srčano zatajenje, ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu miokarda i aritmiju, stoga treba imati na umu mogućnost dvojakog djelovanja aktivacije ovog kanala (120). Također, TRPA1 je moguće uključen u razvoj nuspojava kod primjene alil-izotiocijanata. Naime, inhalacija ovog spoja u normotenzivnih i spontano hipertenzivnih štakora rezultirala je bradikardijom, atrioventrikularnim (AV) blokom, prolongiranim PR intervalom i bifazičnim odgovorom tlaka. Isto tako, u spontano hipertenzivnih štakora, alil-izotiocijanat je uzrokovao abnormalni uzorak elektrokardiograma (EKG), okarakteriziran učestalijom pojavom negativnog P-vala, kao i njegovog produljenog trajanja te produljene PR i RR intervale u odnosu na kontrolnu skupinu. Općenito, rezultati ovog istraživanja upozoravaju kako inhalacija nije optimalan način primjene AITC-a u pacijenata s povijesti srčanih bolesti i hipertenzije (25).

Deng i sur. utvrdili su kako I3C sprječava i obrće srčano remodeliranje putem aktivacije signalizacije AMPK- $\alpha$ . U istraživanju AMPK- $\alpha$ 2 knockout miševi hranjeni s I3C ili regularnom hranom podvrgnuti su operativnom zahvatu podvezivanja aorte (model srčanog zatajenja) ili placebo operativnom zahvatu. Rezultati istraživanja ukazali su na to da I3C sprječava i obrće srčano modeliranje inducirano podvezivanjem aorte, što je naposljetku bilo vidljivo kroz ehokardiografske i hemodinamske parametre, ali i histološku analizu te gensku ekspresiju i markere fibroze i hipertrofije miokarda. Primjena I3C dovela je do smanjenja ekspresije mRNA za TGF i CTGF (faktor rasta vezivnog tkiva) te inhibicije pretjerane sinteze kolagena I i kolagena II. U istraživanju je jasno dokazano kako se učinak na srce ostvaruje djelovanjem na signalizaciju AMPK- $\alpha$  i ERK 1/2, a I3C se predstavio kao obećavajući

terapeutik u liječenju srčanog zatajenja (121). Nadalje, kardioprotektivni učinak I3C potvrđen je i u animalnom modelu štakora srčanog stresa i hipertrofije miokarda (inducirani visokim unosom soli) – I3C u dozi od 20 mg/kg tjelesne mase, primijenjen peroralno, ublažio je hipertrofiju miokarda i proizveo antihipertenzivni učinak usporediv s poznatim antihipertenzivom, losartanom. Njegova je primjena također rezultirala statistički značajnim reduciranjem razina CRP-a, CK-a, serumskog LDH, mijeloperoksidaze i hidroksiprolina te povišenim razinama NO. Učinak je, osim djelovanjem na muskarinske (M2) receptore, ostvaren i kroz povećanje koncentracije GSH te aktivnosti enzima metabolizma faze II (uključujući *NQO1*, *HO-1*, *GCL*), kao i supresijom oksidacijskog stresa i lipidne peroksidacije. Mehanizam uključuje stimulaciju signalnog puta Nrf2/ARE, inhibitornog djelovanja na put NF- $\kappa$ B (smanjenje NF- $\kappa$ B p50, iNOS, COX-2, IL-6) te regulaciju ekspresije antiapoptotičkih (Bcl2) i proapoptotičkih (kaspaza 3, Bax) markera (122).

#### 2.4.6. *Djelovanje polifenola na aterosklerozu i vaskularni tonus*

Polifenoli mogu regulirati stanični lipidni metabolizam, vaskularnu i endotelnu funkciju, hemostazu, ali i funkciju trombocita – zaključno, gotovo sve preduvjetе za formiranje i razvoj aterosklerotskog plaka (9). Smatra se kako polifenoli reguliraju vaskularnu i endotelnu funkciju putem više sinergističkih mehanizama. Prvenstveno, za polifenole se utvrdilo kako zaustavljaju progresiju ateroskleroze putem poboljšanja lipidnog profila, odnosno povećavajući razinu HDL-a, smanjujući razinu LDL-a i ukupnog kolesterola. Jedno dvostruko-slijepo placebo istraživanje u ljudi pokazalo je kako kurkumin u dozi od 1890 mg/dan značajno mijenja lipidni profil, odnosno snizuje razinu LDL-a i povećava razinu HDL-a u pacijenata s metaboličkim sindromom (123). Za polifenole crnog vina i soka od crnog grožđa pokazalo se da mogu usporiti nastanak i suzbiti progresiju ateroskleroze sprječavanjem oksidacije LDL-a, antioksidacijskim djelovanjem, inhibicijom agregacije trombocita, kao i povišenjem koncentracije HDL-a te odgađanjem propagacije vaskularnih stanica glatkih mišića (8). Nadalje, glavninu svog utjecaja na endotel, polifenoli ostvaruju putem poticanja proizvodnje NO. Resveratrol i kvercetin imaju antihipertenzivno djelovanje, za koje je najviše odgovorno djelovanje na endotel, vidljivo kroz indukciju gena odgovornih za inducibilnu NO sintazu (iNOS) i COX-2 unutar stijenki arterija. Polifenolima potaknuta pojačana sinteza NO izgledno je povezana s djelovanjem na kalcijeve ione - resveratrol i kvercetin uzrokuju povišenje unutarstanične koncentracije kalcijevih iona putem otvaranja

natrijevih kanala ili putem inhibicije  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-aze unutar endoplazmatkog retikuluma endotelnih stanica (8). Resveratrol potiče sintezu NO u endotelnim stanicama pojačavanjem ekspresije endotelne sintaze (eNOS) i sprječavanjem eNOS "uncouplinga" (nesparenosti) putem brojnih mehanizama, uključivši i aktivaciju SIRT1. Stilben picetanol također povoljno djeluje na endotelnu funkciju putem poticanja fosforilacije eNOS i povećanjem proizvodnje NO (42). Ipak, treba napomenuti kako povoljno djelovanje polifenola na endotel nije striktno ograničeno na poticanje proizvodnje NO – vrlo je izgledno da polifenoli sudjeluju u održavanju homeostaze vazokonstriktornih i vazodilatacijskih molekula, eikozanoida prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) ili prostaciklina te tromboksana A<sub>2</sub> (124). Resveratrol također može inhibirati prekomjernu proizvodnju vazokonstriktora, endotelina-1 (ET-1), koja je potaknuta različitim proupalnim citokinima i renin-angiotenzin-aldosteron sustavom (RAAS) (42). U jednom se istraživanju pokazalo kako prehrana s niskim udjelom polifenola (ograničeni unos voća, povrća, kakaa, kave i čaja), samo kroz dva tjedna, može dovesti do promjene vaskularnih bioloških biljega, uključivši i promjenu odnosa PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> u korist povećane koncentracije vazokonstriktora (TXA<sub>2</sub>) (124).

Poznato je kako zasićene masne kiseline dovode do endotelne ozljede i kardiovaskularnih komplikacija. Song i suradnici u svojem su istraživanju pokazali kako je resveratrol u koncentraciji od 10, 50 i 100  $\mu\text{M}$  spriječio palmitinskom kiselinom inducirano oslobađanje reaktivnih kisikovih vrsta, kroz regulaciju autofagije, djelujući na signalni put AMPK-mTOR (eng. *adenosine monophosphate-activated protein kinase - mammalian target of rapamycin*), na taj način pružajući kardiovaskularnu zaštitu u metaboličkom sindromu humanih aortalnih endotelnih stanica (125). Angiogeneza je ključni proces jednako prisutan u raku i kardiovaskularnim bolestima, a vaskularni endotelni čimbenik rasta (VEGF; eng. *vascular endothelial growth factor*) i njegov receptor VEGFR-2 glavni su okidači ovog procesa. Dimeri resveratrola  $\epsilon$ -viniferin i palidol, u koncentraciji od 10 i 50  $\mu\text{M}$ , pokazali su potencijalni anti-angiogenetski učinak, pojačavajući aktivaciju eNOS putem Akt fosforilacije i inhibicije receptorom 2 vaskularnog endotelnog čimbenika rasta inducirane fosforilacije u endotelnim stanicama humane umbilikalne vene. Stilbeni imaju potencijal kao anti-VEGF sastojci u hrani i pićima (126). Benefiti polifenola čaja široko su proučavani u *in vitro* i *in vivo* modelima. Epigalokatehin-3-galat (EGCG), prirodni polifenol iz zelenog čaja (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), pokazuje brojne biološke učinke, poput protuupalnog, antioksidacijskog, antimutagenog i antikancerogenog djelovanja. Meng i suradnici pronašli su kako pretretman stanica HUVEC s EGCG značajno poboljšava preživljenje tih stanica uslijed

vodikovim peroksidom ( $H_2O_2$ ) uzrokovane stanične smrti, i to, između ostalog, djelujući na induciranje autofagije, putem blokiranja mTOR signalnog puta (127).

#### 2.4.7. Djelovanje polifenola na trombocite

Prekomjerna aktivacija trombocita povezana je s nekoliko dugoročnih vaskularnih bolesti, poglavito zbog brojnih adhezijskih proteina u granulama koji, u slučaju visoke aktivnosti, mogu dovesti do različitih trombotskih bolesti. U ovom kontekstu, događaju se brojni važni događaji u procesu aktivacije trombocita. Jedna od njih je konverzija arahidonske kiseline u tromboksan A<sub>2</sub> kroz put ciklooksigenaze. Prvi korak u aktivaciji trombocita jest prijanjanje trombocita na kolagen, a proteini poput fibrinogena i trombospondina služe kao adhezijski proteini i trombocitni receptori koji zajedno rade kako bi omogućili sljepljivanje trombocita, što naposljetku započinje signalizaciju unutar stanica i aktivaciju trombocita. Smatra se kako polifenoli imaju sposobnost učiniti trombocite manje 'ljepljivima', iako točan mehanizam nije poznat (8). Polifenoli iz ekstradjevičanskog maslinovog ulja izgledno sprječavaju ekspresiju iNOS (inducibilna sintaza NO), COX-2, LOX (lipoksigenaza) i fosfolipaze A<sub>2</sub>, na taj način blokirajući proizvodnju eikozanoida (PGI<sub>2</sub>, leukotriena B<sub>4</sub>), što je jedan od ključnih elemenata u procesu agregacije trombocita. Spomenuti polifenoli ekstradjevičanskog maslinovog ulja također smanjuju proizvodnju tromboksana B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) i 27- hidroksileikosatetrenoata. Slično je pronađeno i za resveratrol, koji djeluje kao reverzibilni inhibitor COX-1 enzima u trombocitima, vežući se na njegovo aktivno mjesto i tvoreći stabilan kompleks. Općenito, polifenoli iz prehrane mogu smanjiti endotelnu proizvodnju adhezijskih molekula, NO i hiperpolarizirajućeg faktora podrijetla endotela (eng. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*, EDHF). Antitrombocitno djelovanje ostvaruje se i putem antioksidacijskog djelovanja, pa tako polifenoli iz kakaia mogu reducirati aktivaciju trombocitne NADPH oksidaze i formiranje kisikovih radikala i eikozanoida (128). Osim antioksidacijskog djelovanja, jedan od glavnih inhibitornih mehanizama polifenola je supresija porasta citoplazmatskog  $Ca^{2+}$  i inhibicija proizvodnje tromboksana i puta arahidonske kiseline. Za kvercetin i resveratrol je pronađeno kako mogu vrlo efikasno inhibirati sintezu upalnih agensa podrijetla arahidonske kiseline, kao što su TXB<sub>2</sub>, hidroksiheptadekatrienoat i 12- hidroksieikosatetraenoat (128).

#### 2.4.8. Djelovanje polifenola na miokard

Recentna istraživanja etiologije srčane hipertrofije pokazala su kako su nikotinamid adenin dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) i s njim povezani metaboliti značajni u patogenezi ovog procesa. U kultiviranim kardiomicitima neonatalnih štakora stimuliranih angiotenzinom II i u srčanom tkivu štakora podvrgnutih konstrikciji abdominalne aorte, kao procesima koji su proizveli pojačani srčani rad, ECG je značajno povišio izražajnost i aktivnost Nmnat2 (eng. *nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 2*) proteina, na taj način ostvarujući djelovanje protiv hipertrofije srca (11).

Resveratrol je pokazao učinak protiv srčanog zatajenja djelujući AMPK, i to putem aktivacije SIRT1. AMPK je svojevrsni regulator energije koji kontrolira staničnu metaboličku funkciju i uravnotežuje proizvodnju i potrošnju ATP-a, a aktivira se u uvjetima povišenog AMP-ATP omjera, usmjeravajući metabolizam stanica prema putevima koji proizvode ATP, kako bi došlo do povišenja stanične koncentracije ATP-a. Sirt1, produkt *SIRT1*, je NAD<sup>+</sup>-ovisna deacetilaza za koju su istraživanja pokazala da posjeduje antioksidacijska svojstva putem djelovanja na signalni put AMPK. U istraživanju na muškim Sprague-Dawley štakorima, u kojem je stanje srčanog zatajenja postignuto izazivanjem infarkta miokarda (podvezivanjem jedne od koronarnih arterija- LAD, eng. *left anterior descending*), prehrana bogata resveratrolom pokazala je izrazito povoljan učinak na zdravlje srca, jednako kroz značajno povišenje ekspresije AMPK i poboljšanje srčane funkcije, vidljivo kroz ehokardiogram. Dodatno se, pokusom na SIRT1 (+/-) knockout miševima, potvrdilo kako opisani učinak na AMPK resveratrol ostvaruje putem aktivacije SIRT1 te da SIRT1 djeluje kao transkripcijski aktivator gena *AMPK* u SIRT1-visokoizražajnim stanicama H9c2 (klonalne stanice podrijetlom iz embrionalnog srčanog tkiva BD1X štakora) (129). Jedno je istraživanje potvrdilo kako resveratrol smanjuje srčano remodeliranje u mišjem modelu srčanog zatajenja s očuvanom ejekcijskom frakcijom, HFpEF (eng. heart failure with preserved ejection fraction), i to smanjujući acetilaciju Smad3 i transkripcijsku aktivnost, preko aktivacije Sirt1 (130). Inače, u srcima pod patološkom stimulacijom pronađena je smanjena aktivnost i proteinska ekspresija Sirt1, a smatra se da ova deacetilaza djeluje na fibroblaste putem interakcije sa Smad3, transduktorskim proteinom uključenim u signalni put TGF-β. Također, u modelu miševa s HFpPEF pronađene su povišene aktivnosti katalaze, superoksid dizmutaze i glutationa, što govori u prilog oksidacijskom stresu i s njim povezanom pojačanom proizvodnjom slobodnih radikala. U istom je istraživanju u skupini miševa, koji su primali resveratrol u dozi 10 mg/kg/dan intragastričnom sondom, zabilježen

značajan pad aktivnosti katalaze, SOD-a i GSH induciranih s HFpPEF (130). U hidroksieikosatetraenoičnom kiselinom (HETE) induciranom štakorskom modelu post-infarktne stanja, suplementacija resveratrolom u dozi od 5.82 mg/kg/dan značajno je povisila sistoličku funkciju lijeve klijetke i uspješno preokrenula proces remodeliranja lijeve klijetke i pretklijetke (131). U istraživanju Rimbauda i suradnika, dvomjesečna suplementacija resveratrolom u dozi od 18 mg/kg/dan kroz period od dva mjeseca, povezala se sa smanjenim srčanim remodeliranjem i poboljšanom srčanom funkcijom u štakorskom modelu hipertenzije, uzrokovane prehranom s visokim udjelom soli. Resveratrol je dodatno povećao antioksidacijsko djelovanje kardiomiocita i poboljšao mitohondrijsku funkciju, pojačavajući aktivnost kaskade PGC-1 $\alpha$  i smanjujući mitohondrijsku lipidnu oksidaciju (132).

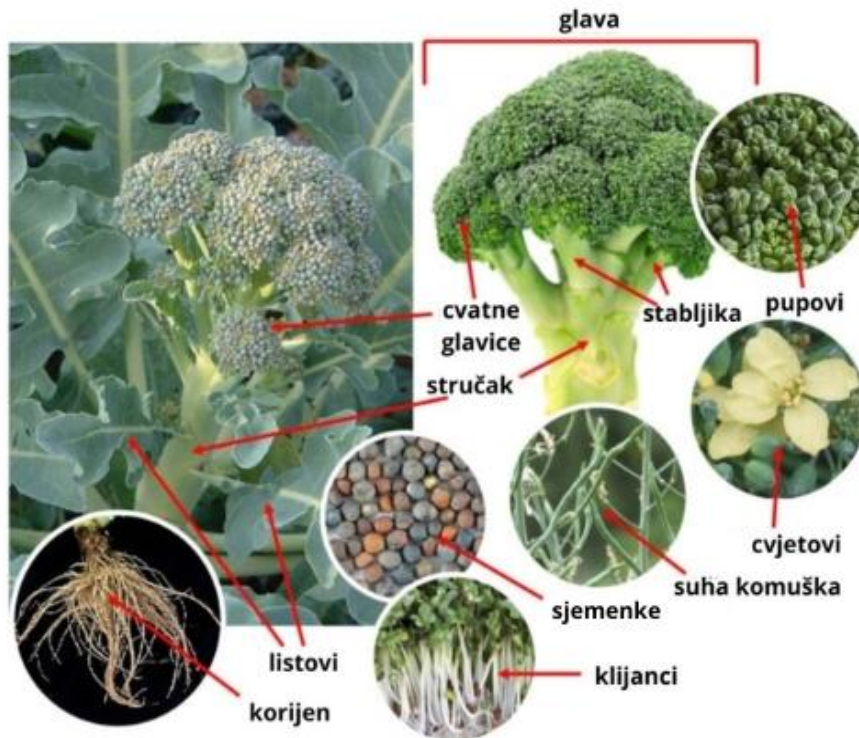
## 2.5. *Klijanci brokule kao izvor glukozinolata i polifenola*

### 2.5.1. *Brokula i klijanci brokule*

Brokula je kupusnjača, blisko srodna kupusu, cvjetači, kelju i gorušici. Sam naziv "brokula" potječe od latinske riječi "*brachium*" (talijanski "*brocco*"), što znači "grana", a odnosi se na česte izboje koji čine glavicu (6). Kultivirane sorte vrste *Brassica oleracea* L. dijele zajednički genom koji se sastoji od devet kromosoma te pokazuju iznimnu raznolikost morfortipova, uključujući brokulu (var. *italica* Plenck), prokulicu [var. *gemmifera* (DC.) Zenker], kupus (var. *capitata* L.), cvjetaču (var. *botrytis* L.), kelj (var. *medullosa* Thell.), korabicu (var. *gongylodes* L.) te nekoliko endemskih svojti. Svi su oni vjerojatno oblikovani kroz proces ljudske domestikacije koji je započeo od jednostavnog lisnatog pretka (kelj, var. *viridis* L.), a rezultirao zaustavljenim razvojem, povećanjem i morfološkim preoblikovanjem epigejskih organa (cvatova, listova, stabljika ili pupova) (6). Iako uzgoj brokule seže do antičkih vremena i etruščanske civilizacije u Italiji, masovna i komercijalna kultivacija počela je prije stotinjak godina u Kaliforniji i proširila se diljem svijeta poslije II. Svjetskog rata, prilagođavajući se lokalnim vremenskim uvjetima i okolišu (6).

Brokulu karakteriziraju velike cvjetne glavice, obično zelene boje, koje su raspoređene poput stabla i granaju se iz debele, jestive stabljike (**Slika 9**). Riječ je o jednogodišnjoj, zeljastoj kulturi umjerene klime, s optimalnim temperaturama rasta između 13 i 20 °C (6). Raste do 60–90 cm visine i stvara uspravnu, razgranatu, debelu zelenu stabljiku s kožastim, izduženim, sivo-plavkastozelenim do zelenim prizemnim rozetnim listovima. Na završecima

središnje osi i bočnih grana (stabljika) brokula razvija guste, zelene, jestive skupine cvjetnih pupova (cvatne glavice) koje, ako se ne uberu, procvjetaju u žute cvjetove s četiri laticice i stvaraju plodove tipa komuške. Cvatne glavice (floreći) i gornji dijelovi stabljika čine cvatnu glavicu (glavu) brokule, koja predstavlja najčešće konzumirani biljni organ (133).



**Slika 9.** Botanički dijelovi brokule. Prilagođeno prema Ilahy R i suradnicima (6).

Brokula je jedno od najpopularnijih i najviše konzumiranih povrća u svijetu, s porastom konzumacije od rekordnih 940 % u posljednjih 20 godina. Ovakav porast konzumacije ponajviše se može pojasniti rastućom globalnom svijesti o zdravlju i poznavanju zdravstvenih dobiti nakon konzumacije svježe i procesirane brokule. Na tržište se plasira kao svježi ili prerađeni proizvod. (6). Svježa masa zrele brokule može doseći do 776 g, pri čemu su jestivi samo cvatni dijelovi (floreći), koji čine tek do 15% biljke, dok se listovi, stabljike i korijen (47, 21 i 17% ukupne mase) odbacuju prilikom berbe i smatraju nusproizvodom (134). U kategoriju svježe brokule ubrajaju se i minimalno prerađeni proizvodi s dodanom vrijednošću, poput svježe rezane brokule pakirane u vezice, vrećica s cvatnim glavicama (florećima) te mješavina za salate s brokulom, koji su široko prihvaćeni među sve većim brojem

zdravstveno osviještenih potrošača diljem svijeta. Prerađena brokula najčešće se zamrzava za maloprodaju i prodaje u obliku cijelih cvatova ili nasjeckanih komada, dok se samo manji dio dehidrira i/ili konzervira za brzu pripremu gotovih jela i juha. Osim toga, sve je veća primjena ekstrakata sjemenki i klijanaca brokule zbog rastuće svijesti o njihovim pozitivnim zdravstvenim učincima (6).

Klijanac brokule definira se kao mlada biljka, odnosno izdanak i korjenčići dobiveni iz proklijalog sjemena, koji raste 2 do 7 dana. Klijanci se beru u nezreloj fazi, kada su kotiledoni (prvi listići) još nerazvijeni i pravi listovi se još nisu pojavili, što ih razlikuje od mikropovrća (5). Mikropovrće, pak, predstavlja nešto razvijeniju fazu rasta u usporedbi s klijancima. To su mlade biljke povrća, žitarica ili začinskog bilja koje se beru između 7. i 21. dana nakon sjetve, ovisno o sorti. U ovoj fazi, mikropovrće karakteriziraju potpuno razvijeni kotiledoni, često uz prisutnost djelomično razvijenih prvih pravih listova (135). Klijanci i mikrozeljenje novi su pristup funkcionalnoj hrani s brojnim prednostima. Osim što su i do 10 puta bogatiji fitokemijskim spojevima poput glukozinolata i polifenola u odnosu na odraslu biljku, donose i brojne prednosti iz perspektive ekološke održivosti, budući da je njihov uzgoj jednostavan, moguć i u unutarnjem prostoru i ne zahtjeva primjenu herbicida i pesticida. Iako su maleni veličinom, klijanci i mikropovrće imaju iznenađujuće intenzivan okus, jarke boje i bogati su fitokemijskim spojevima zbog čega se smatraju funkcionalnom hranom sa značajnim zdravstvenim benefitima (5). Kupusnjače, a među njima i brokula, pokazali su se posebno zanimljivima, ali i pogodnima za uzgoj klijanaca i mikropovrća (5).

### *2.5.2. Fitokemijski sastav brokule i klijanaca*

Brokula se smatra nutritivno izrazito vrijednom namirnicom zbog brojnih zdravstvenih benefita i koncentracije nutritivnih tvari. Dobar je izvor vitamina C, K i A, a sadrži i nekoliko važnih minerala, uključivši natrij, kalcij i željezo (136). Zrela brokula, na primjer, sadrži oko 100 mg vitamina C na 100 g svježe mase biljke (137). Niskokalorična je, uz visoki udio vlakana, zbog čega prilikom ingestije stvara osjećaj punine i sitosti. S obzirom na različitu nutritivnu vrijednost različitih botaničkih dijelova brokule, kalorijska vrijednost varira od 24 do 51 kcal na 100 g svježe mase biljke, s tim da su klijanci najmanje, a listovi najviše kalorični. Svi dijelovi brokule sadrže visoki postotni udio vode, između 85 i 91 % (134). Dvije najvažnije skupine spojeva u brokuli, koje su ujedno i najodgovornije za njene povoljne učinke na zdravlje jesu glukozinolati i polifenoli (5).

Razine glukozinolata razlikuju se u različitim botaničkim dijelovima brokule, što je posljedica njihove biosinteze, koja započinje u listovima, iz kojih se potom prenose u ostale biljne organe. Ovaj je proces aktivniji tijekom mlađih razvojnih faza biljke, zbog čega sa zrelosti biljke opada i razina glukozinolata u njoj. Nakon klijanaca i mikropovrća, cvjetne glavice brokule sljedeće su po sadržaju glukozinolata, dok listovi i stabljike imaju manje količine ovih spojeva. Klijanci brokule obično sadrže do 162.19  $\mu\text{mol}$  glukozinolata/g suhe tvari, što znači da su bogatiji glukozinolatima i od klijanaca cvjetače (50.66  $\mu\text{mol/g}$ ), pa čak i klijanaca kupusa (do 91.94  $\mu\text{mol/g}$ ) (134). Za zorniji prikaz, možemo reći kako glukozinolati sačinjavaju čak 67-76 % ukupnog sadržaja fitokemijskih spojeva klijanaca brokule (6). U klijancima i mikropovrću brokule identificirano je ukupno 26 različitih glukozinolata, od čega su najzastupljeniji glukorafanin, glucoiberin, glucoerucin, glukobrasacin i neoglucobrasacin. Pogotovo se ističe glukorafanin koji predstavlja više od 50 % ukupnog sadržaja glukozinolata, a količinski se njegov udio procjenjuje u rasponu od 605 do 1172 mg spoja na 100 g svježe mase biljke (5). Neka istraživanja navode kako klijanci brokule, u odnosu na cvjetne glavice, sadrže i do 100 puta veću količinu glukorafanina, koji se pak prevodi u sulforafan (138). Za usporedbu, iako se prisutni glukozinolati preklapaju s onima u klijancima, drugi botanički dijelovi odrasle biljke značajno se razlikuju prema njihovoj zastupljenosti. Tako u cvjetnim glavicama najveći udio čine neoglucobrasacin, glukobrasacin i glukorafanin, dok u stabljici i listu prevladavaju glukorafanin, neoglucobrasacin i glucoiberin. (134). Kllice i sjemenke brokule pokazuju značajno viši udio ukupnih i alifatskih, ali manji sadržaj indolnih glukozinolata, u usporedbi s klijancima starima dva tjedna. Smatra se da s razvojem biljke dolazi do progresivne zamjene viših alifatskih s indolnim glukozinolatima, što može govoriti u prilog hipotezi da su ove dvije klase glukozinolata primjerene kao kemijska obrana od agresora u različitim fazama razvoja biljke (6).

Polifenoli su, uz glukozinolate, druga važna skupina bioaktivnih spojeva koji se mogu pronaći u klijancima brokule. Prema jednom istraživanju, ukupni udio polifenola u klijancima brokule iznosio je do 77,19 mg ekvivalenta galne kiseline (GAE)/g suhe tvari, što je više nego u listovima, cvatnim glavicama i stabljikama, s vrijednostima od 24,35, 10,74 i 9,39 mg GAE/g. Slično glukozinolatima, za klijance brokule utvrđeno je da sadrže više polifenola nego klijanci drugih vrsta, poput rotkvice, leće, cikle i amaranta (134). Međutim, u usporedbi s klijancima srodnijih kupusnjača poput cvjetače, korabe i kupusa, klijanci brokule obično sadrže niže razine ukupnih fenolnih spojeva (139). U klijancima brokule identificirano je 37 polifenolnih spojeva, od čega 29 pripada hidroksicimetnim kiselinama i njihovim derivatima, a 8 flavonoidima i derivatima. Najzastupljeniji su sinapinska i galna kiselina, flavonoidi

kvercetin i kemferol te druge hidroksicimetne kiseline poput klorogenske, kavene i ferulične. Ukupni udio fenola je u rasponu od 74 do 453 mg/100g svježe mase, a flavonoida 95-105 mg/100 g svježe mase biljke (5).

Osim glukozinolata i polifenola, klijanci i mikropovrće brokule poznati su po visokoj koncentraciji esencijalnih nutrijenata. Esencijalni nutrijenti jesu spojevi koji se moraju unositi hranom, a potrebni su za normalno funkcioniranje tijela, uključivši sintezu DNA, proizvodnju energije i biosintetske puteve. Ova skupina obuhvaća vitamine, minerale, esencijalne masne kiseline i amnokiseline. Dosadašnja istraživanja pokazala su da su klijanci brokule iznimno bogati vitaminima (A,C, K, folna kiselina), mineralima (natrij, kalcij, magnezij, selen), pigmentima (karotenoidi i klorofili), kao i drugim istaknutim esencijalnim nutrijentima, uključivši aminokiseline, masne kiseline i vlakna (5).

Karotenoidi su skupina izoprenoidnih molekula koje se kao specijalizirani metaboliti sintetiziraju u svim fotosintetski aktivnim biljkama, uključivši brokulu (5). Zahvaljujući konjugiranim dvostrukim vezama duž polienskog lanca djeluju kao antioksidansi, inhibiraju reaktivne kisikove vrste i smanjuju oksidacijska oštećenja, pri čemu mogu doprinijeti i modulaciji imunološkog odgovora. Stoga karotenoidi mogu spriječiti nastanak degenerativnih bolesti, poput kardiovaskularnih bolesti, oštećenja kože, šećerne bolesti i pojedinih vrsta raka. Glavni karotenoidi prisutni u brokuli su  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -ksantofil (lutein) i  $\beta$ -ksantofili (zeaksantin, violaksantin i neoksantin) (140). Među njima je  $\beta$ -karoten najčešće proučavani karotenoid u klijancima i mikropovrće brokule, zbog njegove važnosti u medicini. On ljudskoj prehrani osigurava značajnu količinu vitamina A, ključnog za organogenezu, diferencijaciju tkiva, imunološku funkciju i vid (5). Ukupna koncentracija karotenoida ( $\beta$ -karotena) u klijancima brokule opisana je u više istraživanja, u rasponu od 118 do 221 mg na 100 g suhe mase. Klorofili su druga skupina pigmenata koji apsorbiraju svjetlost i redovito su prisutni u ekstraktima klijanaca brokule. Oni su primarni metaboliti porfirinske strukture i slično karotenoidima, i klorofili pokazuju antioksidacijski, antimutageni i protuupalni potencijal. Udio klorofila u klijancima brokule u ranijim je radovima najčešće analiziran zajedno s ukupnim udjelom karotenoida, pri čemu su zabilježene vrijednosti od 738 do 850 mg na 100 g suhe mase (140).

### 2.5.3. Utjecaj temperature uzgoja na sadržaj glukozinolata u klijancima brokule

Razina glukozinolata u biljci pod utjecajem je genotipa, razvojnog stadija i okolišnih čimbenika (1). Kako je ranije navedeno, kada su tkiva kupusnjača mehanički oštećena, enzim mirozinaza dolazi u kontakt s glukozinolatima i hidrolizira ih u razgradne produkte s biološkim učinkom (26). Ovo je dio obrambenog sustava biljke usmjeren protiv biljojeda i patogena, ali sličan se mehanizam odvija i prilikom rasta u uvjetima temperaturnog stresa. Naime, u takvim uvjetima može doći do oštećenja membranskih struktura, kontakta mirozinaze i glukozinolata te posljedičnog oslobađanja reaktivnih spojeva poput izotiocijanata. Ovo je jedan od najjednostavnijih mehanizama putem kojeg visoka temperatura okoline može dovesti do preuranjene razgradnje glukozinolata, pri čemu se dio nastalih izotiocijanata dodatno termički degradira u spojeve s nižom ili promijenjenom biološkom aktivnošću, pa se ukupni funkcionalni potencijal biljke u trenutku konzumacije smanjuje. Isto tako, promjena temperature okoline može utjecati na ekspresiju gena uključenih u sintezu glukozinolata (1). Globalne transkripcijske analize u kineskom kelju (*Brassica alboglabra*) pokazale su da toplinski stres dovodi do smanjenja ekspresije 11 gena povezanih s biosintezom glukozinolata, uz istovremeno povećanje izražaja 23 transkripcijskog faktora toplinskog šoka i 61 proteina toplinskog šoka (141). Promjena genske ekspresije ogleda se i kroz promjene proteina u klijancima. Tijekom toplinskog stresa proteini su podvrgnuti brojnim post-translacijskim modifikacijama, koje u konačnici utječu na njihovu funkciju, lokalizaciju, interakciju s drugim molekulama, kao i na njihovu stabilnost. U više je istraživanja utvrđeno kako klijanci brokule uzgajani pri visokoj temperaturi imaju značajno niže razine ukupnih proteina u odnosu na klijance koji su uzgajani pri sobnoj temperaturi okoline. Jedan od mogućih razloga zašto je visoka temperatura uzgoja povezana s nižom stopom sinteze proteina u biljci je i manja dostupnost aktivne mRNA (1). Promjene u ekspresiji gena predstavljaju složen mehanizam odgovora biljnog organizma na stres, gdje se resursi preusmjeravaju kako bi se biljka prilagodila okolišnim uvjetima, što posljedično utječe na nutritivni profil i biološku aktivnost biljnih ekstrakata (1)

Dakle, većina istraživanja koja su proučavala učinak temperature uzgoja na udio glukozinolata u brokuli, pokazala je kako visoka temperatura pogoduje smanjenju udjela glukozinolata. Štoviše, Šola i suradnici (1) pronašli su 18%-tno smanjenje udjela glukozinolata u ekstraktima mikropovrća brokule uzgajanih pri visokoj temperaturi (38 °C dan/33 °C noć) i čak 20%-tno povećanje udjela glukozinolata u ekstraktima mikropovrća uzgajanim pri niskoj temperaturi okoline (12 °C dan/7 °C noć), u odnosu na mikropovrće koje je uzgajano pri sobnoj temperaturi (23 °C dan/ 18 °C noć) (1). Gmižić i suradnici (4) zabilježili su 40 %-tno smanjenje udjela glukozinolata u klijancima brokule uzgajanim pri

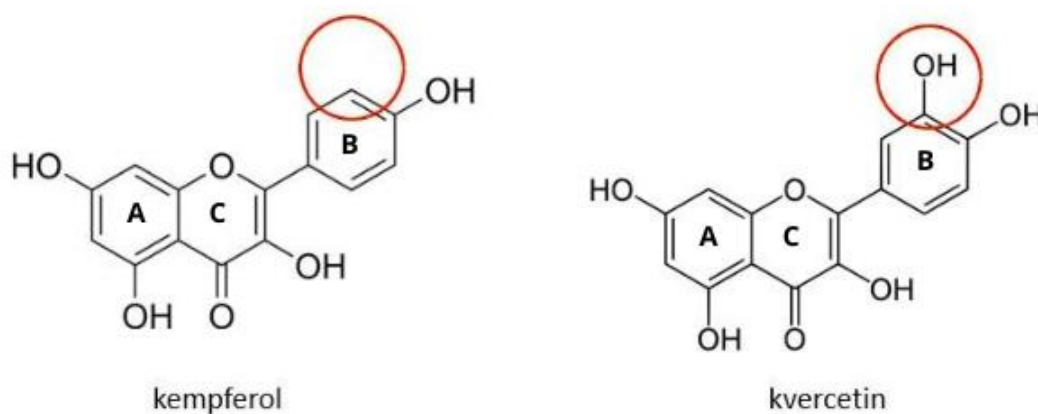
visokoj temperaturi. Rodriguez i suradnici pronašli su nižu razinu glukozinolata u brokuli uzgajanoj pri temperaturi od 30 °C, u odnosu na temperaturu od 20 °C (142). Ipak, nisu sva istraživanja pronašla identične rezultate. Ragusa i suradnici (137) naglašavaju da povišenje temperature uzgoja može pozitivno utjecati na udio glukozinolata u klijancima brokule, što se djelomično objašnjava bržim rastom biljke pri višoj temperaturi, a prema nekim istraživanjima izlaganje visokim temperaturama može dovesti do pojačane akumulacije viših alifatskih glukozinolata (143). Na tragu navedenog, neki autori su istaknuli važnost duljine trajanja temperaturnog stresa, navodeći kako kratkotrajna visoka temperatura (60 °C tijekom 24 h) povećava udio alifatskih glukozinolata u klijancima brokule starima 3, 5 i 7 dana (141). Izgledno je kako postoje određene temperature uzgoja pri kojima se mogu postići najviše razine glukozinolata u biljci. Tako su Guo i suradnici (144) ustanovili da je najveći udio glukorafanina i sulforafana u klijancima brokule koji su uzgajani na srednjoj temperaturi (oko 25 °C) okoline, a niža (20 °C) i viša (30 °C) temperatura uzgoja rezultirale su nižim udjelom ovih glukozinolata. Također, postoje jasne, ponekad i velike razlike, u udjelu glukozinolata između različitih kultivara brokule, kao i razlike u njihovu odgovoru na povišenu temperaturu okoliša (6). Općenito, može se reći da promjena sadržaja glukozinolata kao odgovor na visoku temperaturu uzgoja nije uvijek jednostavna, a osim o prirodi temperaturnog stresa (visina temperature, duljina trajanja), ovisi i o razvojnoj fazi same biljke.

#### 2.5.4. *Utjecaj temperature uzgoja na sadržaj polifenola u klijancima brokule*

Metabolizam polifenola jedan je od metaboličkih odgovora na stres s pomoću kojeg se biljka prilagođava nepovoljnim uvjetima okoline. Polifenoli imaju jaki antioksidacijski kapacitet, koji je esencijalan za čišćenje reaktivnih kisikovih radikala koji se proizvode u periodima abiotičkog stresa, kao što je primjerice visoka temperatura uzgoja. Prilagođavajući razinu polifenola, biljke mogu pojačati svoju otpornost, zaštititi stanične komponente i optimizirati iskorištavanje resursa kako bi se izborile s izazovnim temperaturnim uvjetima okoliša (1). Za razliku od glukozinolata, gdje je učinak visoke temperature na njihov sadržaj uglavnom negativan, kod polifenola je riječ o nešto složenijoj interakciji uzgojne temperature i njihovog sadržaja u brokuli. Dok je u jednom istraživanju zabilježeno smanjenje udjela svih skupina polifenola u klijancima brokule prilikom uzgoja na visokoj temperaturi (1), u drugom je zabilježeno čak 45 %-tno povećanje udjela ukupnih fenola, uz diferencijalno smanjenje udjela određenih skupina polifenola (4). Važno je istaknuti ključnu metodološku razliku - u

radu Gmižić i sur. (4) uspoređivane su kontrolne i tretirane biljke u istom razvojnome stadiju, dok su u radu Šola i sur. (1) analizirane biljke iste starosti, pri čemu je viša temperatura uzgoja ubrzavala razvoj, pa su tretirane biljke u trenutku analize bile u naprednijem stupnju razvoja od kontrolnih.

Ragusa i sur. (137) zabilježili su da visoka temperatura klijanja pozitivno utječe na udio polifenola, pri čemu su sinapoil derivati, kao glavna skupina polifenola, značajno porasli kada su klijanci uzgajani pri 30 °C u usporedbi s temperaturama uzgoja od 10 °C ili 20 °C. Ovo se povećanje protumačilo kao odgovor biljnog metabolizma na stres izazvan visokom temperaturom, što potiče biosintezu novih fenolnih spojeva. Slično tome, u glavama brokule skladištene na temperaturi od 20 °C zabilježen je veći udio fenola u usporedbi s onim glavama koje su skladištene na temperaturi od 5 °C (137). Slično kao i kod glukozinolata, povišenje temperature uzgoja ne utječe jednako na sve polifenole, što je izgledno povezano i sa samom strukturom spoja. Primjerice, visoka temperatura uzgoja dovela je do rekordnog, 390%-tnog, povećanja flavonoida kvercetina u klijancima brokule. To je zanimljiv nalaz budući da u klijancima brokule najzastupljeniji flavonoid nije kvercetin, već kempferol, kojeg se može pronaći i u 12 puta višim koncentracijama od kvercetina, ali se njegova koncentracija pod utjecajem visoke temperature uzgoja ne mijenja značajno (1). Usporedba kemijske strukture kvercetina i kemferola otkriva kako kvercetin ima jednu hidroksilnu skupinu više na svojem B prstenu od kemferola (145), što doprinosi njegovom većem značaju u obrani protiv visoke temperature (1) (**Slika 10.**). Naime, antioksidacijski kapacitet fenola je ponajviše povezan s brojem hidroksilnih skupina i što je on veći, jači je i učinak protiv slobodnih kisikovih radikala. Zbog toga, iako je kempferol udjelom dominantan flavonoid u klijancima brokule, pod utjecajem visoke temperature biljni organizam povisuje udio flavonoida s većim antioksidacijskim kapacitetom, u ovom slučaju kvercetina (1).



**Slika 10.** Usporedba kemijske strukture kemferola i kvercetina. Na B prstenu kvercetin ima dodatnu hidroksilnu skupinu. Prilagođeno prema Jan i sur (145).

Šola i suradnici (146) zaključili su kako niska temperatura uzgoja uglavnom pogoduje povećanju slobodnih i esterificiranih oblika polifenola u brokuli, dok visoka temperatura uzgoja pridonosi povećanju glikoliziranih oblika, s odgovarajućim učinkom na antioksidacijski potencijal. Diferencijalno povećanje topljivih naspram netopljivih oblika polifenola navodi na zaključak da se mikropovrće brokule pri temperaturnom stresu prilagođava preusmjeravanjem polifenola prema ulogama medijatora biokemijskih puteva u održavanju redoks ravnoteže, a ne primarno prema njihovoj strukturnoj ulozi u jačanju biljnog tkiva (146). Sveukupno, ovi rezultati naglašavaju da je reakcija klijanaca brokule na toplinski stres složena i može uključivati istovremeno povećanje ukupnih fenola zbog nakupljanja određenih spojeva, dok se drugi specifični polifenoli mogu smanjiti. Svakako, promjena temperature uzgoja podrazumijeva i obilgatnu kvantitativnu i kvalitativu promjenu sastava polifenola u klijancima brokule.

## 2.6. *Djelovanje klijanaca brokule na kardiovaskularni sustav*

Klijanci brokule i njihovi bioaktivni spojevi pokazuju brojne pozitivne zdravstvene učinke. U posljednjem desetljeću, povoljni učinci, uključivši antioksidacijsko, antikancerogeno, antimikrobno i protuupalno djelovanje, široko su istraživani u stanovitom broju *in vitro* i *in vivo* istraživanja, kao i u kliničkim istraživanjima. Generalno gledajući, pozitivne učinke na zdravlje klijanci brokule ponajviše duguju dvjema velikim skupinama bioaktivnih spojeva u njima – glukozinolatima i polifenolima (5). U nastavku ovog poglavlja bit će stavljen naglasak na istraživanja koja su u eksperimentalnom dizajnu koristila klijance brokule u različitim oblicima, dok se o općenitom učinku glukozinolata sadržanih u klijancima brokule može pročitati u ranijim poglavljima literaturnog pregleda.

### 2.6.1. *Djelovanje na hematološke parametre*

Dosadašnja istraživanja pokazala su da su različiti pripravci klijanaca brokule u mogućnosti povoljno djelovati na osnovne hematološke parametre. Štoviše, dokazalo se da

moгу umanjiti negativan učinak hematotoksičnih lijekova, poput imunosupresiva ciklosporina. Učinak se pogotovo ogledao u sprječavanju reaktivne trombocitoze, čime su se klijanci brokule istakli po svojem antitrombocitnom učinku (147). Antritrombocitni učinak dokazan je i u istraživanjima na ljudima, gdje se pokazalo da konzumacija klijanaca brokule može imati trenutni učinak na smanjenje sposobnosti agregacije trombocita (148). Iako bi se ovakav antitrombocitni učinak tradicionalno povezivao s djelovanjem polifenola, izglednije je da je ipak posljedica sinergijskog djelovanja glukozinolata i polifenola. Obje skupine spojeva putem hidroksilnih skupina inhibiraju NF- $\kappa$ B p65 aktivaciju, ekspresiju P-selektina i sintezu tromboksana B<sub>2</sub>, a smanjuju i aktivnost fosfodiesteraze uz posljedično sniženje cAMP-a u trombocitima (149). Dodatno, polifenoli reduciraju trombocitnu aktivaciju inhibicijom COX-1 i modulacijom NADPH oksidaze (128). Za razliku od klijanaca srodnih kupusnjača, kao što je rutbaga, za koje je u nekim istraživanjima dokazano hematotoksično djelovanje (150), klijanci brokule uglavnom imaju povoljno djelovanje na hematološke parametre (151).

#### *2.6.2. Učinak na arterijsku hipertenziju i ateroskleroze*

Meta-analiza je pokazala kako ekstrakti klijanaca brokule imaju jasno antihipertenzivno djelovanje, za koje su najčvršći dokazi pronađeni u animalnim modelima. Povoljno djelovanje klijanaca brokule na arterijsku hipertenziju ponajviše se pripisuje djelovanju istaknutih glukozinolata i izotiocijana, glukorafanina i sulforafana, i to njihovom antioksidacijskom djelovanju. Sulforafan može poticajno djelovati na enzime metabolizma faze faze II, čime smanjuje oksidacijsko oštećenje stanica glatkih mišića u krvnim žilama. Sulforafan također povećava postojeći sadržaj spojeva nastalih konjugacijom s glutationom te posljedično mijenja aktivnost glutation-reduktaze i glutation-peroksidaze, a te su promjene povezane s boljim opuštanjem (relaksacijom) aorte i značajnim sniženjem krvnog tlaka (152). U jednom je istraživanju tromjesečna suplementacija klijancima brokule, u pacijenata s dijabetesom tipa II, značajno smanjila vrijednosti krvnog tlaka, kao i razinu hs-CRP-a, ključnog sistemskog biljega upale, koji je usko povezan s rizikom od nastanka kardiovaskularnih bolesti (153). Jedan od mehanizama kojim klijanci brokule ostvaruju svoje protektivno djelovanje na razvoj i napredovanje ateroskleroze je zasigurno pozitivan učinak na metabolizam lipida, čija je disregulacija jedan od ključnih etiopatogenetskih događaja u razvoju tog procesa (5). U jednom je istraživanju suplementacija prahom klijanaca brokule rezultirala značajnim smanjenjem serumskih triglicerida, omjera OX-LDL/LDL, kao i AIP-a

(eng. *atherogenic index of plasma*) u preko 70 pacijenata sa šećernom bolesti tipa II. Dodatni mehanizam putem kojeg klijanci mogu pozitivno djelovati na metabolizam lipida izgledno je povezan sa sposobnosti sulforafana u indukciji signalnog puta Nrf2, koji pak proizvodi inhibitorni učinak na stanoviti broj gena uključenih u glukoneogenezu i lipogenezu, tako pozitivno djelujući na pretilost i šećernu bolest (154). Osim pozitivnog djelovanja na metabolizam lipida, klijanci brokule djeluju protektivno na endotelne stanice krvnih žila. Prehrana klijancima brokule, kao aktivatora signalnog puta Nrf2, u spontano hipertenzivnih štakora reducirala je prisutnost intraluminalnih upalnih stanica vidljivih na histopatološkoj analizi, što je koincidiralo sa smanjenom pojavnosti hipertenzije (155). Također je dokazano da vodeni ekstrakti klijanaca brokule inhibiraju formiranje složenih glikacijskih produkata (eng. *advanced glycation end products*, AGE) i smanjuju upalnu reakciju u endotelnim stanicama. Također dovode do smanjenog bazalnog izražaja gena za MCP-1 (eng. *monocyte chemoattractant protein-1*), ICAM-1 i receptora za AGE (RAGE) te pojačavaju razine mRNA za eNOS u endotelnim stanicama (156). Iako nisu razjasnili koji su spojevi u klijancima točno povezani s opaženim učincima, općenito se može reći da klijanci brokule, kao funkcionalna namirnica, ostvaruju svoje protektivno djelovanje na endotel. Noble i suradnici proučavali su učinak kronične primjene klijanaca brokule na kardiometaboličko zdravlje i životni vijek Long-Evans štakora. Rezultati su pokazali kako je prehrana klijancima brokule značajno produljila životni vijek ženskih štakora, a u mužjaka je učinak bio vidljiv u manjoj skupini živućih muških štakora (zadnjih 25% preživjelih). Ustanovljeni su i učinci ovisni o spolu – dok je u ženki zabilježen značajan povoljan učinak na smanjenje tjelesne mase i visceralni adipozitet, u mužjaka je došlo do poboljšanja tolerancije glukoze i smanjenja krvnog tlaka u odnosu na kontrolu (157).

### 2.6.3. Učinak na miokard

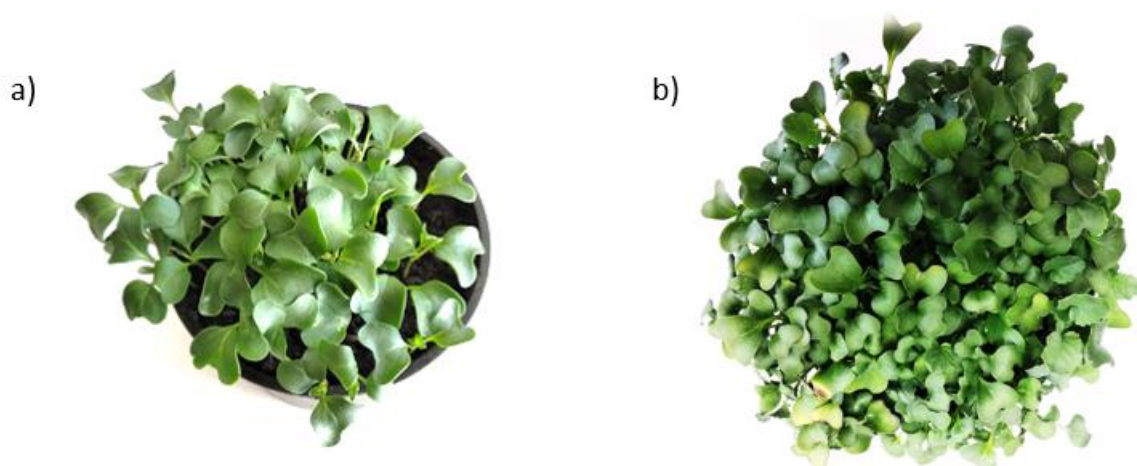
Dosadašnja istraživanja potvrdila su kardioprotektivno djelovanje klijanaca brokule. U životinjskim modelima ishemije/reperfuzije miokarda primjena ekstrakata klijanaca brokule rezultirala je smanjenjem markera nekroze miokarda (LDH, CK), kao i smanjenjem volumena infarkta (10). Ekstrakti klijanaca brokule u visokoj dozi imaju antifibrotski učinak na miokard, što je vidljivo kroz utjecaj na akumulaciju kolagena u miokardu i učinak na CTGF (eng. *connective tissue growth factor*) (158). Čak vrlo kratkotrajna prehranbena intervencija (kroz 10 dana) klijancima brokule rezultirala je 82-116 %-tnim smanjenjem biljega

oksidacijskog stresa u miokardu štakora (10). U mišjem modelu kombinacija ekstrakata klijanaca brokule i cinka pružila je značajnu zaštitu miokardu od kardiomiopatije inducirane intermitentnom hipoksijom, što je bilo vidljivo kroz poboljšanja utvrđena ehokardiografijom i patohistološkom analizom bioptata miokarda, s ocjenom stupnja fibroze, upale i oksidacijskog oštećenja. Smatra se da je takav učinak posljedica sinergijskog djelovanja na singalni put Nrf2 (159). S obzirom na visoku koncentraciju sulforafana u klijancima brokule, pojedini autori navode usporedivost učinka klijanaca brokule i 'čistog' sulforafana, pogotovo na aktivaciju Nrf2 (159). U jednom je istraživanju dokazano kako ekstrakti klijanaca brokule obogaćeni sulforafanom štite miokard štakora od akutnog srčanog stresa. Osim što je suplementacija ekstraktima klijanaca brokule rezultirala smanjenjem simpatičke i povećanjem parasimpatičke modulacije miokarda štakora, uspjela je gotovo u potpunosti poništiti četverostruki porast incidencije aritmija, uzrokovanih primjenom simpatomimetika, izoproterenola (160). Prehrana klijancima brokule u mišjem je modelu rezultirala značajno sniženim oksidacijskim stresom u organima kardiovaskularnog sustava, uključivši i miokard, vidljivo kroz povišen sadržaj GSH, smanjenu razinu oksidiranog GSH, kao i pojačanu aktivnost GSH reduktaze i GSH peroksidaze (155). Opsežnom pretragom literature nismo pronašli istraživanja koja su opisivala kardiotoksično djelovanje klijanaca brokule u animalnim modelima.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. *Klijanci brokule*

U pokusu su korišteni klijanci uzgojeni iz sjemenki brokule (*Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* Alef. var. *cymosa* Duch.), koje su kupljene od tvrtke International Seeds Processing GmbH. Prije klijanja, sjemenke su sterilizirane 2,55%-tnom vodenom otopinom Izosana® tijekom 20 minuta, nakon čega su nekoliko puta temeljito isprane autoklaviranom vodom kako bi se u potpunosti uklonio dezinficijens. Klijanje sjemenki je provedeno u specijaliziranoj klimatskoj komori FitoClima 600 PLH, pod strogo kontroliranim uvjetima temperature, vlažnosti i svjetla. Klijanje je provedeno u mraku tijekom 5 dana pod uvjetima 23 °C u trajanju od 16 h i 18 °C u trajanju od 8 h. Nakon što su sjemenke proklijale, klijanci su podijeljeni u dvije eksperimentalne skupine. Kontrolna je skupina dalje kultivirana tijekom 7 dana pod uvjetima 23 °C-16 h-dan/18 °C-8 h-mrak, dok je testna skupina kultivirana isti broj dana pod uvjetima 38 °C-16 h-dan/33 °C-8 h-mrak (**Slika 11.**). Vlažnost je bila 65% u svim skupinama. Kultivacija je ponovljena tri puta kako bi se dobile tri biološke replike. Nadzemni dijelovi klijanaca sakupljeni su sterilnim škarama te su odmah zamrznuti u tekućem dušiku i osušeni u liofilizatoru proizođača Alpha 1-4 LSCbasic. Nakon liofilizacije, biljno tkivo je usitnjeno u prah i pohranjeno na tamnom, suhom i hladnom mjestu do kemijskih analiza i upotrebe.



**Slika 11.** Klijanci brokule uzgojeni pri: a) 23 °C, b) 38 °C (Vlastita fotografija).

### 3.2. Eksperimentalne životinje i etička izjava

Istraživanje je provedeno na miševima iz jedinice za uzgoj laboratorijskih životinja Zavoda za animalnu fiziologiju na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Pokusne životinje bile su miševi soja Swiss albino, starosti 3 mjeseca. U istraživanje je ukupno bilo uključeno 40 životinja, 20 mužjaka i 20 ženki. Od početka istraživanja životinje su držane u standardnim uvjetima (5 miševa po kavezu, 12 sati svjetla/12 sati tame pri 22 °C i 60% vlažnosti) uz neograničen pristup hrani i vodi *ad libitum*. Hrana kojom su hranjeni miševi je standardna hrana za miševe (standard diet GLP, 4RF21, Mucedola, Settimo Milanese MI, Milano, Italy) čiji je sastav prikazan u Tablici 1. Pokuse je odobrilo Etičko povjerenstvo Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu (broj odobrenja: 251-58-10617-14-21, datum odobrenja: 13. Siječnja 2021.). Održavanje i njega pokusnih životinja provedeni su u skladu sa smjernicama koje su na snazi u Republici Hrvatskoj (Zakon o zaštiti životinja, NN 102/17; Zakon o izmjenama i dopunama Zakona o zaštiti životinja, NN 37/13; Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe, NN 55/13) te u skladu s preporukama iz vodiča *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (DHHS (NIH) Publ. 86-23, National Research Council, 2013).

Tablica 1. Sastav Mucedola standardne hrane za miševe i štakore

Sastav standardiziranog peleta u prehrani laboratorijskih miševa i štakora	Analitičke komponente i dodaci prehrani
pšenica	12% vlage
pšenična slama	18,5% proteina
ljuske lješnjaka	3% masti
kukuruz	6% sirovih vlakana, 7% sirovog pepela
sojino zrno	E672 (vitamin A)
kukuruzni gluten	E671 (vitamin E)
riblji ekstrakt	E1 (Fe)
dikalcijev fosfat	E2 (I)
natrijev klorid	E3 (Co)
sir u prahu	E4 (Cu)
sojino ulje	E5 (Mn)
kvasac	E6 (Zn)

### 3.3. *Pripravci korišteni u pokusu*

1. Fiziološka otopina (F.O.) (Natrii chloridi infundibile, B. Braun Adria d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
2. Vodena otopina komercijalnog sinigrina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) pripravljena je otapanjem u pročišćenoj vodi (*aqua pro*) (B. Braun Adria d.o.o., Croatia) i primijenjena u dozi 10 mg/kg tjelesne mase životinje.
3. Vodena otopina ekstrakta klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23$  °C, primjenjena u dozi od 300 mg/kg tjelesne mase životinje.
4. Vodena otopina ekstrakta klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 38$  °C, primjenjena u dozi od 300 mg/kg tjelesne mase životinje.

### 3.4. *Priprema i određivanje kvantitativnog i kvalitativnog sastava vodenih ekstrakata klijanaca brokule*

Ekstrakti klijanaca brokule pripremljeni su iz liofiliziranog biljnog materijala u prethodno zagrijanoj deioniziranoj vodi na 100 °C u koncentraciji od 30 mg/mL. Biljni materijal i otapalo inkubirani su 60 minuta na digitalnom rotatoru za epruvete pri 20 okretaja/min i sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani pri 11 000 okretaja/min tijekom 10 minuta pomoću centrifuge MIKRO 220. Tekući supernatanti pažljivo su odvojeni i zamrznuti na -20 °C do daljnje analize. Materijal je uključivao tri biološke replike (tri odvojene skupine uzgojene pod istim uvjetima), a iz svake biološke replike odvagane su tri tehničke replike.

Koristeći odgovarajuće spektrofotometrijske metode, određena je koncentracija ukupnih fenolnih spojeva, flavonoida, flavonola, fenolnih kiselina, hidroksicimetnih kiselina i glukozinolata u ekstraktima brokule na čitaču mikropločica FLUOstar OPTIMA. Ukupni fenolni spojevi određeni su metodom s Folin-Ciocalteu reagensom pri  $\lambda = 740$  nm, kako je opisano u Šola i suradnici (1). Ukupni flavonoidi mjereni su pri  $\lambda = 520$  nm prema Zhishen i suradnici (161). Ukupne fenolne kiseline analizirane su prema Wabaiduru i sur. pri  $\lambda = 485$  nm (162). Ukupne hidroksicimetne kiseline i flavonoli analizirani su kao u Gmižić i suradnicima (4)  $\lambda = 320$  nm, odnosno  $\lambda = 355$  nm.

Sve kemikalije i reagensi korišteni u eksperimentima dobavljeni su od tvrtke Sigma

Aldrich GmbH, osim ako nije drugačije navedeno. Standardi flavonoida i fenolnih kiselina bili su HPLC čistoće i kupljeni su ili od tvrtke Sigma Aldrich GmbH ili od tvrtke Extrasynthese.

### 3.5. *Eksperimentalni dizajn*

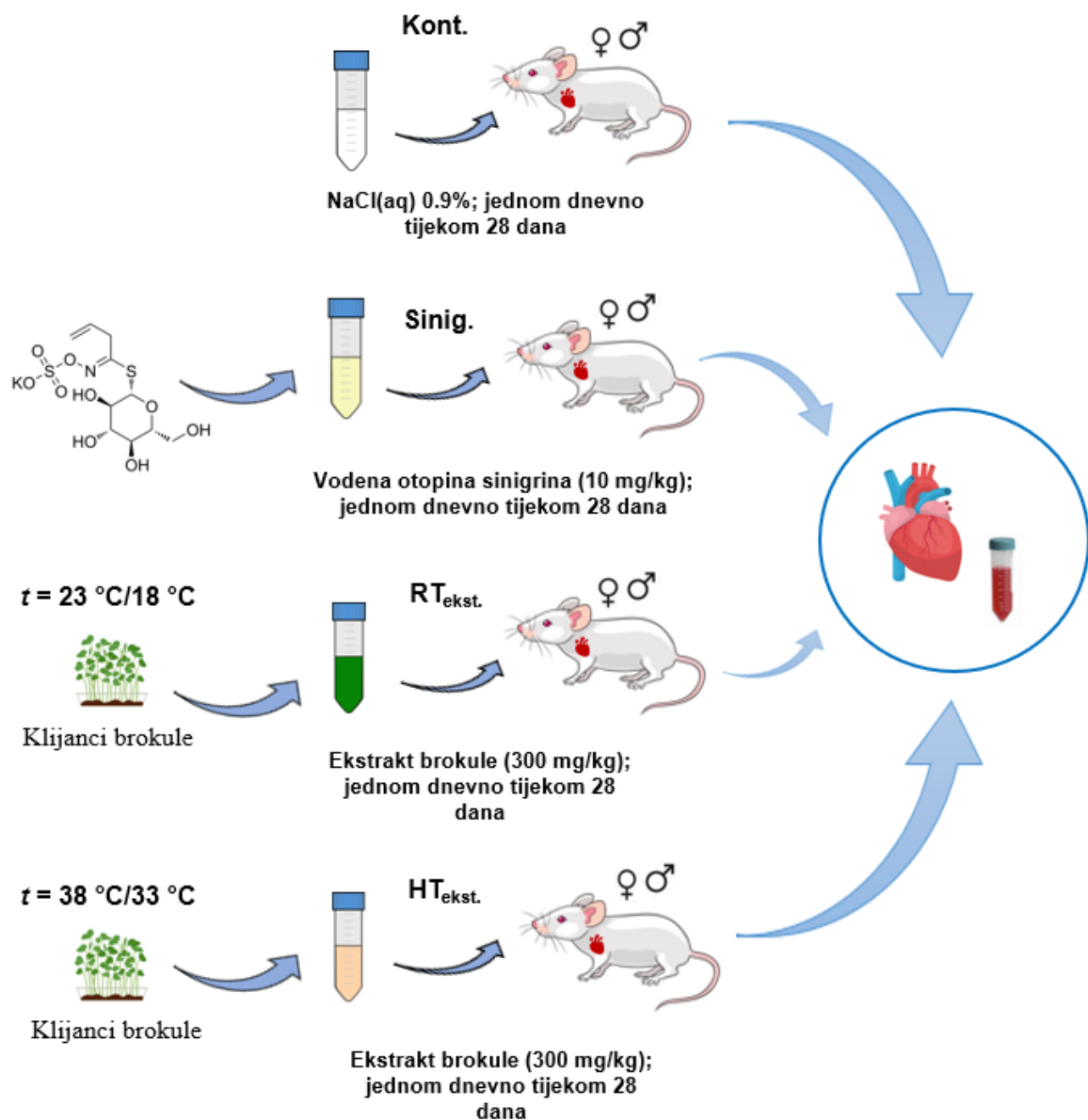
Životinje su prije početka pokusa, kao i tijekom pokusa pojedinačno označene i vagane digitalnom vagom ABS 220-4 (Kern Sohn, Balingen, Njemačka) te su prema spolu raspoređene u eksperimentalne skupine s ciljem postizanja slične raspodjele tjelesne mase (tjelesna masa  $25 \pm 2$  g). Svaka pokusna skupina sastojala se od 10 životinja, s jednakom raspodjelom spolova (5 mužjaka i 5 ženki po skupini). Doza pojedinačnih pripravaka primjenjivanih tijekom pokusa određivala se prema tjelesnoj masi životinja. Odabrana doza od 300 mg/kg tjelesne mase za vodene ekstrakte klijanca brokule temeljila se na smjernici OECD Test Guideline 423 (Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method), koja preporučuje 300 mg/kg kao početnu dozu u odsutnosti prethodnih podataka o ispitivanoj tvari, prvenstveno zbog dobrobiti životinja. Odabrana doza sinigrina od 10 mg/kg tjelesne mase temeljena je na prethodnim istraživanjima s animalnim modelima u kojima je evidentiran biološki učinak, bilo zaštitni ili modulacijski (163-166). Spomenuta doza također odgovara realnoj, odnosno lako ostvarivoj dozi za ljude u svakodnevnoj prehrani, gdje je 10 mg/kg tj.m. ekvivalentno (eng. *Human Equivalent Dose*, HED) 0.81 mg/kg tj.m. za ljude (dobiveno tako što se mišja doza podijeli s faktorom korekcije od 12,3) (167).

Tijekom provedbe pokusa, životinje su jednom dnevno, tijekom 28 dana, intragastričom (*ig*) primjenom dobivale pojedine pripravke peroralno korištenjem gastralne kanile. Skupine ( $n=10$ ) i način tretmana životinja navedene su kako slijedi (**Slika 12.**):

- Kont. – kontrolna skupina (0,3 mL fiziološke otopine)
- Sinig. – skupina tretirana vodenom otopinom sinigrina (0,3 mL, 10 mg/kg tj.m. na dan)
- RT<sub>ekst.</sub> – skupina tretirana vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgojenih pri 23 °C (300 mg/kg tj.m. na dan)
- HT<sub>ekst.</sub> – skupina tretirana vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgojenih pri 38 °C (300 mg/kg tj.m. na dan)

Skupine s podjelom prema spolu (n=5):

- ženke (Kont.<sub>ž</sub>) i mužjaci (Kont.<sub>M</sub>) kontrolne skupine (0,3 mL fiziološke otopine)
- ženke (Sinig.<sub>ž</sub>) i mužjaci (Sinig.<sub>M</sub>) tretirani vodenom otopinom sinigrina (0,3 mL, 10 mg/kg tj.m. na dan)
- ženke (RT<sub>ekstr.ž</sub>) i mužjaci (RT<sub>ekst.M</sub>) tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgojenih pri 23 °C (300 mg/kg tj.m. na dan)
- ženke (HT<sub>ekstr.ž</sub>) i mužjaci (HT<sub>ekst.M</sub>) tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgojenih pri 38 °C (300 mg/kg tj.m. na dan)



Slika 12. Shematski prikaz eksperimentalnog dizajna

Životinje su eutanazirane nakon 28 dana pokusa. Tijekom postupka eutanazije sve su životinje bile adekvatno anestetizirane i analgezirane intraperitonealnom (ip) primjenom kombinacije pripravaka Narketan® (Vetoquinol S.A., BP 189 Lure Cedex, Francuska; djelatna tvar: ketamin) i Xylapana® (Vetoquinol Biowet Sp., Gorzów Wielkopolski, Poljska; djelatna tvar: ksilazin) u dozi od 25 mg/kg tj. m.

### 3.6. *Uzorkovanje krvi i analiza hematoloških parametara*

Nakon adekvatnog anestetiziranja životinja, uzorci krvi prikupljeni su punkcijom krvi iz srca (kardiocenteza). Krv je prikupljena u vacutainer epruvete s antikoagulansom (EDTA). Od hematoloških parametara određivan je ukupni broj eritrocita (RBC), hematokrit (Hct), hemoglobin (Hb), prosječan volumen eritrocita (MCV), prosječan sadržaj hemoglobina u eritrocitima (MCH), prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC), raspodjela eritrocita po veličini (RDW), ukupan broj leukocita, ukupan broj trombocita i prosječan volumen trombocita (MPV). Hematološki parametri određivani su standardnim hematološkim metodama na automatskom elektroničkom brojaču Horiba ABX Micros 60 (Horiba ABX, Francuska), koji istodobno mjeri broj eritrocita, leukocita i trombocita, koncentraciju hemoglobina te izračunava eritrocitne indekse (MCV, MCH, MCHC) iz volumetrijskih i impedancijskih mjerenja.

### 3.7. *Priprava homogenata srčanog tkiva za mjerenje bioloških biljega*

Nakon prikupljene krvi, izolirano je srce koje je isprano u prethodno ohlađenom komercijalnom fosfatnom puferu (Lonza, Švicarska) kako bi se uklonila zaostala krv, a potom izvagano na analitičkoj vagi. Za određivanje metaboličkih, strukturnih, antiupalnih i antioksidacijskih parametara u srčanom tkivu, srčano tkivo je usitnjeno na manje dijelove, a potom homogenizirano u komercijalnom fosfatnom puferu u omjeru 1:10. Uzorci srčanog tkiva su sonificirani ultrazvučnim homogenizatorom (Bandelin Sonoplus HD2070, Bandelin, Germany), upotrebom sonde MS73, snagom od 10%. Uzorci su tkiva sonificirani u tri ciklusa po 30 sekundi uz stanku od 10 sekundi između ciklusa na +4 °C. Svi su postupci izvođeni na ledu. Sonificirani homogenati centrifugirani su 20 000 x g 15 minuta u ultracentrifugi Mikro 200R (Hettich, Germany) s hlađenjem na +4 °C. Dobiveni supernatanti korišteni su za trenutno mjerenje bioloških biljega ili su pohranjeni na -80 °C za daljne analize.

### 3.8. Određivanje koncentracije ukupnih proteina u tkivu miokarda

Koncentracija proteina u homogenatima tkiva miokarda je određena metodom po Lowryju (14). Metoda se temelji na dvije na dvije ključne kemijske reakcije: biuret reakciji i redukciji Folin-Ciocalteuovog reagensa. U biuret kemijskoj reakciji, divalentni ioni bakra se u alkalnim uvjetima vežu na amino skupne peptidnih veza proteina, pri čemu se  $\text{Cu}^{2+}$  ioni reduciraju u  $\text{Cu}^+$  ione uz nastajanje kompleksa  $\text{Cu}^+$ -protein. Dodatkom fosfomolidbenske i fosfovolframove kiseline (Folin-Ciocalteuovog reagens),  $\text{Cu}^+$ -proteinski kompleks i bočni ogranci aromatskih aminokiselina (tirozin i triptofan) reduciraju fosfomolidbensku i fosfovolframovu kiselinu u molidben i fosfovolfram plavilo, kompleks plavo-ljubičastog obojenja s maksimumom aporbancije pri  $\lambda = 600$  nm. Intenzitet boje direktno je proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku i mjeri se spektrofotometrijski pri  $\lambda = 600$  nm. Za određivanje nepoznate koncentracije proteina u uzorku, prethodno je napravljen baždarni dijagram. Kao standard je korišten albumin goveđeg seruma (eng. *bovine serum albumin*, BSA). Iz početne koncentracije BSA, 10 mg/mL pripremljen je niz otopina poznate koncentracije proteina u rasponu od 0 do 10 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%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  u  $\text{dH}_2\text{O}$ ; otopina C: 1% kalijev natrijev tartarat tetrahidrat u  $\text{dH}_2\text{O}$ ; 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 homogenata tkiva miokarda za određivanje koncentracije proteina po Lowry-u razrijeđeni su komercijalnim PBS-om 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. Vrijednosti aporbancija očitane su pri  $\lambda = 600$  nm na Tecan Infinite 200 microplate reader (Hamburg, Germany).

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

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

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

### 3.9. *Određivanje strukturnog parametra tkiva miokarda - visoko osjetljivog srčanog troponina I (hs-cTnI)*

Koncentracija hs-cTnI određena je kemiluminiscentnom metodom koja se temelji na tehnologiji imunoanalize luminescentnog kanaliziranja kisika (LOCI) pomoću UniCel DxI 600 imunološkog sustava (Beckman Coulter, Indianapolis, IN 46268, SAD). LOCI reagensi uključuju dva sintetska reagensa u obliku mikrosfera: mikrosfere obložene strptavidinom („Sensibeads”), koje sadrže fotosenzibilizirajuću boju te drugi tip mikrosfera („Chemibeads”), obložene drugim monoklonskim protutijelom protiv srčanog troponina I, a koje ujedno sadrže i kemiluminiscentnu boju. Uzorci su inkubirani s „Chemibeads” i biotiniziranim protutijelom protiv srčanog troponina I kako bi se formirali „sendvič” kompleksi mikrosfera–srčani TnI–biotinizirano protutijelo. Zatim su dodane „Sensibeads”, koje se vežu na biotin i tako stvaraju parove mikrosfera. Osvjetljavanje kompleksa pri  $\lambda = 680$  nm pokreće kemiluminiscentnu reakciju, a nastali signal mjereno je pri  $\lambda = 612$  nm. Nastali signal je izravno proporcionalan koncentraciji hs-cTnI u uzorku. Koncentracija hs-cTnI u srčanom tkivu izražena je kao  $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteina. Svi su uzorci homogenata tkiva miokarda napravljeni i mjereni u duplikatu, a u konačnom je izračunu koncentracije uzet u obzir faktor razrjeđenja.

### 3.10. *Određivanje koncentracije funkcionalnog parametra miokarda- atrijskog natriuretskog peptida (ANP)*

Koncentracija atrijskog natriuretskog peptida (ANP) je određena korištenjem kompleta Mouse ANP ELISA kit proizvođača ELK Biotechnology CO., Ltd. (Colorado, USA). Mjerenje je provedeno prema uputama proizvođača u homogenatima tkiva miokarda razrijeđenih s puferom za razrjeđivanje uzorka. Intenzitet promjene boje proporcionalan je koncentraciji ANP-a, a vrijednosti apsorbancija očitane su pri  $\lambda = 450$  nm na Tecan Infinite

200 microplate reader (Hamburg, Germany). Iz standardne krivulje ovisnosti aporbancija o koncentraciji standardne otopine ANP-a određena je jednadžba kalibracijske krivulje te su koncentracije ANP-a u tkivu miokarda izražene u pg/mg proteina. Svi su uzorci homogenata tkiva miokarda napravljeni i mjereni u duplikatu, a u konačnom je izračunu koncentracije uzet u obzir faktor razrjeđenja.

### 3.11. *Određivanje koncentracije metaboličkih parametara u tkivu miokarda*

#### 3.11.1. *Određivanje koncentracija irizina i adropina*

Koncentracije adropina i irisina određene su korištenjem kompleta Mouse Adropin ELISA kit i Mouse Irisin ELISA kit proizvođača ELK Biotechnology CO., Ltd. (Colorado, USA), prema uputama proizvođača u homogenatima tkiva srca razrijeđenih s puferom za razrjeđivanje uzroka. Intenzitet promjene boje proporcionalan je koncentraciji adropina i irizina, a vrijednosti apsorbcija očitane su pri  $\lambda = 450$  nm na Tecan Infinite 200 microplate reader (Hamburg, Germany). Iz standardnih krivulja ovisnosti aporbancija o koncentraciji standardnih otopina adropina i irisina određene su jednadžbe kalibracijske krivulje te su koncentracije adropina u tkivu srca izražene u ng/mg proteina, a irisina u pg/mg proteina. Svi uzorci su napravljeni i mjereni u duplikatu, a u konačnom izračunu koncentracije je uzet u obzir faktor razrjeđenja.

#### 3.11.2. *Određivanje koncentracije peroksisomalne acil-CoA oksidaze 1 (ACOX1)*

Koncentracija ACOX1 je određena korištenjem kompleta Mouse ACOX1 ELISA kit proizvođača MyBioSource (San Diego, CA, USA), prema uputama proizvođača u homogenatima tkiva srca razrijeđenih s puferom za razrjeđivanje uzroka. Intenzitet promjene boje proporcionalan je koncentraciji ACOX1, a vrijednosti apsorbcija očitane su pri  $\lambda = 450$  nm na Tecan Infinite 200 microplate reader (Hamburg, Germany). Iz standardne krivulje ovisnosti aporbancija o koncentraciji standardne otopine ANP-a određena je jednadžba kalibracijske krivulje te su koncentracije ANP-a u tkivu miokarda izražene u ng/mL proteina. Svi su uzorci homogenata tkiva miokarda napravljeni i mjereni u duplikatu, a u konačnom je izračunu koncentracije uzet u obzir faktor razrjeđenja.

### 3.12. *Određivanje koncentracije upalnih parametara u tkivu miokarda*

#### 3.12.1. *Određivanje koncentracija matriks metaloproteinaza 2 i 9 (MMP-2, MMP-9) i pentraksina 3 (PTX-3)*

Koncentracije MMP-2, MMP-9 i PTX-3 određene su korištenjem kompleta Mouse MMP-2 ELISA kit, Mouse MMP-9 ELISA kit i Mouse PTX3 ELISA kit, proizvođača ELK Biotechnology CO., Ltd. (Colorado, USA). Sva mjerenja su provedena prema uputama proizvođača u homogenatima tkiva srca razrijeđenih s puferom za razrjeđivanje uzroka. Intenzitet promjene boje proporcionalan je koncentraciji MMP-2, MMP-9 i PTX3, a vrijednosti apsorbancija očitane su pri  $\lambda = 450$  nm na Tecan Infinite 200 microplate reader (Hamburg, Germany). Iz standardnih krivulja ovisnosti apsorbancija o koncentraciji standardnih otopina MMP-2, MMP-9 i PTX3 su određene jednadžbe pravca te su koncentracije MMP-2, MMP-9 i PTX3 u tkivu srca izražene u ng/mg proteina. Svi su uzorci homogenata tkiva miokarda napravljeni i mjereni u duplikatu, a u konačnom je izračunu koncentracije uzet u obzir faktor razrjeđenja.

#### 3.12.2. *Određivanje koncentracije dušikova(II) oksida (NO)*

Koncentracija NO mjerena je spektrofotometrijskom metodom prema Griessovom testu (15). Za mjerenje NO upotrijebljen je kit sa sustavom Griessova reagensa (Promega, Madison, WI, SAD). Sustav Griessova reagensa temelji se na kemijskoj reakciji između sulfanilamida (1-postotna otopina sulfanilamida otopljena u 5%-tnoj fosornoj kiselini) i *N*-(1-naftil)etilendiamin dihidroklorida (NED, 0,1%-tna vodena otopina *N*-(1-naftil)etilendiamin dihidroklorida), koja rezultira stvaranjem obojenih azo-spojeva. U svaku jažicu mikrotitarske pločice dodano je 50  $\mu$ L homogenata srčanog tkiva i 50  $\mu$ L otopine sulfanilamida, nakon čega je uslijedila inkubacija u trajanju od 10 minuta pri sobnoj temperaturi, u mraku. Nakon inkubacije, u reakcijsku je smjesu dodano 50  $\mu$ L otopine NED-a, a inkubacija je ponovljena još 10 minuta na sobnoj temperaturi, u mraku. Nakon te inkubacije (zabilježene vidljivim ružičastim obojenjem uzorka), apsorbancija je mjerena pri  $\lambda = 540$  nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica Tecan Infinite 200 (Tecan, Hamburg, Njemačka). Kao standard primijenjena je 0,1 mol/dm<sup>3</sup> vodena otopina natrijevog nitrita, u rasponu koncentracija od 0 do 100  $\mu$ mol/dm<sup>3</sup>. Iz standardne krivulje koja prikazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji nitrita određen je nagib pravca te je izračunata koncentracija nitrita, a posljedično i

dušikova(II) oksida, koja je izražena u  $\mu\text{mol/mg}$  proteina.. Svi su uzorci homogenata miokarda napravljeni i mjereni u duplikatu.

### 3.13. *Određivanje bioloških biljega oksidacijskog stresa u tkivu miokarda*

#### 3.13.1. *Određivanje koncentracije ukupnog glutaciona (tGSH)*

Koncentracija ukupnog glutaciona u uzorcima miokarda je određena prema modificiranoj metodi koju je opisao Tietze (1969). Metoda određivanja koncentracije ukupnog GSH se temelji na kemijskoj reakciji tiolnog reagensa 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeve kiseline (DTNB, Ellmanov reagens) i GSH pri čemu nastaje žuto obojeni kromofor 2-nitro-5-tiobenzoatne kiseline (NTB) i mala količina glutation disulfida (GSSG). Aporbancija uzoraka je očitana pri  $\lambda = 440$  nm na Tecan Infinite 200 microplate čitaču (Hamburg, Njemačka).

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

U pojedinu jažicu mikrotitarske pločice je dodano 20  $\mu\text{L}$  razrijeđenog uzorka miokarda, 40  $\mu\text{L}$  0,035 M HCl-a i 40  $\mu\text{L}$  otopine A. Nakon inkubacije od 10 minuta pri sobnoj temperaturi je izmjerena aporbancija (prvo mjerenje, DTNB). Nakon prvog mjerenja je dodano 100  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese B te je mjerena aporbancija 5 minuta u pravilnim vremenskim razmacima. Promjena aporbancije izračunata je prema formuli:

$\Delta A = A_{\text{bez enzima}} - A_{\text{s enzimom}}$ . Ukupna koncentracija GSH je izračunata prema izrazu:

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

gdje  $\varepsilon(\text{DTNB})$  iznosi  $8,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , a duljina kivete  $l$  iznosi 0,6 cm.  $d$  predstavlja faktor razrjeđenja uzorka. Koncentracija ukupnog glutaciona (tGSH) u uzrocima tkiva miokarda je izražena u mU/mg proteina.

#### 3.13.2. *Određivanje enzimatske aktivnosti katalaze*

Aktivnost katalaze u supernatantu miokarda je određena spektrofotometrijski metodom po Aebiju (1984) (18). U kiveti je pomiješano 980  $\mu\text{L}$  10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  i 20  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera, što predstavlja slijepu probu. U sljedećoj kiveti je pomiješano 20  $\mu\text{L}$  razrijeđenog uzroka miokarda i 980  $\mu\text{L}$  10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , čime započinje enzimski reakcija. Svaki je uzorak termostatiran pri 25 °C. Aktivnost enzima je mjerena jednu minutu pri  $\lambda = 240$  nm. Pad u apsorbanciji u jedinici vremena predstavlja mjeru aktivnosti katalaze, pri čemu je jedinica aktivnosti katalaze definirana kao količina enzima koja razgrađuje 1  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  u minuti pri pH = 7,0 i  $t = 25$  °C gdje koncentracija  $\text{H}_2\text{O}_2$  pada od 10,3 do 9,2 mM. Koncentracija katalaze je izračunata prema izrazu:

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

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 katalaze u uzrocima miokarda je izražena 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 katalaze po miligramu proteina (U KAT/mg proteina).

### 3.13.3. *Određivanje enzimske aktivnosti superoksid dismutaze (SOD)*

Aktivnost SOD-a je određena korištenjem kompleta Mouse T-SOD ELISA kit proizvođača MyBioSource (San Diego, USA). Mjerenje je provedeno prema uputama proizvođača principom metode WST-1 (Water Soluble Tetrazolium Salt-1) u kojoj ksantin oxidaza (XO) katalizira kemijsku reakciju između WST-1 i superoksidnog aniona pri čemu nastaje plavo obojeni WST-1-formazan. Aktivnost SOD-a proporcionalna je smanjenju razvoja boje. Apsorbancija uzoraka je očitana pri  $\lambda = 440$  nm na Tecan Infinite 200 microplate reader (Hamburg, Germany), a rezultati mjerenja su izraženi u U/mg proteina.

### 3.13.4. *Određivanje koncentracije malondialdehida (MDA)*

Koncentracija MDA, glavnog produkta lipidne peroksidacije, izmjerena je modificiranom metodom koju su opisali Ohkawa i suradnici (16). Kemijskom reakcijom MDA i tiobarbituratne kiseline (TBA) nastaje kromogen ružičaste boje koji je moguće mjeriti spektrofotometrijski.

U Eppendorf epruveti je pomiješano 200  $\mu\text{L}$  nerazrijeđenog supernatanta homogenata tkiva miokarda, 100  $\mu\text{L}$  8,1%-tne vodene otopine natrijeva dodecil sulfata (SDS-a), 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 zatim 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  $\lambda = 532 \text{ nm}$  korištenjem uređaja Tecan Infinite 200 microplate reader (Hamburg, Njemačka). Koncentracija MDA izračunata je prema formuli:

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

gdje  $\varepsilon$  kompleksa MDA-TBA iznosi  $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , a duljina kivete  $l$  iznosi 1 cm. Rezultati mjerenja su izraženi u nmol/mg proteina.

### 3.13.5. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta tkiva miokarda metodom FRAP

Test FRAP za homogenate tkiva proveden je prema metodi Katalinić i sur. (2005)(19), prilagođenoj za životinjske organe i modificiranoj u odnosu na izvorni test autora Benzie i Strain (1996) (20). FRAP reagens je pripremljen miješanjem acetatnog pufera (300 mM;  $\text{pH} = 3,6$ ), otopine 2,4,6-tri-2-piridil-s-triazina (TPTZ, 10 mM u 40 mM HCl) i željezova(III) klorida (20 mM) u omjeru 10:1:1. Smjesa je inkubirana 40 minuta pri 37  $^{\circ}\text{C}$ . 50  $\mu\text{L}$  nerazrijeđenog homogenata tkiva miokarda pomiješano je s 1.5 mL zagrijanog FRAP reagensa i 150  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ . Slijepa je proba pripremljena miješanjem 1.5 mL FRAP reagensa bez TPTZ i 200  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ , a kao kontrola (proba bez uzorka) korištena je smjesa 1.5 mL FRAP reagensa i 200  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ . Nakon 4 minute inkubacije, izmjerena je apsorbancija uzoraka pri  $\lambda = 593 \text{ nm}$  na Tecan Infinite 200 microplate reader (Hamburg, Germany). Kao standard je korištena vodena otopina željezova(II) sulfata heptahidrata u koncentraciji od 0-

1000  $\mu\text{M}$ . Rezultati redukcijske sposobnosti željeza u homogenatima tkiva miokarda izražena je kao  $\text{nmol Fe}^{2+}$  po mg ukupnih proteina.

### 3.13.6. *Određivanje antioksidacijskog kapaciteta tkiva miokarda metodom ABTS*

Otopina radikala ABTS ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ) pripremljena je oksidacijom 7 mM otopine  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  sa svježe pripremljenom otopinom 140 mM kalijeva peroksidisulfata, pomiješanih u omjeru 1:1. Na dan analize otopina je razrijeđena komercijalnim fosfatnim puferom ( $\text{pH} = 7,4$ ) (Lonza, Švicarska) i inkubirana na 30 °C tako da apsorbancija otopine iznosi 0,700 ( $\pm 0,020$ ). Za slijepu probu je korišteno 1 mL fostanog pufera, a kao kontrola (proba bez uzorka) 1 mL otopine  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  i 20  $\mu\text{L}$  fostatnog pufera. Kao standard je korištena vodena otopina Troloxa. Rezultati su izraženi u milimolima Trolox ekvivalenata po miligramu proteina u tkivnom homogenatu.

### 3.14. *Statistička analiza*

Za opis distribucije frekvencija istraživanih varijabli upotrijebljene su deskriptivne statističke metode. Sve varijable bile su testirane na normalnost distribucije Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Normalno distribuirane varijable izražene su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, a varijable koje se ne raspodjeljuju normalno izražene su kao medijan s interkvartilnim rasponom. Za utvrđivanje razlika između dvaju nezavisnih uzoraka bio je upotrijebljen Student  $t$ -test kao parametrijski, a za više od dva uzorka ANOVA, Kruskal Wallis kao neparametrijski test. Značajnost razlika utvrđenih statističkim testiranjem iskazana je na razini  $p \leq 0.05$ . U obradi podataka je korišten statistički paket STATISTICA 14 program (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, SAD). Svi grafički podaci prikazani su korištenjem softvera GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornija, SAD).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Spektrofotometrijske analize kvantitativnog sastava glukozinolata i različitih skupina polifenola u klijancima brokule uzgajanim pri različitim temperaturama okoliša

Rezultati spektrofotometrijskih analiza kvantitativnog sastava glukozinolata i različitih skupina polifenola u klijancima brokule uzgajanim pri različitim temperaturama okoliša prikazani su u **Tablici 2**. Visoka temperatura uzgoja ( $HT_{ekst.}$ ) značajno je promijenila udio ukupnih glukozinolata, fenola i fenolnih kiselina u klijancima brokule ( $p \leq 0,05$ ). Ukupni glukozinolati i fenolne kiseline smanjeni su redom za 28 % i 40%. Utjecaj na ukupne fenole bio je obrnut te se njihov udio povećao za 30 % ( $p \leq 0,05$ ). Učinak visoke temperature na ukupne flavonoide, hidroksicimetne kiseline i flavonole nije bio značajan ( $p > 0,05$ ).

**Tablica 2.** Učinak visoke temperature okoliša na udio glukozinolata i različitih skupina polifenola u klijancima brokule.

	$RT_{ekst.}$	$HT_{ekst.}$	$\Delta$ (%)
<b>GLS</b> (mg SinE/g sm)	$22.70 \pm 2.30^a$	$16.44 \pm 2.41^b$	-28
<b>TP</b> (mg GAE/g sm)	$8.10 \pm 2.08^b$	$10.52 \pm 2.36^a$	30
<b>TF</b> (mg QE/g sm)	$21.78 \pm 4.47^a$	$24.85 \pm 8.98^a$	14
<b>TPA</b> (mg CAE/g sm)	$2.91 \pm 0.54^a$	$1.73 \pm 0.61^b$	-40
<b>THCA</b> (mg CAE/g sm)	$5.52 \pm 0.1^a$	$5.96 \pm 0.79^a$	8
<b>TFlo</b> (mg QE/g sm)	$6.49 \pm 0.31^a$	$7.06 \pm 0.7^a$	9

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija od tri biološke i tri tehničke replike. <sup>a,b</sup> = različita slova unutar reda ukazuju na statistički značajnu razliku (Studentov t-test,  $p \leq 0,05$ ). sm = suha masa; RT = sobna temperatura ( $t = 23$  °C dan/18 °C noć); HT = visoka temperatura ( $t = 38$  °C dan/33 °C noć); CAE = ekvivalent kavene kiseline; GAE = ekvivalent galne kiseline; QE = ekvivalent kvercetina; SinE = ekvivalent sinigrina; GLS = ukupni glukozinolati; TP = ukupni polifenoli TF = ukupni flavonoidi; TPA = ukupne fenolne kiseline; THCA = ukupne hidroksicimetne kiseline; TFlo= ukupni flavonoli:  $\Delta$  (%) = postotna promjena koncentracije pri HT u odnosu na RT;

### 4.2. Učinak vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na hematološke parametre

Rezultati hematoloških parametara u kontrolnoj skupini i eksperimentalnim skupinama nakon 28. dana svakodnevne *ig* primjene vodenih ekstrakata klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23$  °C i  $t = 38$  °C prikazani su u **Tablici 3**. Analizom hematoloških parametara, statistički

značajno manje vrijednosti utvrđene su u prosječnom volumenu trombocita (MPV) eksperimentalnih skupina RT<sub>extr.</sub> i HT<sub>extr.</sub> u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p \leq 0,05$ ).

**Tablica 3.** Hematološki parametri u kontrolnoj i eksperimentalnim skupinama nakon 28 dana svakodnevne intragastrične primjene vodenih ekstrakata klijanaca brokule uzgojenih pri  $t = 23 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $t = 38 \text{ }^\circ\text{C}$ .

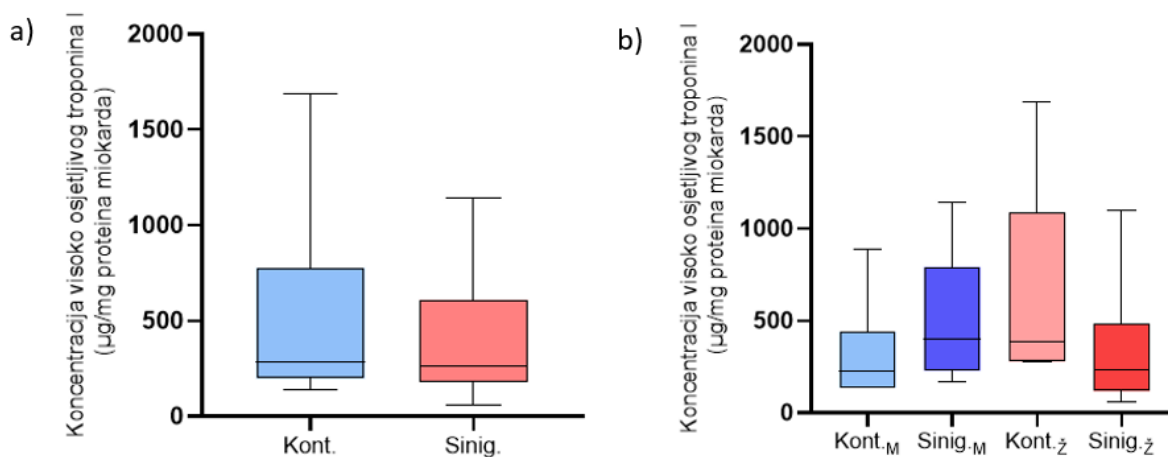
Hematološki parametar	Kontrola	RT <sub>extr.</sub>	HT <sub>extr.</sub>
Eritrociti ( $\times 10^{12}/\text{L}$ )	8,2 (6,3 – 9,2)	8,7 (6,3 – 9,5)	9,3 (6,5 – 9,4)
Hemoglobin (g/L)	122,5 (93,8 – 135,0)	130,0 (90,0 – 140,0)	135,0 (100,0 – 135,0)
Hematocrit (L/L)	0,4 (0,3 – 0,5)	0,4 (0,3 – 0,5)	0,5 (0,4 – 0,5)
MCV (fL)	55,4 (54,0 – 57,0)	55,8 (55,6 – 57,7)	57 (55,7 – 57,7)
MCH (pg)	14,85 (14,7 – 15,0)	14,7 (14,4 – 14,9)	14,6 (14,4 – 15,1)
MCHC (g/L)	267,0 (259,8 – 276,8)	264,0 (248,0 – 267,5)	262,0 (255,0 – 267,0)
RDW (%)	13,9 (13,4 – 14,2)	13,9 (13,5 – 14,2)	14,1 (13,5 – 14,4)
Leukociti ( $\times 10^9/\text{L}$ )	0,8 (0,5 – 1,2)	0,8 (0,4 – 1,0)	1,1 (0,8 – 1,5)
Trombociti ( $\times 10^9/\text{L}$ )	129,0 (106,5 – 154,0)	133,0 (102,0 – 140,0)	94,0 (86,75 – 124,0)
MPV (fL)	<b>7,2</b> (6,9 – 7,4)	<b>*6,8</b> (6,5 – 6,9)	<b>*6,8</b> (6,6 – 6,9)

Broj životinja po skupini ( $n = 10$ ). Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom. \*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $*p \leq 0,05$ ).

Kratice: *ig* – intragastrično, *Kont.* – kontrola, *RT<sub>ekst.</sub>* – ekstrakt klijanaca brokule uzgojenih pri  $t = 23 \text{ }^\circ\text{C}$ , *HT<sub>ekst.</sub>* – ekstrakt klijanaca brokule uzgojenih pri  $t = 38 \text{ }^\circ\text{C}$ , *MCV* – prosječan volumen eritrocita, *MCH* – prosječna količina hemoglobina u pojedinom eritrocitu, *MCHC* – prosječna koncentracija hemoglobina u 1 L eritrocita, *RDW* – širina distribucije eritrocita, *MPV* – prosječan volumen trombocita

#### 4.3. Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na strukturni parametar miokarda, *hs-cTnI*

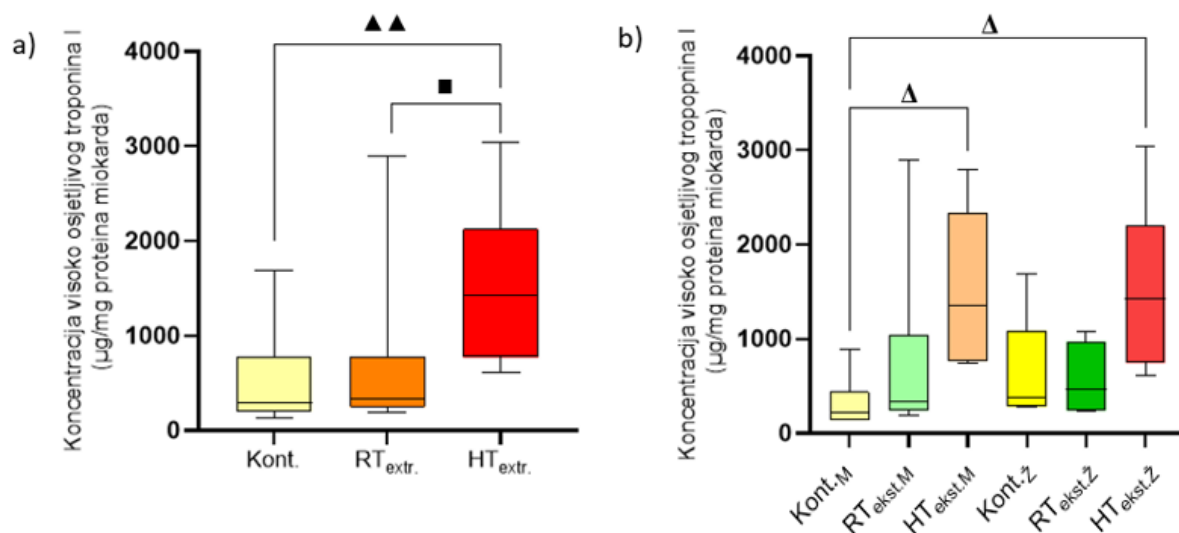
Analizom koncentracije *hs-cTnI* u homogenatima tkiva miokarda između kontrolne i eksperimentalne skupine tretirane vodenom otopinom sinigrina nisu utvrđene statistički značajne razlike (**Slika 13.a**). U razdiobi prema spolu, također nisu utvrđene statistički značajne razlike (**Slika 13.b**).



**Slika 13.** Koncentracija visoko osjetljivog troponina I (hs-cTnI) u homogenatima tkiva miokarda: a) bez obzira na spol (n = 10), b) po spolu (n = 5) nakon 28. dana *ig* primjene vodene otopine sinigrina jednom dnevno u dozi od 10 mg/kg tjelesne mase miša. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom.

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.<sub>M</sub> - kontrolna skupina mužjaci; Kont.<sub>ž</sub> - kontrolna skupina ženke; Sinig.<sub>M</sub>- eksperimentalna skupina mužjaka tretirana vodenom otopinom sinigrina; Sinig.<sub>ž</sub> - eksperimentalna skupina ženki tretirana vodenom otopinom sinigrina.

Analizom koncentracije hs-cTnI u homogenatima tkiva miokarda između kontrolne i eksperimentalnih skupina tretiranih vodenim ekstraktima klijanaca brokule, statistički značajno veća koncentracija hs-cTnI uočena je u skupini tretiranoj vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 38\text{ °C}$  (HT<sub>ekst.</sub>) u odnosu kontrolnu skupinu (Kont.) ( $\blacktriangle p \leq 0,01$ ) i skupinu tretiranu ekstraktom klijanca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ °C}$  (RT<sub>ekst.</sub>) ( $\blacksquare p \leq 0,05$ ) (**Slika 14.a**). U razdiobi prema spolu, statistički značajno više koncentracije hs-cTnI uočene su u eksperimentalnoj skupini ženki (HT<sub>ekst.ž</sub>) i mužjaka (HT<sub>ekst.M</sub>) tretiranih vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 38\text{ °C}$  u odnosu na mužjake kontrolne skupine (Kont.<sub>M</sub>) ( $\blacktriangle p \leq 0,05$ ) (**Slika 14.b**).

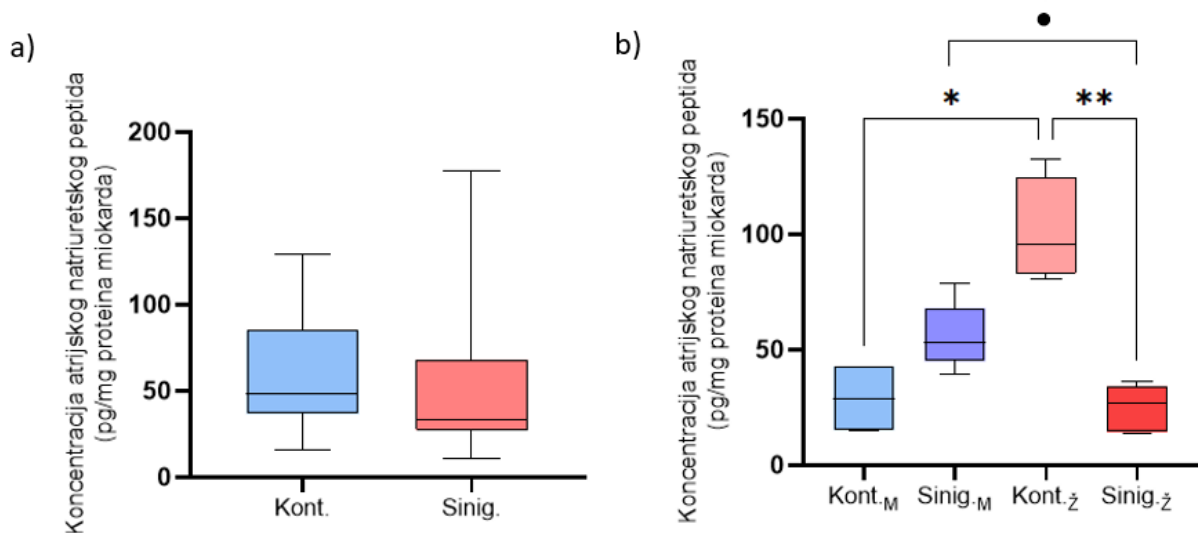


**Slika 14.** Koncentracija visoko osjetljivog troponina (hs-cTnI) u homogenatima tkiva miokarda: a) bez obzira na spol ( $n = 10$ ), b) po spolu ( $n = 5$ ) nakon 28. dana *ig* primjene vodenih ekstrakata klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom.  $\Delta$  Statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu mužjaka ( $\Delta p \leq 0,05$ );  $\blacktriangle$  Statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $\blacktriangle p \leq 0,01$ );  $\blacksquare$  Statistički značajno različito u odnosu na skupinu tretiranu ekstraktom vodene otopine klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\blacksquare p \leq 0,05$ ).

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.<sub>M</sub> - kontrolna skupina mužjaci; Kont.<sub>Ž</sub> - kontrolna skupina ženke; RT<sub>ekst-M</sub> – mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; RT<sub>ekst-Ž</sub> - ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; HT<sub>ekst-M</sub> - mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; HT<sub>ekst-Ž</sub> – ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.4. Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na koncentraciju parametra srčane funkcije, atrijskog netriuretskog peptida (ANP)

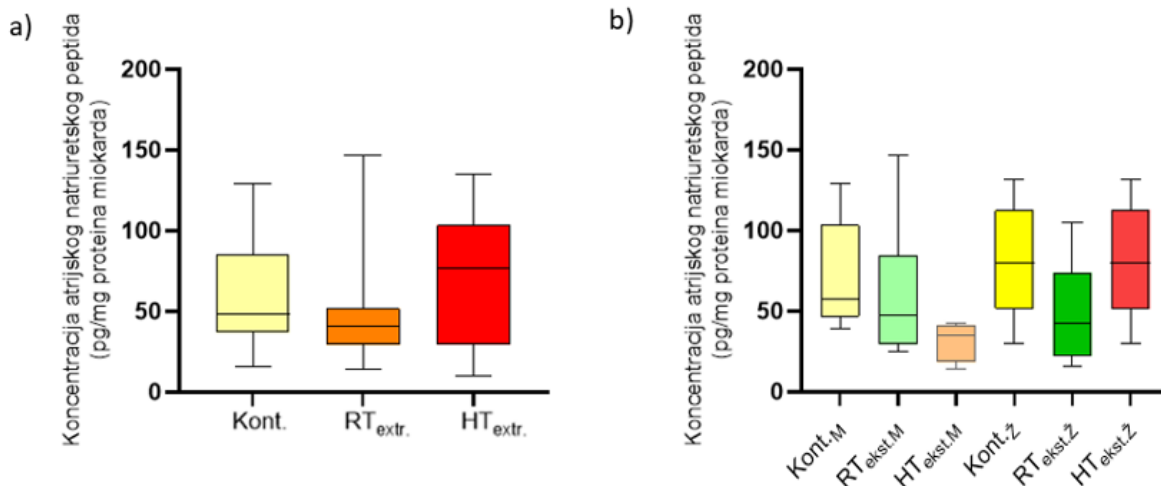
Analizom koncentracije ANP-a u homogenatima tkiva miokarda nisu uočene statistički značajne razlike između kontrolne i eksperimentalne skupine tretirane vodenom otopinom sinigrina (**Slika 15.a**). Analizirajući razdiobu po spolu, zapažena je statistički značajno manja koncentracija ANP-a u eksperimentalnoj skupini ženki (Sinig.<sub>Ž</sub>) u odnosu na kontrolnu skupinu ženki (Kont.<sub>Ž</sub>) ( $**p \leq 0,01$ ) i eksperimentalnu skupinu mužjaka (Sinig.<sub>M</sub>) ( $\bullet p \leq 0,05$ ). Također je utvrđena i statistički značajna razlika u koncentracijama ANP-a između kontrolne skupine mužjaka (Kont.<sub>M</sub>) i kontrolne skupine ženki (Kont.<sub>Ž</sub>) (**Slika 15.b**).



**Slika 15.** Koncentracija atrijskog natriuretskog peptida (ANP) u homogenatima tkiva miokarda: a) bez obzira na spol (n = 10), b) po spolu (n = 5) nakon 28. dana *ig* primjene vodene otopine sinigrina jednom dnevno u dozi od 10 mg/kg tjelesne mase miša. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom. \*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ženki ( $*p \leq 0,05$ ;  $**p \leq 0,01$ ); •Statistički značajno različito u odnosu na skupinu ženki tretiranih vodenom otopinom sinigrina ( $\bullet p \leq 0,05$ ).

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.M - kontrolna skupina mužjaci; Kont.ž - kontrolna skupina ženke; Sinig.M- eksperimentalna skupina mužjaka tretirana vodenom otopinom sinigrina; Sinig.ž - eksperimentalna skupina ženki tretirana vodenom otopinom sinigrina.

Analizom koncentracije ANP-a u homogenatima tkiva miokarda između kontrolne skupine i eksperimentalnih skupina tretiranih vodenim otopinama ekstrakata brokule uzgojenih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$  nisu uočene statistički značajne razlike (**Slika 16. a**), kao ni prilikom razdiobe skupina prema spolu (**Slika 16.b**).



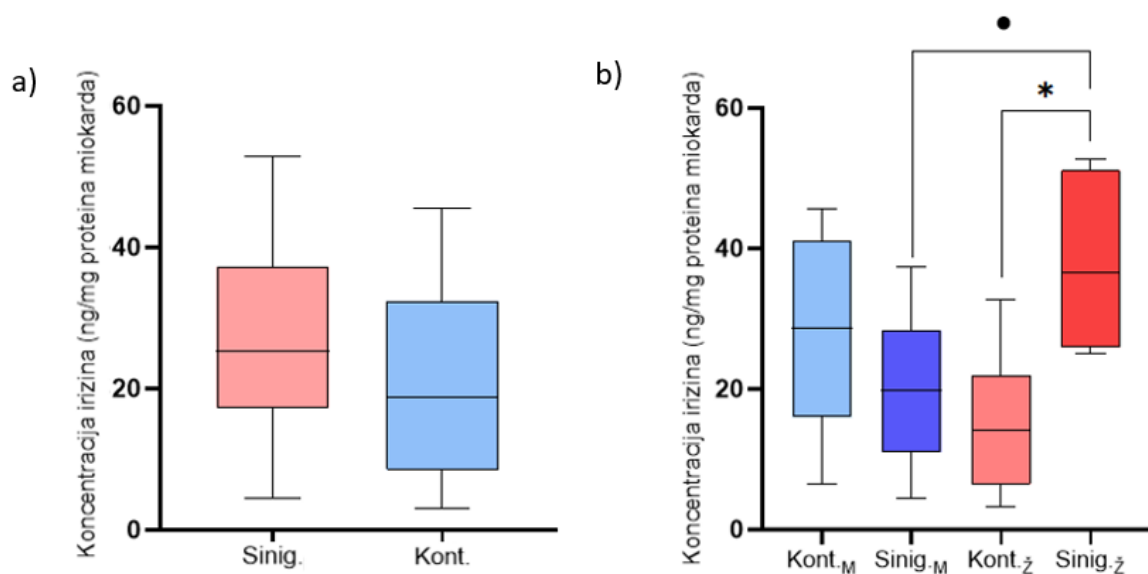
**Slika 16.** Koncentracija atrijskog natriuretskog peptida (ANP) u homogenatima tkiva miokarda: a) bez obzira na spol (n = 10), b) po spolu (n = 5) nakon 28. dana *ig* primjene vodenih ekstrakata klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom.

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.<sub>M</sub> - kontrolna skupina mužjaci; Kont.<sub>Ž</sub> - kontrolna skupina ženke; RT<sub>ekst.M</sub> – mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; RT<sub>ekst.Ž</sub> - ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; HT<sub>ekst.M</sub> - mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; HT<sub>ekst.Ž</sub> – ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.4. Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na metaboličke parametre miokarda

##### 4.4.1. Učinak vodene otopine sinigrina na koncentracije irizina i adropina

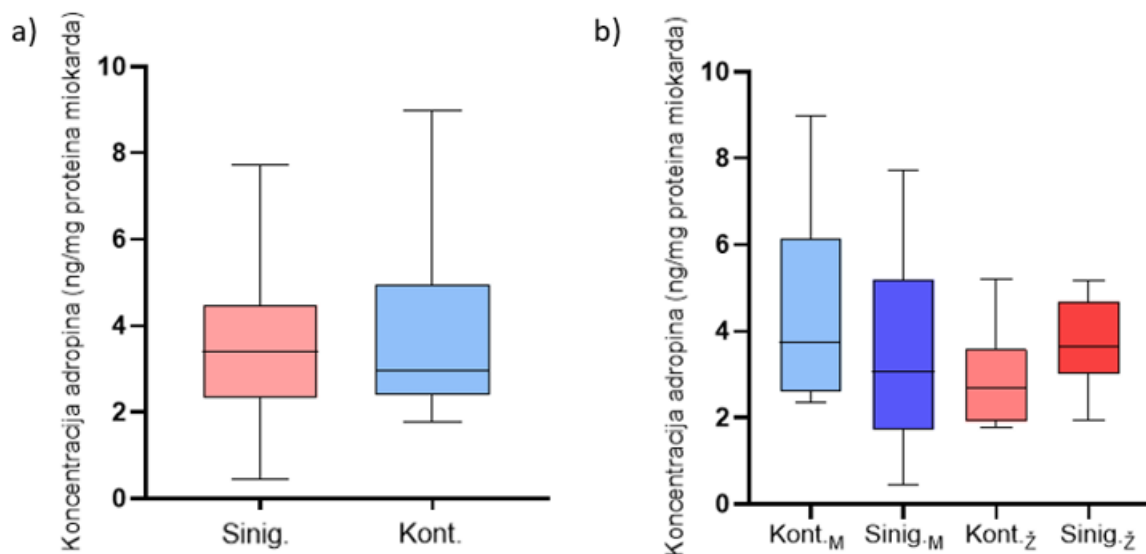
Koncentracije izabranih metaboličkih parametara irizina i adropina izmjerene su samo u eksperimentalnoj skupini životinja tretiranih vodenom otopinom sinigrina i kontrolnoj skupini životinja. Analizom koncentracije irizina u homogenatima tkiva miokarda bez obzira na spol nisu uočene statistički značajne razlike između eksperimentalne skupine tretirane vodenom otopinom sinigrina (Sinig.) i kontrolne skupine (Kont.) (**Slika 17.a**). U razdiobi prema spolu, uočena je statistički značajno veća koncentracija irizina u eksperimentalnoj skupini ženki (Sinig.<sub>Ž</sub>) u odnosu na kontrolnu skupinu ženki (Kont.<sub>Ž</sub>) ( $*p \leq 0,05$ ) i eksperimentalnu skupinu mužjaka (Sinig.<sub>M</sub>) ( $\bullet p \leq 0,05$ ) (**Slika 17.b**).



**Slika 17.** Koncentracija irizina u homogenatima tkiva miokarda: a) bez obzira na spol (n = 10), b) po spolu (n = 5) nakon 28. dana *ig* primjene vodene otopine sinigrina jednom dnevno u dozi od 10 mg/kg tjelesne mase miša. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom. \*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ženki ( $*p \leq 0,05$ ); •Statistički značajno različito u odnosu na skupinu mužjaka tretiranih vodenom otopinom sinigrina ( $\bullet p \leq 0,05$ ).

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.M - kontrolna skupina mužjaci; Kont.ž - kontrolna skupina ženke; Sinig.M- eksperimentalna skupina mužjaka tretirana vodenom otopinom sinigrina; Sinig.ž - eksperimentalna skupina ženki tretirana vodenom otopinom sinigrina.

Analizom koncentracije adropina u homogenatima tkiva miokarda nisu zapažene statistički značajne razlike između eksperimentalne skupine tretirane vodenom otopinom sinigrina (Sinig.) i kontrolne skupine (Kont.) (**Slika 18.a**), kao ni prilikom razdiobe skupina prema spolu (**Slika 18.b**).



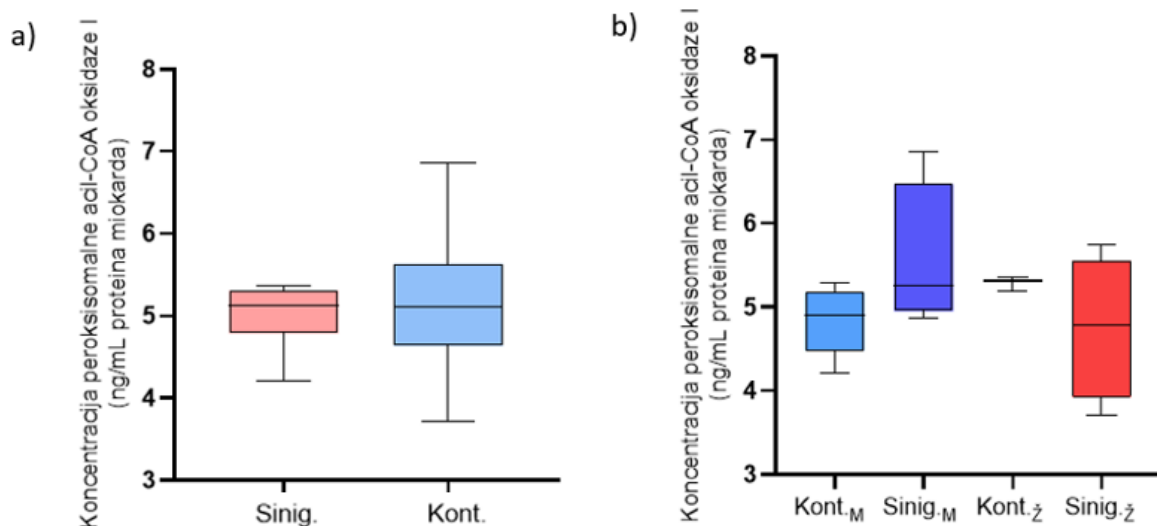
**Slika 18.** Koncentracija adropina u homogenatima tkiva miokarda: a) bez obzira na spol (n = 10), b) po spolu (n = 5) nakon 28. dana *ig* primjene vodene otopine sinigrina jednom dnevno u dozi od 10 mg/kg tjelesne mase miša. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom.

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.M - kontrolna skupina mužjaci; Kont.ž - kontrolna skupina ženke; Sinig.M- eksperimentalna skupina mužjaka tretirana vodenom otopinom sinigrina; Sinig.ž - eksperimentalna skupina ženki tretirana vodenom otopinom sinigrina.

#### 4.4.2. Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na koncentraciju peroksisomalne acil-CoA oksidaze I (ACOX1)

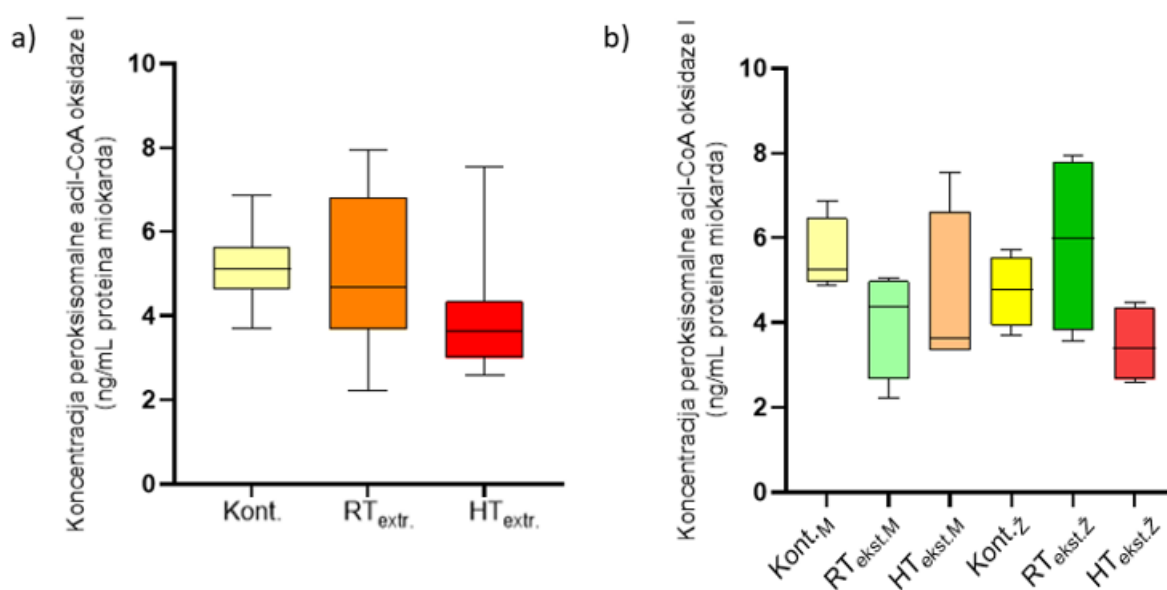
Analizom koncentracije ACOX1 u uzorcima homogenatima tkiva miokarda nisu zapažene statistički značajne razlike između kontrolne skupine i eksperimentalne skupine tretirane vodenom otopinom sinigrina (**Slika 19.a**), kao ni prilikom razdiobe skupina prema spolu (**Slika 19. b**).

Analizom koncentracije ACOX1 u uzorcima homogenatima tkiva miokarda nisu zapažene statistički značajne razlike između kontrolne skupine i eksperimentalnih skupina tretiranih vodenim otopinama ekstrakata brokule uzgojenih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$  (**Slika 20. a**), kao ni prilikom razdiobe skupina prema spolu (**Slika 20.b**).



**Slika 19.** Koncentracija peroksisomalne acil-CoA oksidaze I u homogenatima tkiva miokarda: a) bez obzira na spol ( $n = 10$ ), b) po spolu ( $n = 5$ ) nakon 28. dana *ig* primjene vodene otopine sinigrina jednom dnevno u dozi od 10 mg/kg tjelesne mase miša. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom.

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.M - kontrolna skupina mužjaci; Kont.ž - kontrolna skupina ženke; Sinig.M- eksperimentalna skupina mužjaka tretirana vodenom otopinom sinigrina; Sinig.ž - eksperimentalna skupina ženki tretirana vodenom otopinom sinigrina.



**Slika 20.** Koncentracija peroksisomalne acil-CoA oksidaze I u homogenatima tkiva miokarda: a) bez obzira na spol ( $n = 10$ ), b) po spolu ( $n = 5$ ) nakon 28. dana *ig* primjene vodenih ekstrakata kljanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom.

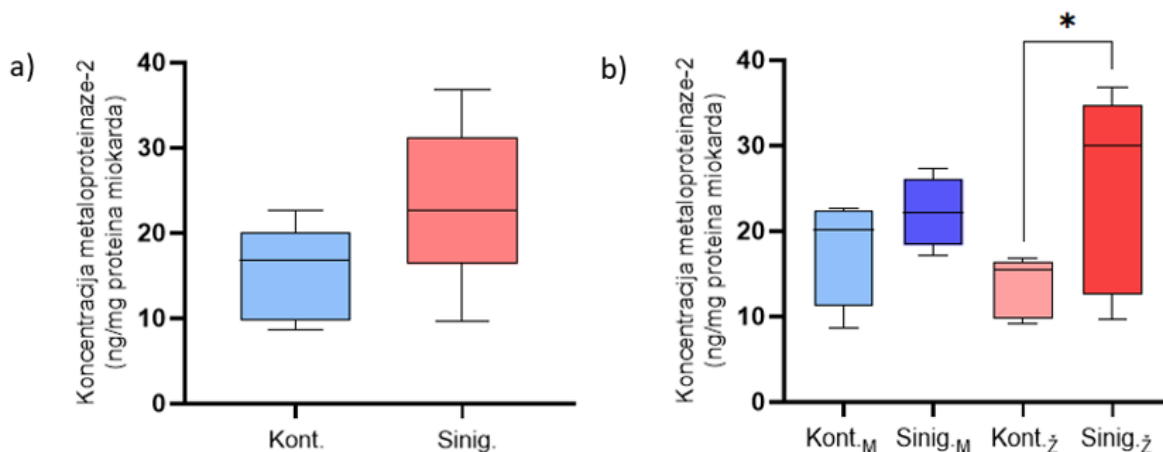
Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.M - kontrolna skupina mužjaci; Kont.ž - kontrolna skupina ženke; RT<sub>ekst.M</sub> – mužjaci tretirani vodenim ekstraktom kljanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; RT<sub>ekst.ž</sub> - ženke tretirane vodenim ekstraktom kljanaca brokule uzgajanih pri  $t =$

23 °C; HT<sub>ekst.M</sub> - mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28$  °C; HT<sub>ekst.ž</sub> – ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 38$  °C.

#### 4.5. Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na upalne parametre miokarda

##### 4.5.1. Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na koncentraciju matriks metaloproteinaza 2 i 9 (MMP-2, MMP-9)

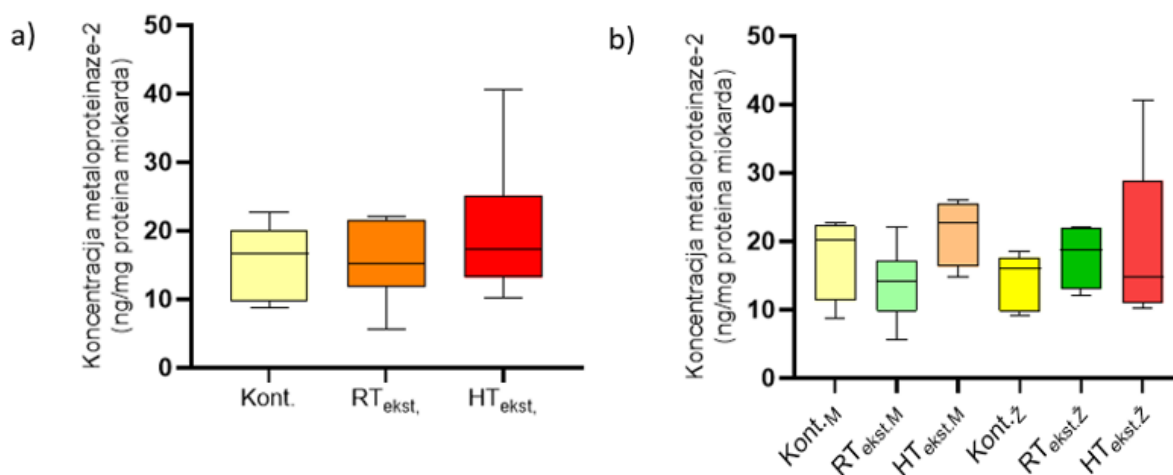
Analizom rezultata koncentracija MMP-2 u homogenatima tkiva miokarda, bez obzira na spol, nisu utvrđene statistički značajne koncentracije između ekperimentalne skupine tretirane vodenom otopinom sinigrina (Sinig.) i kontrolne skupine (Kont.) (**Slika 21.a**). Međutim, analizom rezultata u razdiobi skupina prema spolu, utvrđena je statistički značajno povišena koncentracija MMP-2 u eksperimentalnoj skupini ženki (Sinig.ž) u odnosu na kontrolnu skupinu ženki (Kont.ž) ( $*p \leq 0,05$ ) (**Slika 21.b**).



**Slika 21.** Koncentracija metaloproteinaze-2 (MMP-2) u homogenatima tkiva miokarda: a) bez obzira na spol ( $n = 10$ ), b) po spolu ( $n = 5$ ) nakon 28. dana *ig* primjene vodene otopine sinigrina jednom dnevno u dozi od 10 mg/kg tjelesne mase miša. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom. \*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ženki ( $*p \leq 0,05$ ).

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.M - kontrolna skupina mužjaci; Kont.ž - kontrolna skupina ženke; Sinig.M- eksperimentalna skupina mužjaka tretirana vodenom otopinom sinigrina; Sinig.ž - eksperimentalna skupina ženki tretirana vodenom otopinom sinigrina.

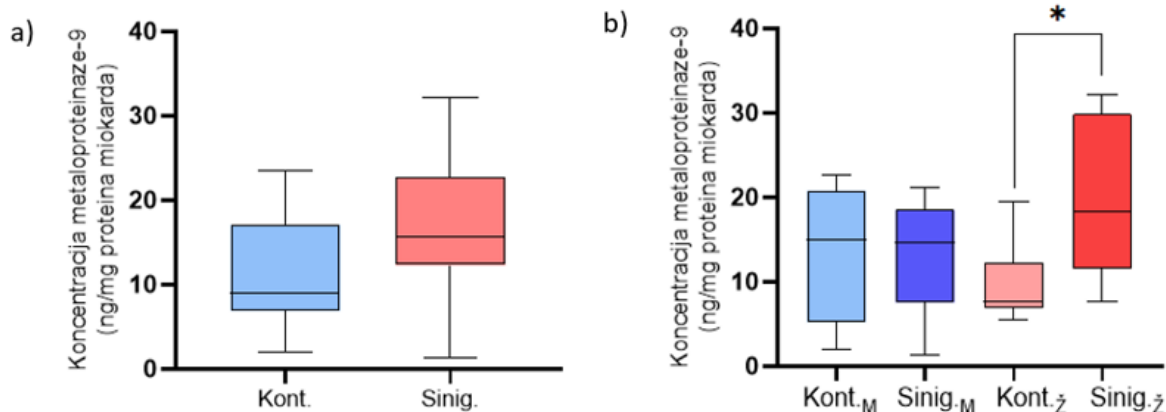
Analizom koncentracije MMP-2 u homogenatima tkiva miokarda nisu zapažene statistički značajne razlike između kontrolne skupine i eksperimentalnih skupina tretiranih vodenim otopinama ekstrakata brokule uzgojenih pri  $t = 23\text{ °C}$  i  $t = 38\text{ °C}$  (Slika 22.a), kao ni između skupina prilikom razdiobe prema spolu (Slika 22.b).



**Slika 22.** Koncentracija metaloproteinaze-2 (MMP-2) u homogenatima tkiva miokarda: a) bez obzira na spol ( $n = 10$ ), b) po spolu ( $n = 5$ ) nakon 28. dana *ig* primjene vodenih ekstrakata klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ °C}$  i  $t = 38\text{ °C}$ . Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom.

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.<sub>M</sub> - kontrolna skupina mužjaci; Kont.<sub>Ž</sub> - kontrolna skupina ženke; RT<sub>ekst.-M</sub> – mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ °C}$ ; RT<sub>ekst.-Ž</sub> - ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ °C}$ ; HT<sub>ekst.-M</sub> - mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28\text{ °C}$ ; HT<sub>ekst.-Ž</sub> – ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28\text{ °C}$ .

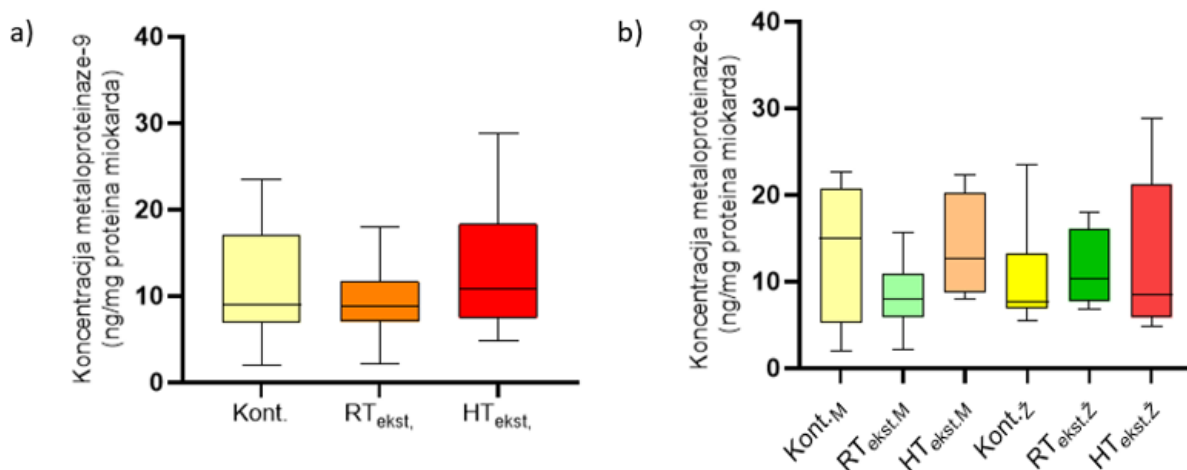
Analizom rezultata koncentracija MMP-9 u homogenatima tkiva miokarda, bez obzira na spol, nisu utvrđene statistički značajne koncentracije između eksperimentalne skupine tretirane vodenom otopinom sinigrina (Sinig.) i kontrolne skupine (Kont.) (Slika 23.a). Međutim, analizom rezultata u razdiobi prema spolu, zapažena je statistički značajno povišena koncentracija MMP-9 u eksperimentalnoj skupini ženki (Sinig<sub>Ž</sub>) u odnosu na kontrolnu skupinu ženki (Kont.<sub>Ž</sub>) ( $*p \leq 0,05$ ) (Slika 23.b).



**Slika 23.** Koncentracija metaloproteinaze-9 (MMP-9) u homogenatima tkiva miokarda: a) bez obzira na spol ( $n = 10$ ), b) po spolu ( $n = 5$ ) nakon 28. dana *ig* primjene vodene otopine sinigrina jednom dnevno u dozi od 10 mg/kg tjelesne mase miša. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom. \*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ženki ( $*p \leq 0,05$ ).

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.M - kontrolna skupina mužjaci; Kont.ž - kontrolna skupina ženke; Sinig.M- eksperimentalna skupina mužjaka tretirana vodenom otopinom sinigrina; Sinig.ž - eksperimentalna skupina ženki tretirana vodenom otopinom sinigrina.

Analizom koncentracije MMP-9 u uzorcima homogenatima tkiva miokarda nisu zapažene statistički značajne razlike između kontrolne skupine i eksperimentalnih skupina tretiranih vodenim otopinama ekstrakata brokule uzgojenih pri  $t = 23 \text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $t = 38 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (**Slika 24.a**), kao ni između skupina prilikom razdiobe prema spolu (**Slika 24.b**).

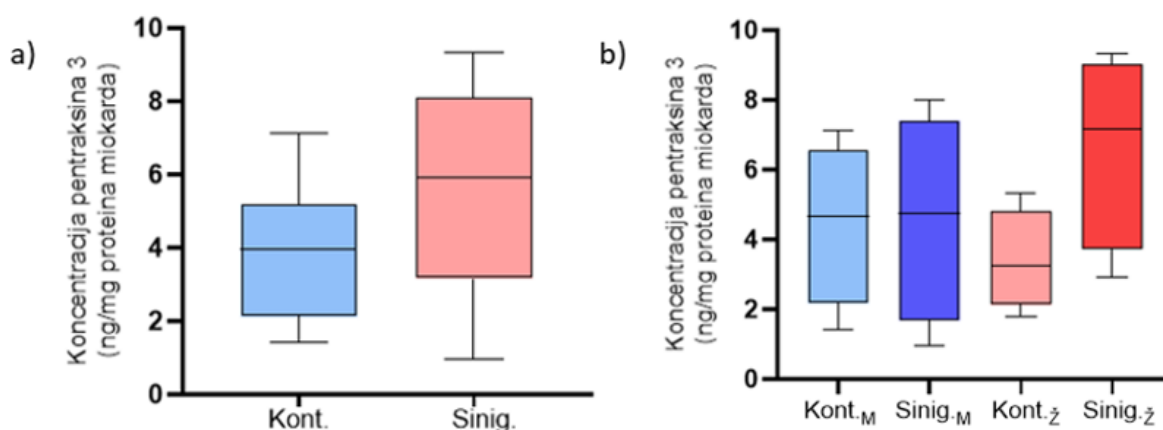


**Slika 24.** Koncentracija metaloproteinaze-9 (MMP-9) u homogenatima tkiva miokarda: a) bez obzira na spol ( $n = 10$ ), b) po spolu ( $n = 5$ ) nakon 28. dana *ig* primjene vodenih ekstrakata klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23 \text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $t = 38 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom.

Kratice: *ig* – intragastrično;  $Kont.M$  - kontrolna skupina mužjaci;  $Kont.ž$  - kontrolna skupina ženke;  $RT_{ekst.M}$  – mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23$  °C;  $RT_{ekst.ž}$  - ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23$  °C;  $HT_{ekst.M}$  - mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28$  °C;  $HT_{ekst.ž}$  – ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28$  °C.

#### 4.5.2. Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na koncentraciju pentraksina (PTX3)

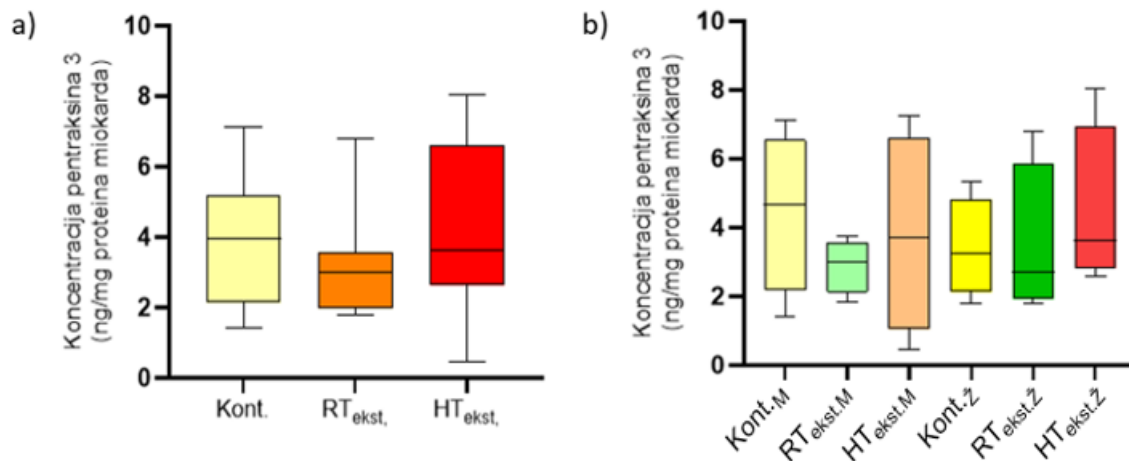
Nakon 28 dana *ig* primjene vodene otopine sinigrina nisu zapažene statistički značajne razlike u koncentracijama PTX3 u homogenatima tkiva miokarda između eksperimentalne skupine (Sinig.) i kontrolne skupine (Kont.) (Slika 25.a), kao niti prilikom razdiobe skupina prema spolu (Slika 25.b).



**Slika 25.** Koncentracija pentraksina 3 (PTX3) u homogenatima tkiva miokarda: a) bez obzira na spol ( $n = 10$ ), b) po spolu ( $n = 5$ ) nakon 28. dana *ig* primjene vodene otopine sinigrina jednom dnevno u dozi od 10 mg/kg tjelesne mase miša. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom.

Kratice: *ig* – intragastrično;  $Kont.M$  - kontrolna skupina mužjaci;  $Kont.ž$  - kontrolna skupina ženke;  $Sinig.M$  - eksperimentalna skupina mužjaka tretirana vodenom otopinom sinigrina;  $Sinig.ž$  - eksperimentalna skupina ženki tretirana vodenom otopinom sinigrina.

Analizom koncentracije PTX3 u uzorcima homogenata tkiva miokarda nisu zapažene statistički značajne razlike između kontrolne skupine i eksperimentalnih skupina tretiranih vodenim otopinama ekstrakata brokule uzgojenih pri  $t = 23$  °C i  $t = 38$  °C (Slika 26.a), kao niti između skupina prilikom razdiobe prema spolu (Slika 26.b).

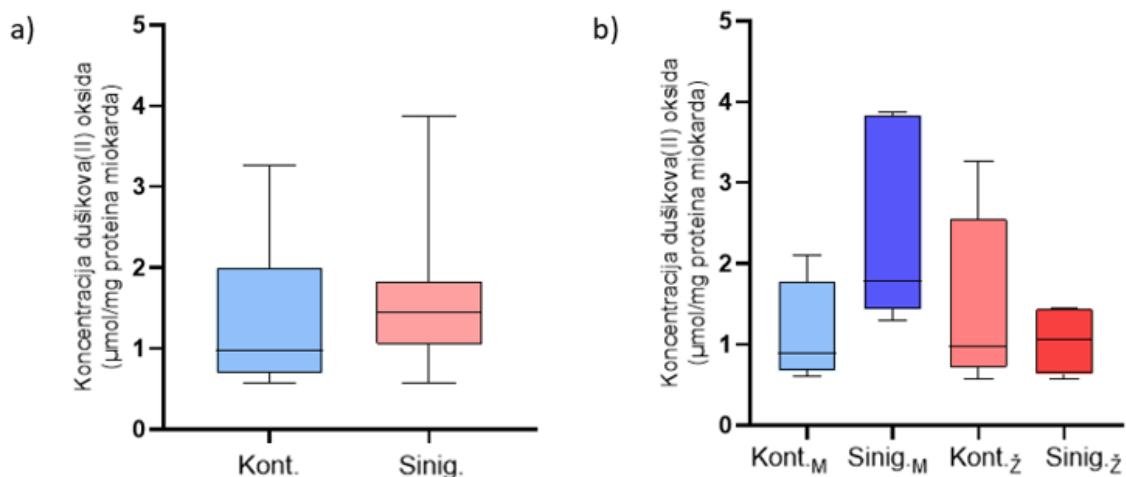


**Slika 26.** Koncentracija pentraksina 3 (PTX3) u homogenatima tkiva miokarda: a) bez obzira na spol ( $n = 10$ ), b) po spolu ( $n = 5$ ) nakon 28. dana *ig* primjene vodenih ekstrakata klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom.

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.<sub>M</sub> - kontrolna skupina mužjaci; Kont.<sub>Ž</sub> - kontrolna skupina ženke; RT<sub>ekst.M</sub> – mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; RT<sub>ekst.Ž</sub> - ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; HT<sub>ekst.M</sub> - mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; HT<sub>ekst.Ž</sub> – ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.5.3. Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na koncentraciju dušikova(II) oksida (NO)

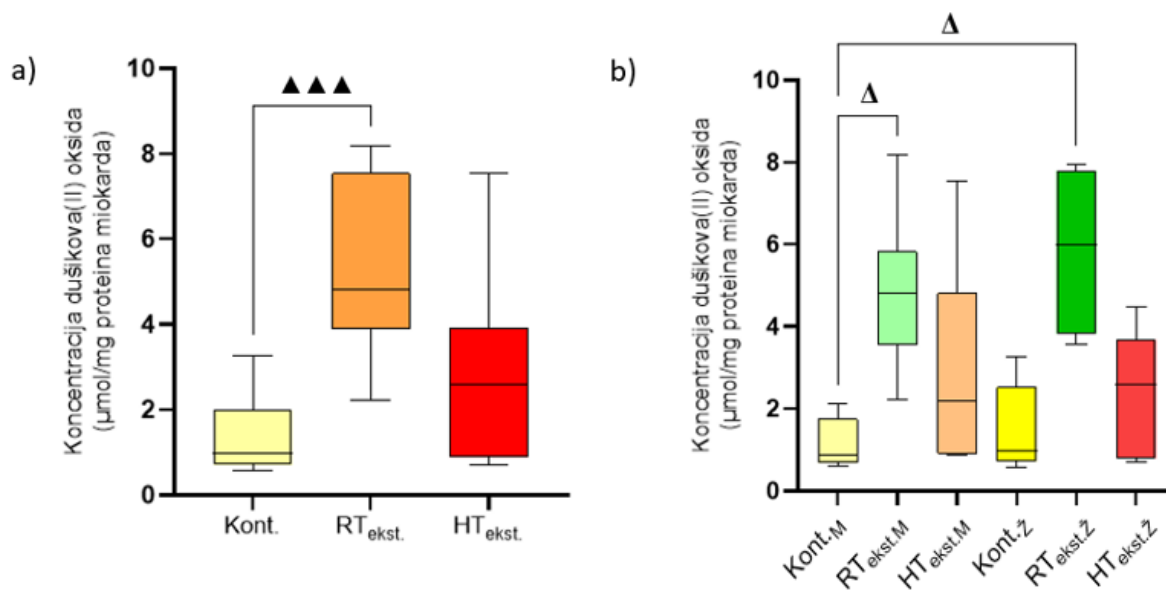
Nakon 28. dana *ig* primjene vodene otopine sinigrina nisu uočene statistički značajne razlike u koncentracijama NO u homogenatima tkiva miokarda između eksperimentalne (Sinig.) i kontrolne skupine (Kont.) (**Slika 27.a**). Statistički značajne razlike nisu uočene niti prilikom razdiobe skupina prema spolu (**Slika 27.b**).



**Slika 27.** Koncentracija dušikova(II) oksida (NO) u homogenatima tkiva miokarda: a) bez obzira na spol ( $n = 10$ ), b) po spolu ( $n = 5$ ) nakon 28. dana *ig* primjene vodene otopine sinigrina jednom dnevno u dozi od 10 mg/kg tjelesne mase miša. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom.

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.<sub>M</sub> - kontrolna skupina mužjaci; Kont.<sub>ž</sub> - kontrolna skupina ženke; Sinig.<sub>M</sub>- eksperimentalna skupina mužjaka tretirana vodenom otopinom sinigrina; Sinig.<sub>ž</sub> - eksperimentalna skupina ženki tretirana vodenom otopinom sinigrina.

Analizom koncentracije dušikova(II) oksida u uzorcima homogenatima tkiva miokarda između ekperimentalnih skupina tretiranih vodenim ekstraktima klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ °C}$  i  $t = 38\text{ °C}$  i kontrolne skupine, bez obzira na spol, statistički značajno povećana koncentracija NO zapažena je u skupini RT<sub>ekst.</sub> u odnosu na kontrolnu skupinu (Kont.) ( $^{\Delta\Delta\Delta}p \leq 0,001$ ) (**Slika 28.a**). Također, analizom rezultata u razdiobi prema spolu, statistički značajno povećana koncentracija NO, utvrđena je u homogenatima tkiva miokarda u eksperimentalnim skupinama mužjaka (RT<sub>ekst.M</sub>) i ženki (RT<sub>ekst.ž</sub>) tretiranih vodenim ekstraktima klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ °C}$  u odnosu na kontrolnu skupinu mužjaka (Kont.<sub>M</sub>) ( $^{\Delta}p \leq 0,05$ ) (**Slika 28.b**).



**Slika 28.** Koncentracija dušikova(II) oksida (NO) u homogenatima tkiva miokarda: a) bez obzira na spol (n = 10), b) po spolu (n = 5) nakon 28. dana *ig* primjene vodenih ekstrakata klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom.  $\Delta$ Statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu mužjaka ( $\Delta p \leq 0,05$ );  $\blacktriangle$ Statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle p \leq 0,001$ ).

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.M - kontrolna skupina mužjaci; Kont.ž - kontrolna skupina ženke; RT<sub>ekst.M</sub> – mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; RT<sub>ekst.ž</sub> - ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; HT<sub>ekst.M</sub> - mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; HT<sub>ekst.ž</sub> – ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

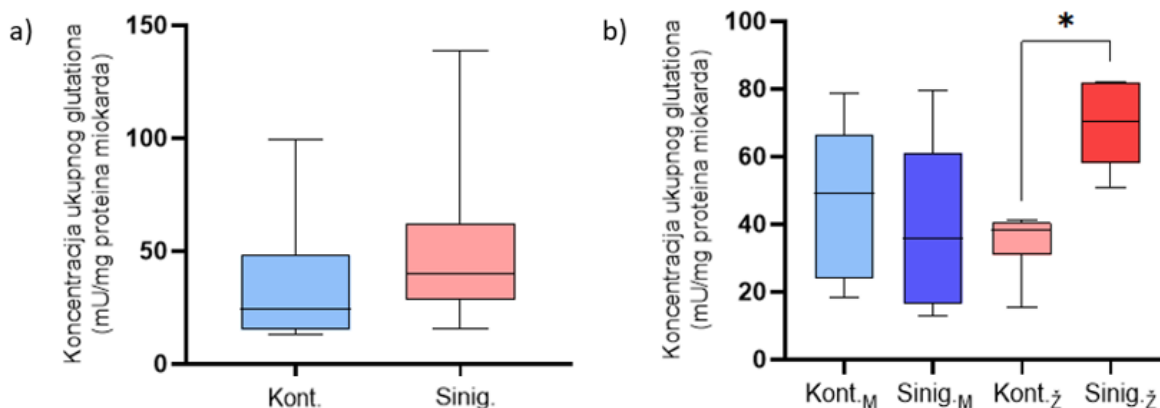
#### 4.6. Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na biološke biljege oksidacijskog stresa u tkivu miokarda

U ovom su se istraživanju u tkivnim homogenatima miokarda izmjerili sljedeći biološki biljezi oksidacijskog stresa: tGSH, aktivnost katalaze, aktivnost SOD-a i koncentracija MDA

##### 4.6.1. Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na koncentraciju ukupnog glutationa (tGSH)

Nakon 28. dana *ig* primjene vodene otopine sinigrina nisu uočene statistički značajne razlike u koncentracijama tGSH u homogenatima tkiva miokarda između eksperimentalne

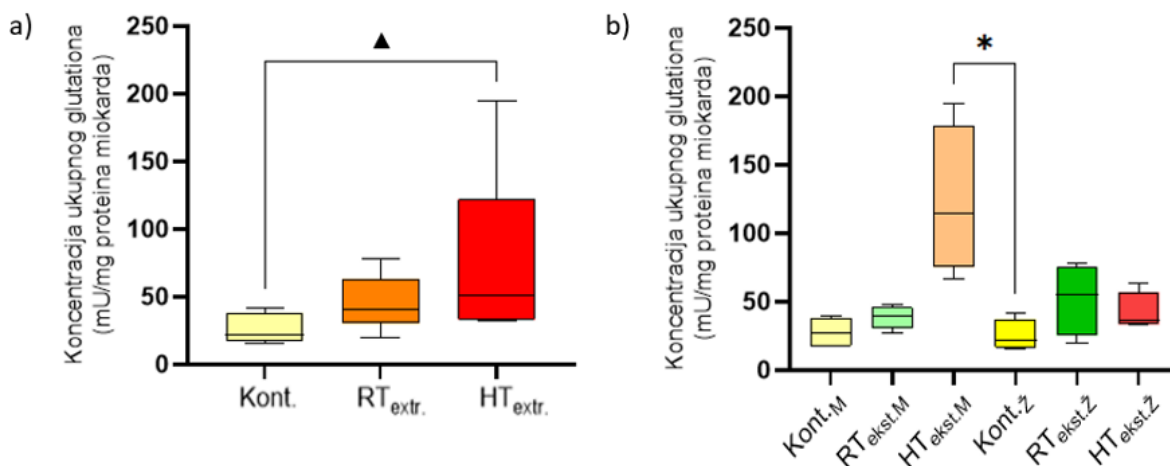
(Sinig.) i kontrolne skupine (Kont.) (Slika 29.a). U razdiobi prema spolu, statistički značajno povećana koncentracija tGSH utvrđena je u eksperimentalnoj skupini ženki (Sinig.ž) u odnosu na kontrolnu skupinu ženki (Kont.ž) ( $*p \leq 0,05$ ) (Slika 29.b).



**Slika 29.** Koncentracija ukupnog glutationa (tGSH) u homogenatima tkiva miokarda: : a) bez obzira na spol ( $n = 10$ ), b) po spolu ( $n = 5$ ) nakon 28. dana *ig* primjene vodene otopine sinigrina jednom dnevno u dozi od 10 mg/kg tjelesne mase miša. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom. \*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ženki ( $*p \leq 0,05$ ).

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.<sub>M</sub> - kontrolna skupina mužjaci; Kont.<sub>ž</sub> - kontrolna skupina ženke; Sinig.<sub>M</sub>- eksperimentalna skupina mužjaka tretirana vodenom otopinom sinigrina; Sinig.<sub>ž</sub> - eksperimentalna skupina ženki tretirana vodenom otopinom sinigrina.

Analizom koncentracije tGSH u homogenatima tkiva miokarda između ekperimentalnih skupina tretiranih vodenim ekstraktima klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23$  °C i  $t = 38$  °C i kontrolne skupine, bez obzira na spol, statistički značajno povećana koncentracija tGSH zapažena je u skupini HT<sub>ekst.</sub> u odnosu na kontrolnu skupinu (Kont.) ( $\Delta p \leq 0,05$ ) (Slika 30.a). Također, analizom rezultata u razdiobi prema spolu, statistički značajno povećana koncentracija tGSH, utvrđena je u homogenatima tkiva miokarda u eksperimentalnoj skupini mužjaka (HT<sub>ekst.M</sub>) tretiranih vodenim ekstraktima klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 38$  °C u odnosu na kontrolnu skupinu ženki (Kont.<sub>M</sub>) ( $\Delta p \leq 0,05$ ) (Slika 30.b).

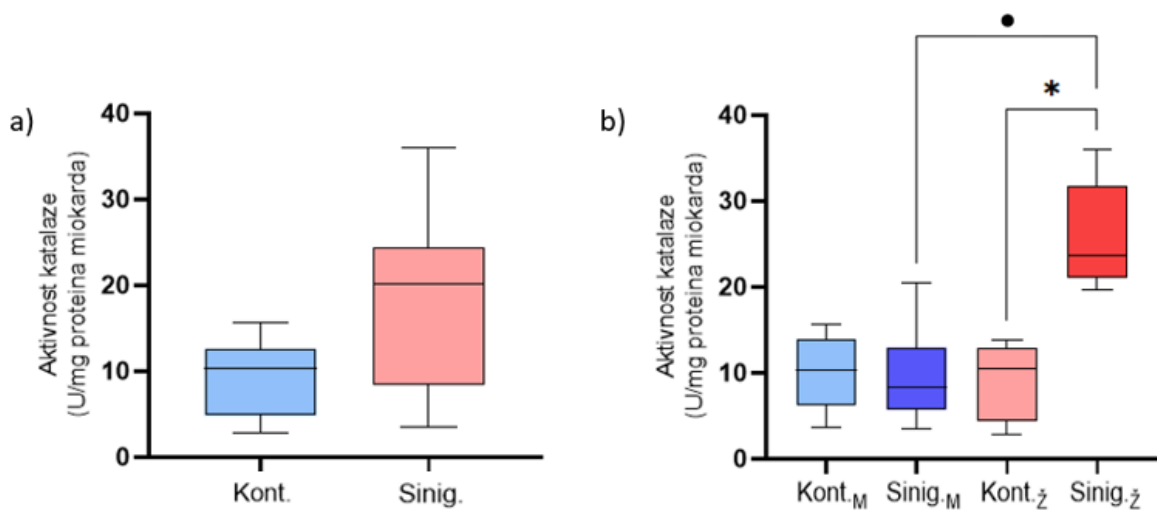


**Slika 30.** Koncentracija ukupnog glutatona (tGSH) u homogenatima tkiva miokarda: a) bez obzira na spol ( $n = 10$ ), b) po spolu ( $n = 5$ ) nakon 28. dana *ig* primjene vodenih ekstrakata klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23$  °C i  $t = 38$  °C. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom. \*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ženki ( $*p \leq 0,05$ ); ▲ Statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu (▲ $p \leq 0,05$ ).

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.<sub>M</sub> - kontrolna skupina mužjaci; Kont.<sub>ž</sub> - kontrolna skupina ženke; RT<sub>ekst.M</sub> – mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23$  °C; RT<sub>ekst.ž</sub> - ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23$  °C; HT<sub>ekst.M</sub> - mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28$  °C; HT<sub>ekst.ž</sub> – ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28$  °C.

#### 4.6.2. Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na enzimsku aktivnost katalaze

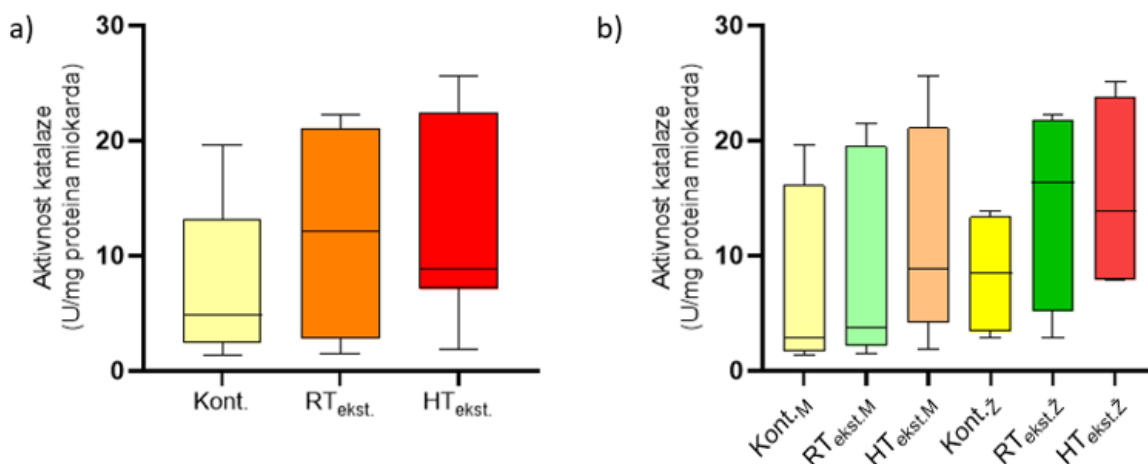
Nakon 28 dana *ig* primjene vodene otopine sinigrina nisu zapažene statistički značajne razlike u enzimskoj aktivnosti katalaze u homogenatima tkiva miokarda između eksperimentalne (Sinig.) i kontrolne skupine (Kont.) (**Slika 31.a**). Analizom enzimске aktivnosti katalaze u razdiobi prema spolu, statistički značajno povećana aktivnost katalaze je utvrđena u ekperimentalnoj skupini ženki (Sinig.<sub>ž</sub>) u odnosu na kontrolnu skupinu ženki (Kontr.<sub>ž</sub>) ( $*p \leq 0,05$ ) i ekperimentalnu skupinu mužjaka (Sinig.<sub>M</sub>) ( $*p \leq 0,05$ ) (**Slika 31.b**).



**Slika 31.** Aktivnost katalaze (KAT) u homogenatima tkiva miokarda: : a) bez obzira na spol ( $n = 10$ ), b) po spolu ( $n = 5$ ) nakon 28. dana *ig* primjene vodene otopine sinigrina jednom dnevno u dozi od 10 mg/kg tjelesne mase miša. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom. \*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ženki ( $*p \leq 0,05$ ); •Statistički značajno različito u odnosu na skupinu ženki tretiranih vodenom otopinom sinigrina ( $\bullet p \leq 0,05$ ).

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.<sub>M</sub> - kontrolna skupina mužjaci; Kont.<sub>ž</sub> - kontrolna skupina ženke; Sinig.<sub>M</sub>- eksperimentalna skupina mužjaka tretirana vodenom otopinom sinigrina; Sinig.<sub>ž</sub> - eksperimentalna skupina ženki tretirana vodenom otopinom sinigrina.

Analizom rezultata enzimske aktivnosti katalaze u uzorcima homogenata tkiva miokarda nisu zapažene statistički značajne razlike između kontrolne skupine i eksperimentalnih skupina tretiranih vodenim otopinama ekstrakata brokule uzgojenih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$  (**Slika 32.a**), kao niti između skupina prilikom razdiobe prema spolu (**Slika 32.b**).

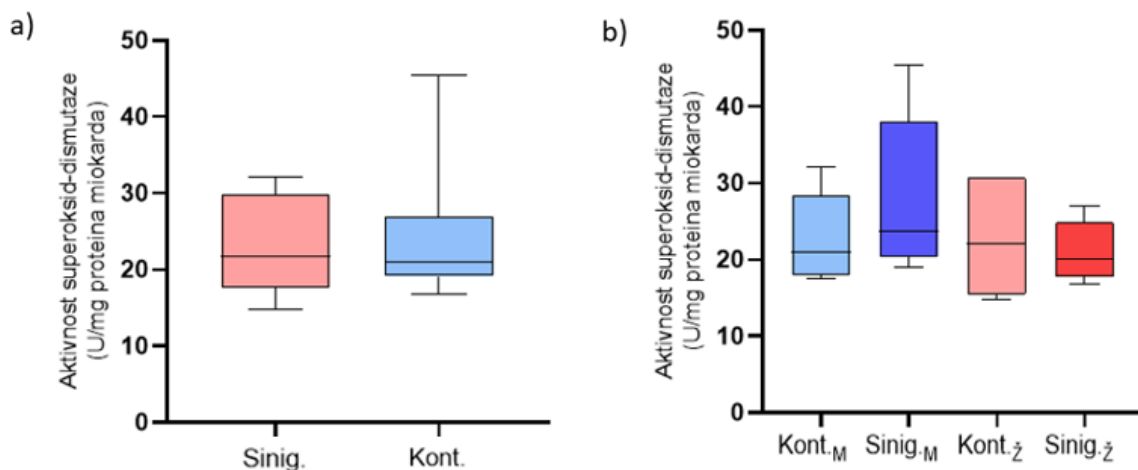


**Slika 32.** Aktivnost katalaze (KAT) u homogenatima tkiva miokarda: : a) bez obzira na spol ( $n = 10$ ), b) po spolu ( $n = 5$ ) nakon 28. dana *ig* primjene vodenih ekstrakata kljanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23$  °C i  $t = 38$  °C. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom.

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.<sub>M</sub> - kontrolna skupina mužjaci; Kont.<sub>ž</sub> - kontrolna skupina ženke; RT<sub>ekst.M</sub> – mužjaci tretirani vodenim ekstraktom kljanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23$  °C; RT<sub>ekst.ž</sub> - ženke tretirane vodenim ekstraktom kljanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23$  °C; HT<sub>ekst.M</sub> - mužjaci tretirani vodenim ekstraktom kljanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28$  °C; HT<sub>ekst.ž</sub> – ženke tretirane vodenim ekstraktom kljanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28$  °C.

#### 4.6.3. Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata kljanaca brokule na enzimsku aktivnost superoksid-dismutaze (SOD)

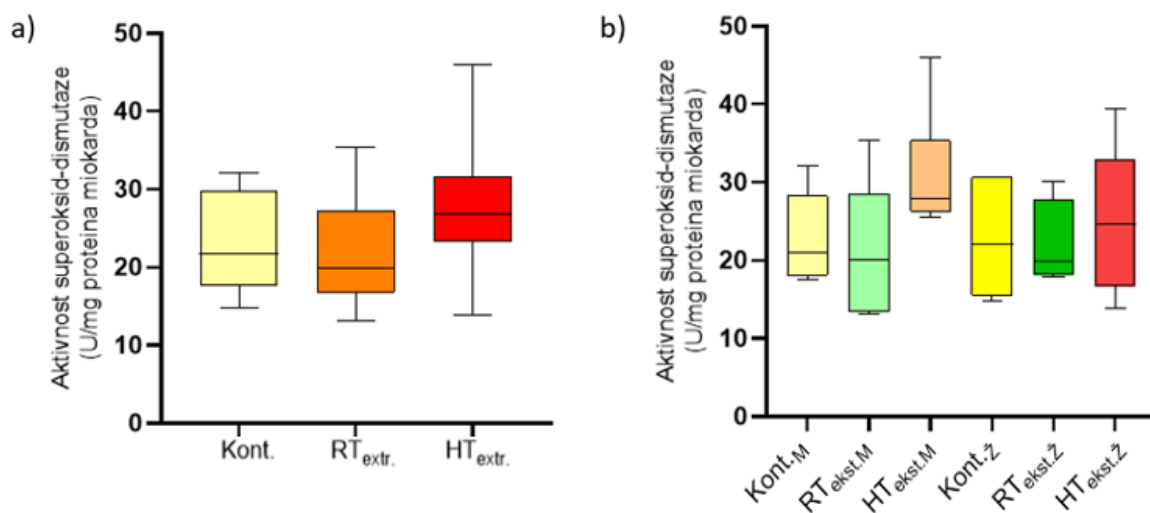
Nakon 28 dana *ig* primjene vodene otopine sinigrina nisu zapažene statistički značajne razlike u enzimskoj aktivnosti superoksid-dismutaze u homogenatima tkiva miokarda između eksperimentalne skupine (Sinig.) i kontrolne skupine (Kont.) (**Slika 33.a**), kao niti prilikom razdiobe skupina prema spolu (**Slika 33.b**).



**Slika 33.** Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u homogenatima tkiva miokarda: a) bez obzira na spol ( $n = 10$ ), b) po spolu ( $n = 5$ ) nakon 28. dana *ig* primjene vodene otopine sinigrina jednom dnevno u dozi od 10 mg/kg tjelesne mase miša. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom.

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.M - kontrolna skupina mužjaci; Kont.ž - kontrolna skupina ženke; Sinig.M- eksperimentalna skupina mužjaka tretirana vodenom otopinom sinigrina; Sinig.ž - eksperimentalna skupina ženki tretirana vodenom otopinom sinigrina.

Analizom enzimske aktivnosti SOD-a u uzorcima homogenata tkiva miokarda nisu zapažene statistički značajne razlike između kontrolne skupine i eksperimentalnih skupina tretiranih vodenim otopinama ekstrakata brokule uzgojenih pri  $t = 23\text{ °C}$  i  $t = 38\text{ °C}$  (**Slika 34.a**), kao niti između skupina prilikom razdiobe prema spolu (**Slika 34.b**).



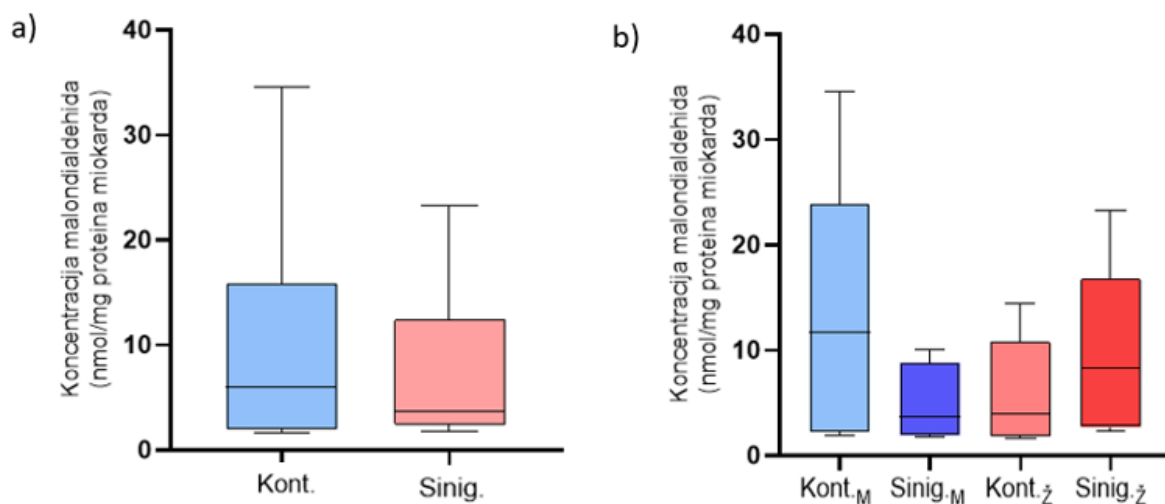
**Slika 34.** Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u homogenatima tkiva miokarda: a) bez obzira na spol ( $n = 10$ ), b) po spolu ( $n = 5$ ) nakon 28. dana *ig* primjene vodenih ekstrakata

klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom.

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.<sub>M</sub> - kontrolna skupina mužjaci; Kont.<sub>ž</sub> - kontrolna skupina ženke; RT<sub>ekst.M</sub> – mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; RT<sub>ekst.ž</sub> - ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; HT<sub>ekst.M</sub> - mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; HT<sub>ekst.ž</sub> – ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.6.4. Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na koncentraciju malondialdehida (MDA)

Nakon 28. dana *ig* primjene vodene otopine sinigrina nisu uočene statistički značajne razlike u koncentracijama MDA u homogenatima tkiva miokarda između eksperimentalne (Sinig.) i kontrolne skupine (Kont.) (**Slika 35.a**). Statistički značajne razlike nisu uočene niti prilikom razdiobe skupina prema spolu (**Slika 35.b**).

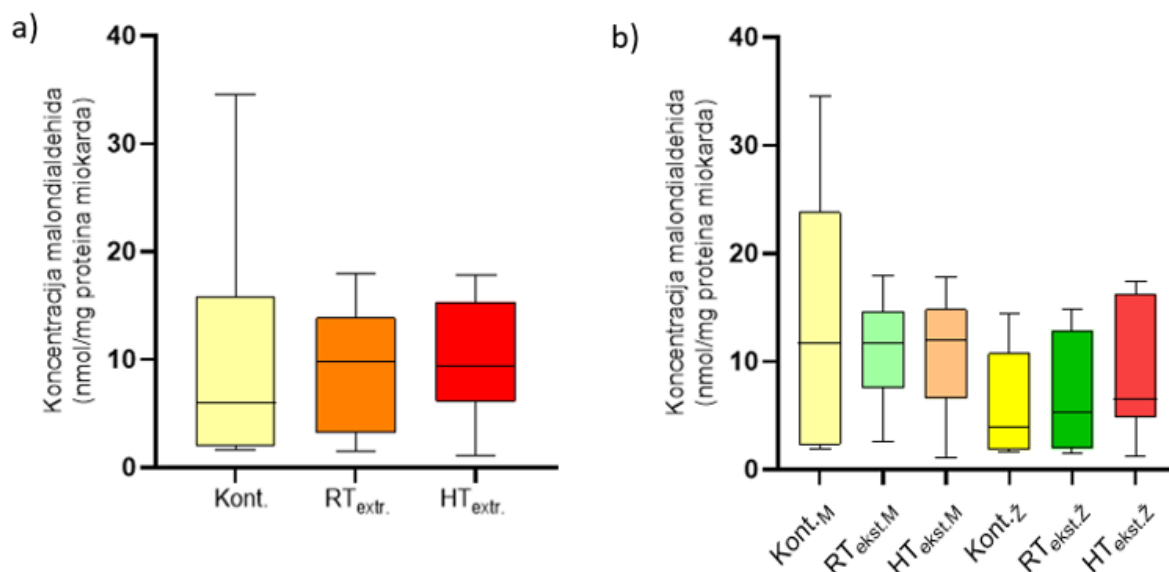


**Slika 35.** Koncentracija malondialdehida (MDA) u homogenatima tkiva miokarda: a) bez obzira na spol ( $n = 10$ ), b) po spolu ( $n = 5$ ) nakon 28. dana *ig* primjene vodene otopine sinigrina jednom dnevno u dozi od 10 mg/kg tjelesne mase miša. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom.

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.<sub>M</sub> - kontrolna skupina mužjaci; Kont.<sub>ž</sub> - kontrolna skupina ženke; Sinig.<sub>M</sub>- eksperimentalna skupina mužjaka tretirana vodenom otopinom sinigrina; Sinig.<sub>ž</sub> - eksperimentalna skupina ženki tretirana vodenom otopinom sinigrina.

Analizom rezultata koncentracije MDA u uzorcima homogenata tkiva miokarda nisu zapažene statistički značajne razlike između kontrolne skupine i eksperimentalnih skupina

tretiranih vodenim otopinama ekstrakata brokule uzgojenih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Slika 36.a), kao niti između skupina prilikom razdiobe prema spolu (Slika 36.b).

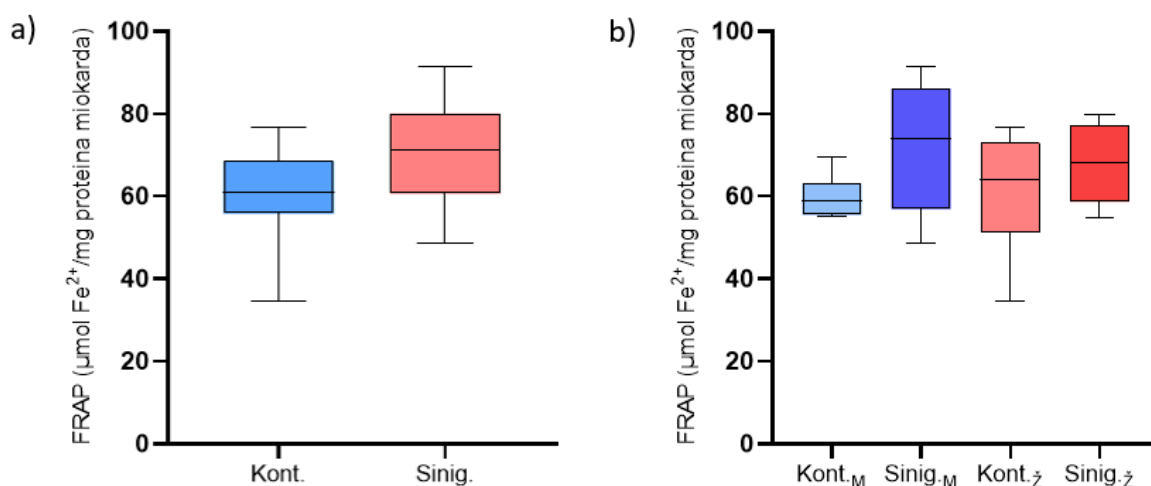


**Slika 36.** Koncentracija malondialdehida (MDA) u homogenatima tkiva miokarda: a) bez obzira na spol ( $n = 10$ ), b) po spolu ( $n = 5$ ) nakon 28. dana *ig* primjene vodenih ekstrakata klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom.

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.M - kontrolna skupina mužjaci; Kont.ž - kontrolna skupina ženke; RT<sub>ekst.M</sub> – mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; RT<sub>ekst.ž</sub> - ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; HT<sub>ekst.M</sub> - mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; HT<sub>ekst.ž</sub> – ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.6.5. Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na antioksidacijski kapacitet tkiva miokarda mjeren metodom FRAP

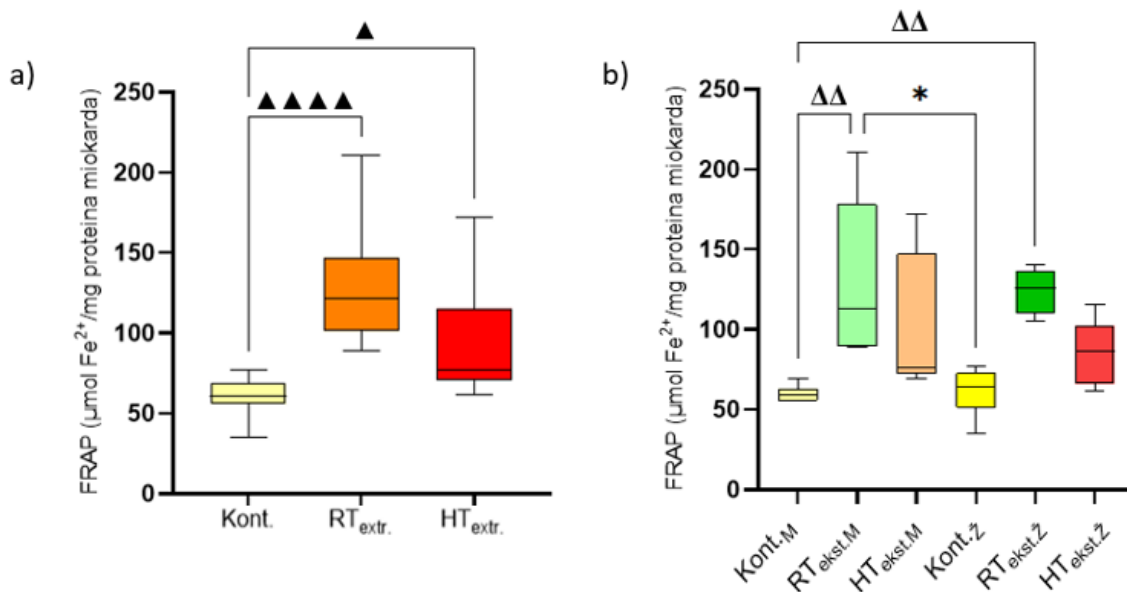
Analizom rezultata antioksidacijskog kapaciteta u homogenatima tkiva miokarda mjerenih metodom FRAP nije uočena statistički značajna razlika u skupini tretiranoj vodenom otopinom sinigrina (Sinig.) u odnosu na kontrolnu skupinu (Kont.) (Slika 37.a). Statistički značajna razlika nije zapažena niti prilikom razdiobe prema spolu (Slika 37.b).



**Slika 37.** Antioksidacijski kapacitet u homogenatima tkiva miokarda određen FRAP metodom: a) bez obzira na spol (n = 10), b) po spolu (n = 5) nakon 28. dana *ig* primjene vodene otopine sinigrina jednom dnevno u dozi od 10 mg/kg tjelesne mase miša. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom.

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.M - kontrolna skupina mužjaci; Kont.z - kontrolna skupina ženke; Sinig.M- eksperimentalna skupina mužjaka tretirana vodenom otopinom sinigrina; Sinig.z - eksperimentalna skupina ženki tretirana vodenom otopinom sinigrina.

Iz rezultata dobivenih mjerenjem antioksidacijskog kapaciteta homogenata tkiva miokarda izmjerenih metodom FRAP, utvrđena je statistički značajno povećana vrijednost antioksidacijskog kapaciteta u obje eksperimentalne skupine tretirane vodenim ekstraktima klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\text{RT}_{\text{ekst.}}$  i  $\text{HT}_{\text{ekst.}}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu životinja ( $\Delta p \leq 0,05$ ;  $\Delta\Delta\Delta\Delta p \leq 0,0001$ ) (**Slika 38.a**). Analizom rezultata prilikom razdiobe prema spolu, statistički značajno povećan antioksidacijski kapacitet zapažen je u skupini ženki tretiranih vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\text{RT}_{\text{ekst.z}}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu mužjaka (Kont.M) ( $\Delta\Delta p \leq 0,01$ ) te eksperimentalnoj skupini mužjaka tretiranih vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\text{RT}_{\text{ekst.M}}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu mužjaka (Kont.M;  $\Delta\Delta p \leq 0,01$ ) i kontrolnu skupinu ženki (Kont.z;  $*p \leq 0,05$ ) (**Slika 38.b**).

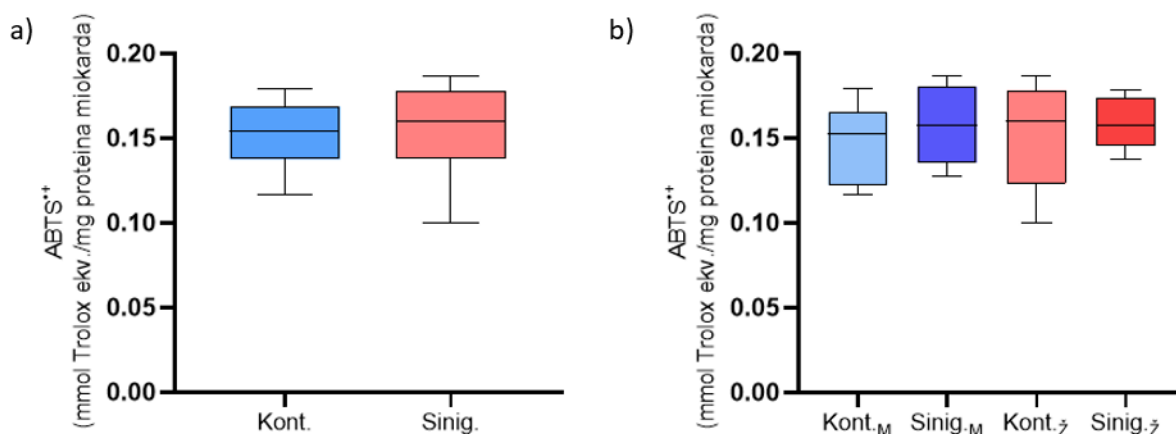


**Slika 38.** Antioksidacijski kapacitet u homogenatima tkiva miokarda određen metodom FRAP: a) bez obzira na spol (n = 10), b) po spolu (n = 5) nakon 28. dana *ig* primjene vodenih ekstrakata klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Rezultati su prikazani kao medijana s interkvartilnim rasponom.  $\Delta$ Statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu mužjaka ( $\Delta p \leq 0,01$ ); \*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ženki ( $*p \leq 0,05$ );  $\blacktriangle$ Statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ( $\blacktriangle p \leq 0,05$ ;  $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle p \leq 0,0001$ ).

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.<sub>M</sub> - kontrolna skupina mužjaci; Kont.<sub>ž</sub> - kontrolna skupina ženke; RT<sub>ekst.-M</sub> – mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; RT<sub>ekst.-ž</sub> - ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; HT<sub>ekst.-M</sub> - mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; HT<sub>ekst.-ž</sub> – ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.6.6. Učinak vodene otopine sinigrina i vodenih otopina ekstrakata klijanaca brokule na antioksidacijski kapacitet tkiva miokarda mjeren metodom ABTS

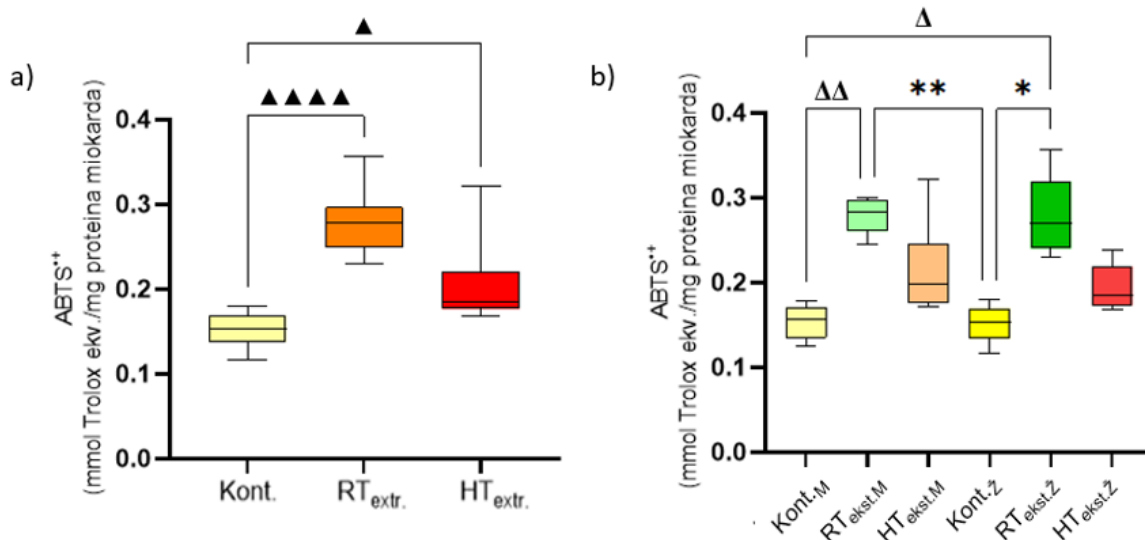
Analizom rezultata antioksidacijskog kapaciteta u homogenatima tkiva miokarda mjerenih metodom ABTS nije uočena statistički značajna razlika u skupini tretiranoj vodenom otopinom singirina (Sinig.) u odnosu na kontrolnu skupinu (Kont.) (**Slika 39.a**). Statistički značajna razlika nije zapažena niti prilikom razdiobe prema spolu (**Slika 39.b**).



**Slika 39.** Antioksidacijski kapacitet u homogenatima tkiva miokarda određen metodom ABTS: a) bez obzira na spol ( $n = 10$ ), b) po spolu ( $n = 5$ ) nakon 28. dana *ig* primjene vodene otopine sinigrina jednom dnevno u dozi od 10 mg/kg tjelesne mase miša. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom.

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.M - kontrolna skupina mužjaci; Kont.ž - kontrolna skupina ženke; Sinig.M- eksperimentalna skupina mužjaka tretirana vodenom otopinom sinigrina; Sinig.ž - eksperimentalna skupina ženki tretirana vodenom otopinom sinigrina.

Iz rezultata dobivenih mjerenjem antioksidacijskog kapaciteta homogenata tkiva miokarda izmjerenih metodom ABTS, utvrđena je statistički značajno povećana vrijednost antioksidacijskog kapaciteta u obje eksperimentalne skupine tretirane vodenim ekstraktima klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ °C}$  i  $t = 38\text{ °C}$  ( $RT_{ekst.}$  i  $HT_{ekst.}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu životinja ( $\Delta p \leq 0,05$ ;  $\Delta\Delta\Delta p \leq 0,0001$ ) (**Slika 40.a**). Analizom rezultata prilikom razdiobe prema spolu, statistički značajno povećan antioksidacijski kapacitet zapažen je u skupini ženki tretiranih vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ °C}$  ( $RT_{ekst.ž}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu ženki (Kont.ž) ( $*p \leq 0,05$ ) te eksperimentalnoj skupini mužjaka tretiranih vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ °C}$  ( $RT_{ekst.M}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu mužjaka (Kont.M;  $\Delta\Delta p \leq 0,01$ ) (**Slika 40.b**). Također, statistički značajno povećane vrijednosti uočene su u skupini ženki tretiranih vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ °C}$  ( $RT_{ekst.ž}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu mužjaka (Kont.M) ( $\Delta p \leq 0,05$ ) te eksperimentalnoj skupini mužjaka tretiranih vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ °C}$  ( $RT_{ekst.M}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu ženki (Kont.ž;  $**p \leq 0,01$ ) (**Slika 40.b**).



**Slika 40.** Antioksidacijski kapacitet u homogenatima tkiva miokarda određen metodom ABTS: a) bez obzira na spol ( $n = 10$ ), b) po spolu ( $n = 5$ ) nakon 28. dana *ig* primjene vodenih ekstrakata klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23$  °C i  $t = 38$  °C. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom. <sup>Δ</sup>Statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu mužjaka (<sup>Δ</sup> $p \leq 0,05$ ; <sup>ΔΔ</sup> $p \leq 0,01$ ); \*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu ženki ( $*p \leq 0,05$ ;  $**p \leq 0,01$ ); <sup>▲</sup>Statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu (<sup>▲</sup> $p \leq 0,01$ ; <sup>▲▲▲▲</sup> $p \leq 0,0001$ ).

Kratice: *ig* – intragastrično; Kont.M - kontrolna skupina mužjaci; Kont.ž - kontrolna skupina ženke; RT<sub>ekst.M</sub> – mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23$  °C; RT<sub>ekst.ž</sub> - ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23$  °C; HT<sub>ekst.M</sub> - mužjaci tretirani vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28$  °C; HT<sub>ekst.ž</sub> – ženke tretirane vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 28$  °C.

## 5. RASPRAVA

U ovoj je disertaciji istražen učinak subkronične primjene vodenih ekstrakata klijanaca brokule uzgajanih pri različitim temperaturama okoline, kao i vodene otopine glukozinolata sinigrina, na strukturne, funkcionalne, metaboličke, upalne parametre miokarda, parametre oksidacijskog stresa te antioksidacijskog kapaciteta tkiva miokarda u eksperimentalnih životinja, miševa Swiss. Također, dodatno je istražen učinak vodenih ekstrakata klijanaca brokule uzgajanih pri različitim temperaturama okoline na osnovne hematološke parametre. Ovo je istraživanje osmišljeno kako bi se ispitalo djelovanje na normalnu fiziologiju miokarda, simulirajući unos klimatski promijenjene hrane, uz opću svrhu provjere biosigurnosti takve hrane za opću populaciju. Za razliku od većine dosadašnjih istraživanja, koja su kardioprotektivne učinke spojeva glukozinolata i polifenola ispitivala na patološkim modelima bolesti poput ishemije (10), dijabetesa (158) ili kemoterapijske kardiotoksičnosti (88), ovo je istraživanje jedinstveno jer promatra utjecaj spomenutih tvari u uvjetima očuvane homeostaze, odnosno u zdravih eksperimentalnih životinja. Isto tako, pregledom dostupne literature, izgledno je da je ovo prvo istraživanje koje je proučavalo učinak promijenjenog fitokemijskog sastava ekstrakata klijanaca brokule, nastalog pod utjecajem različite uzgojne temperature, na fiziološke parametre miokarda sisavaca.

Dobiveni rezultati ukazuju da subkronična izloženost navedenim tvarima dovodi do određenih promjena u miokardu, a najupečatljiviji su rezultati snažnog spolnog dimorfizma u odgovoru na tretman sinigrinom, kao i neočekivani rezultati povećanja biljega oštećenja miokarda (hs-cTnI) nakon tretmana HT ekstraktom. Razlike u opaženim učincima vjerojatno proizlaze iz temperaturno uvjetovanih promjena u fitokemijskom profilu klijanaca brokule. Istovremeno, zapaženi su i potencijalno kardioprotektivni mehanizmi poput promjena u antioksidacijskom kapacitetu kod primjene jednako ekstrakata HT i RT. Posebno su značajne promjene u sadržaju glukozinolata i polifenola, a rezultati ukazuju da ovakve promjene mogu modulirati fiziologiju tkiva miokarda.

### 5.1. *Učinak visoke temperature uzgoja brokule na glukozinolate i različite skupine polifenola u klijancima brokule*

U ovom istraživanju, analiza sastava ekstrakta klijanaca brokule ukazuje kako visoka temperatura uzgoja (HT) značajno utječe na količinu ukupnih glukozinolata, fenola i fenolnih kiselina u brokuli. Pod utjecajem visoke temperature uzgoja razina ukupnih glukozinolata smanjila se za 28 %, fenolnih kiselina za 40 %, dok se razina ukupnih fenola povećala za 30% (**Tablica 2.**). Učinak HT na razine ukupnih flavonoida, hidroksicinamičnih kiselina i flavonola nije bio statistički značajan. Temperatura uzgoja iznimno je bitan parametar tijekom rasta biljke jer utječe na nadzemne i podzemne dijelove biljnog organizma, uzrokujući prilagodbene procese na nekoliko razina, uključivši morfološku, fiziološku i fitokemijsku (4). Rezultati ovog istraživanja u suglasju su s dosadašnjim literaturnim saznanjima. Gmižić i suradnici su u svojem istraživanju, u uvjetima istovjetne temperature uzgoja (38 °C dan/ 33 °C noć) kao u ovom istraživanju, utvrdili sličan rezultat, ali još veći postotni pad razina glukozinolata od 40% u HT ekstraktu u odnosu na RT ekstrakt te nešto manji pad fenolnih kiselina od 22 %. Također, slično rezultatima ovog istraživanja, pod utjecajem visoke temperature porasla je razina ukupnih fenola, i to za 45 % (4). Rodríguez i suradnici (142) su , istražujući učinak visokih temperatura na morfološke i biokemijske karakteristike velikog broja lokalnih populacija brokule tijekom ranog razvoja biljke, primijetili značajno smanjenje ukupnih glukozinolata pri uzgojnoj temperaturi od 30 °C, u odnosu na sadržaj glukozinolata pri uzgojnoj temperaturi od 20 °C. Nadalje, stratificirajući glukozinolate, utvrdili su kako se sadržaj svih spojeva nije smanjio jednako. Dok su se sadržaji glukobrasacina (najzastupljeniji glukozinolat u brokuli) i glukorafanina značajno smanjili pri visokoj uzgojnoj temperaturi, dva glavna alifatska glukozinolata, glucoiberin i glukorafanin, čak su pokazali povećanje pri istoj temperaturi. Još jedan alifatski glukozinolat, sinigrin, koji je korišten pojedinačno u ovom istraživanju, ukazao je trend porasta pri visokoj temperaturi, iako to povećanje nije bilo statistički značajno (142). Međutim, nisu svi literaturni podaci ujednačeni. Ragusa i suradnici su dokazali kako je povišenje temperature klijanja pozitivno utjecalo na sadržaj ukupnih glukozinolata u klijancima brokule. Točnije, pronašli su kako je ukupna razina glukozinolata prilikom uzgoja pri 30 °C bila značajno viša (28,6  $\mu\text{mol/g}$  suhe mase) u odnosu na uzgoj pri 10 °C (7,8  $\mu\text{mol/g}$  suhe mase) (137), što je u suprotnosti s rezultatom ovog istraživanja i padom sadržaja glukozinolata za 28 % prilikom uzgoja pri visokoj temperaturi. Mogući uzrok ovakvoj očitoj razlici rezultata kod uzgoja pri povišenoj temperaturi okoline leži u prirodi same biljke, ali i metodološkim razlikama ovog i

navedenog istraživanja. Naime, poznato je kako pri višoj temperaturi posijane klice rastu brže, što znači da puno prije prođu razvojne faze. Također, dobro je poznata činjenica kako sa starosti biljke sadržaj glukozinolata u klijanima sve više opada (137). Prema Pérez-Balibrea i suradnicima, koncentracija ukupnih glukozinolata opada u razdoblju od trećeg do sedmog dana nakon sijanja, što jasno sugerira da su mlađi klijanci bolji izvor glukozinolata (168). U ovom su istraživanju sve sjemenke podvrgnute istim uvjetima klijanja tijekom 5 dana (23°C/16 sati i 18 °C/ 8 sati). Klijanci su potom podijeljeni u dvije skupine, odnosno izloženi dvjema različitim uzgojnim temperaturama (RT i HT) tijekom 7 dana, nakon čega je učinjena berba. Suprotno tome, kod Ragusa i suradnika, berba klijanaca učinjena je onda, kada pet dana zaredom nije bilo zabilježenog klijanja na Petrijevoj zdjelici. U takvim uvjetima pokusa dolazi do izražaja brži rast klijanaca pri višoj temperaturi, budući da takvi klijanci brže postignu zreliju fazu, ali su unatoč tome „vremenski mlađi“ jer će klijanje prije okončati i prije će ih se ubrati (137). U uvjetima ovog istraživanja, gdje su obje vrste klijanaca ubrane istovremeno, izgledno je da su HT klijanci, zbog bržeg rasta na 33 °C, bili fiziološki razvijeniji od RT klijanaca uzgajanih na 22 °C. Zbog toga je moguće da je za HT klijance 7. dan, odnosno dan berbe, već bio nakon optimalne točke akumulacije glukozinolata, dok je za RT klijance isti dan još uvijek bio unutar optimalnog razdoblja nakupljanja. Zato ne čudi rezultat smanjene količine glukozinolata u HT klijancima u našem i sličnim istraživanjima. Šola i suradnici također su pronašli smanjenu razinu glukozinolata u klijancima brokule uzgajanim pri visokoj temperaturi, i to za 18 % u odnosu na klijance uzgajane pri normalnoj temperaturi. U tom su istraživanju biljke inicijalno bile uzgajane pri normalnoj temperaturi (23 °C/18 °C) kroz 11 dana, a potom su bile izložene 5-dnevnom tretmanu niskom (12 °C/7 °C) i visokom (38 °C/33 °C) temperaturom, nakon čega je učinjena berba. U suprotnosti s rezultatima ovog istraživanja i porastom ukupnih fenola za 30% u HT ekstraktima, Šola i suradnici su utvrdili 6%-tno smanjenje ukupnih fenola u ekstraktima uzgajanim na visokoj temperaturi. Štoviše, uzgoj na HT rezultirao je općenitim osiromašavanjem fitokemijskog sastava klijanaca brokule te je zabilježen postotni pad svih skupina spojeva koje smo u ovom istraživanju mjerili u ekstraktima, uključivši već spomenute glukozinolate (-18 %), ukupne flavonoide (-12 %), ukupne fenolne kiseline (- 10%), ukupne hidroksicinamične kiseline (-19 %) i ukupne flavonole (-20 %) (1). Za usporedbu, u ovom istraživanju, uzgoj na visokoj temperaturi nije rezultirao značajnim promjenama u razinama ukupnih flavonoida, hidroksicinamičnih kiselina i flavonola. S druge strane, u Šole i suradnika tretman niskom temperaturom rezultirao je 20 %-tnim povećanjem sadržaja ukupnih glukozinolata, 15 %-tnim povećanjem ukupnih fenola i diskretnim povećanjem sadržaja ukupnih flavonoida, uz

diskretan pad ukupnih fenolnih kiselina (- 2%) i ukupnih hidroksicinamičnih kiselina (-3 %) (1). Općenito se promjena u sadržaju glukozinolata može opravdati metaboličkim preusmjerenjem resursa za prilagodbu na toplinski stres (1). Čini se da je učinak temperature uzgoja na polifenole nešto složeniji, a visoka i niska temperatura induciraju specifične pomake u strukturnim oblicima polifenola brokule i njihovom antioksidacijskom kapacitetu. Točnije, niska temperatura izgledno povećava slobodne i esterificirane polifenole mikrobilja brokule, dok visoka temperatura uzgoja povećava glikozilirane oblike (146). Ragusa i suradnici su slično rezultatima ovog istraživanja utvrdili kako viša temperatura uzgoja klijanaca brokule pozitivno utječe na sadržaj polifenola u njima, pogotovo na sadržaj sinapoil- derivata (derivati sinapinske kiseline), čiji je sadržaj prilikom uzgoja na 30 °C bio značajno viši od uzgoja na 10 °C i 20 °C. Takav porast sadržaja nekih skupina polifenola odraz je pojačane biosinteze novih polifenolnih spojeva kao odgovor na stres uzrokovan visokom temperaturom (137). Svakako, ovo i druga istraživanja, pronalaze različite biološke učinke tako promijenjenog fitokemijskog sastava brokule. Zato je u kontekstu ovog istraživanja bitan nalaz Šole i suradnika koji su utvrdili smanjeni antioksidacijski kapacitet ekstrakta HT (mjeren metodom ABTS), dok su istovremeno utvrdili da je on povećan u ekstraktu LT (mjeren metodom DPPH i FRAP) (1). U teoriji, ako ekstrakt ima smanjeni antioksidacijski kapacitet, za očekivati je manje izraženo antioksidacijsko djelovanje u živom organizmu, što se može anticipirati kao manje povoljan učinak u nekoj patologiji, koja u podlozi ima oksidacijski stres, ili čak nepovoljno djelovanje. U istraživanju Šole i suradnika sva tri ekstrakata klijanaca brokule, uzgajanih pri različitim temperaturama, značajno su smanjili unutarstaničnu koncentraciju kisikovih radikala potaknutih s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u pet različitim staničnih kultura: mišji embrionalni fibroblasti (MEF), normalni humani kercinociti (HaCaT), hepatocelularni karcinom (HepG2), kolorektalni karcinom (HCT116) i karcinom pluća (H460). Ipak, u usporedbi s ekstraktom uzgajanim pri normalnoj temperaturi, HT i RT ekstrakt imali su značajno smanjenu sposobnost smanjenja kisikovih radikala u MEF, HaCaT i HepG2 staničnim kulturama. H460 bile su najmanje osjetljive na promjenu sastava brokule uzrokovanu temperaturom uzgoja, a općenito je najveće postotno smanjenje kisikovih radikala (36,61 %) uočeno primjenom RT ekstrakta na MEF staničnoj kulturi (1). U ovom istraživanju nije izmjeren antioksidacijski kapacitet u samim ekstraktima, već u homogenatima tkiva miokarda, nakon primjene ekstrakata. Slično gore navedenim rezultatima, primjena obje vrste ekstrakata, kako za HT, tako i za ekstrakt RT, rezultirala je značajnim povišenjem antioksidacijskog kapaciteta u miokardu izmjenjenog metodom FRAP i ABTS. Navedeni se učinak može protumačiti objašnjenjem da visoka temperatura nije

smanjila antioksidacijski kapacitet u ciljanom tkivu, što bismo ponajviše mogli objasniti činjenicom da uzgoj na visokoj temperaturi nije rezultirao smanjenjem, nego čak i povećanjem sadržaja polifenola u ekstraktima klijanaca brokule.

## 5.2. *Učinak ekstrakata klijanaca brokule na hematološke parametre*

U ovom je istraživanju analizom hematoloških parametara zapaženo statistički značajno smanjenje prosječnog volumena trombocita (MPV) u obje skupine tretirane ekstraktima klijanaca brokule (HT<sub>ekst.</sub> i RT<sub>ekst.</sub>) u usporedbi s kontrolnom skupinom životinja ( $p \leq 0,05$ ) (Tablica 3). Osim što je MPV mjera prosječne veličine trombocita u krvi, on reflektira i stanje aktivacije i funkcionalnu sposobnost trombocita (169). Trombociti su inače heterogene veličine, gdje su veći trombociti obično metabolički i enzimatski aktivniji od manjih, sadrže više protrombotskog materijala i imaju veći protrombotski potencijal. Veći trombociti sadrže više tromboksana A<sub>2</sub> i B<sub>2</sub>, više glikoproteina IIb/IIIa receptora, više  $\alpha$ -granula i pokazuju veću sklonost ka agregaciji (169). Istraživanja su pokazala značajnu korelaciju između većeg MPV-a i povećanog rizika za kardiovaskularne događaje. Veći MPV je također povezan s patologijama kao što su ateroskleroza, destabilizacija aterosklerotskog plaka i tromboembolijski incident. S druge strane, snižene vrijednosti MPV-a, osim smanjene funkcionalne sposobnosti trombocita, mogu značiti i manju sklonost trombozi i kardiovaskularnim incidentima (170). U kontekstu našeg istraživanja, odnosno tretmana ekstraktima klijanaca brokule, smanjeni MPV može se protumačiti i kao antitrombocitno djelovanje. Takav rezultat u suglasju je s literaturnim rezultatima. Tako su Al-Qaraghli i Ayed (147) pronašli jasni antitrombocitni učinak ekstrakata klijanaca brokule u albino štakora podvrgnutima imunosupresiji ciklosporinom. U skupini štakora koja je tretirana samo ciklosporinom opaženo je smanjenje porasta tjelesne mase, leukocita, imunoglobulina A, G i M, eritrocita i hemoglobina, dok je broj trombocita bio značajno povećan. U skupinama koje su, osim ciklosporinom, tretirane i prahom klijanaca brokule u koncentracijama od 15% i 30%, zabilježen je porast u tjelesnoj masi i smanjenje broja trombocita, što je bilo približno slično kontrolnoj skupini. Vrijednosti drugih hematoloških i imunoloških parametara također su bile poboljšane u usporedbi na skupinu tretiranu samo ciklosporinom. Autori su pripisali smanjenje broja trombocita antitrombocitnom djelovanju flavonoida prisutnih u prahu klijanaca sjemena brokule (147). Nadalje, van Steenwijk i suradnici (148) proučavali su učinke klijanaca brokule kao izvora glukozinolata i izotiocijanata, osobito sulforafana, na

urinarni 11-dehidrotromboksani B2 (TBX-B2), stabilni metabolit tromboksanina A2, koji se koristi za praćenje biosinteze eikozanoida i odgovora na antitrombotsku terapiju u zdravih ispitanika izloženih kalorijskom preopterećenju. Konzumacija klijanaca brokule prije kalorijskog unosa rezultirala je 50% -tnim smanjenjem koncentracije urinarnog TBX-B2, a količina sulforafana izlučena u urinu negativno je korelirala s 11-dehidro-TXB2. Autori su zaključili da konzumacija svježih klijanaca brokule dovodi do smanjenja agregacije trombocita i da 11-dehidro-TXB2 može služiti kao neinvazivni, osjetljiv i prikladan biološki biljeg za istraživanje akutnih učinaka fitonutrijenata na agregaciju trombocita (148). Antritrombocitna aktivnost ekstrakata klijanaca brokule izgledno je posljedica sinergijskog djelovanja glukozinolata i polifenola u njima, i to djelovanjem preko hidroksilnih skupina, inhibicije aktivacije NF- $\kappa$ B p65, ekspresije P-selektina, TBX-B2 i fosfodiesteraze (149).

Tretman ekstraktima klijanaca brokule nije rezultirao statistički značajnim promjenama u ostalim mjerenim hematološkim parametrima, uključivši broj eritrocita, hemoglobin, MCV, MCH, MCHC, RDW i broj leukocita. U uvjetima ovog istraživanja, odnosno zdravih eksperimentalnih životinja i promijenjenog sastava ekstrakata klijanaca brokule, ovakav nalaz u najmanju ruku možemo protumačiti sigurnošću primjene HT i RT ekstrakata i izostankom hematotoksičnosti. U pojedinim istraživanjima, utvrđena je pak hematotoksičnost tijekom primjene klijanaca srodnih kupusnjača. Paško i suradnici su istraživali učinak klijanaca rutabage ili brukve (*Brassica napus var. napobrassica*), inače poznatih po svom antitiroidnom učinku, na hematološke, biokemijske i imunološke parametre u modelu hipotireoze u štakora. Rezultati su pokazali da je primjena klijanaca rutabage u štakora s hipotireozom pojačala negativni učinak antitiroidnih čimbenika (manjak joda, primjena sulfadimetoksina) što je, između ostalog, bilo vidljivo i kroz povišene razine leukocita, TNF- $\alpha$ , kreatinina i triglicerida, ali i snižene razine trombocita (150). Mahmoud je zaključio da nusproizvodi brokule mogu imati pozitivan učinak na hematološki status janjaca. Naime, u janjaca kojima su nusprodukti brokule činili 40%-tni udio ishrane, zabilježena je statistički značajno povišena razina eritrocita, leukocita, hemoglobina, hematokrita i MCV-a, dok je MCHC bio snižene vrijednosti (171). Pogorzelska i suradnici u svojem su istraživanju, na miševima s trostruko negativnim karcinomom dojke, dokazali da tretman sulforafanom značajno povećava broj eritrocita, razine hemoglobina i broj leukocita u usporedbi sa zdravom kontrolom (151). S druge strane, Papierska i suradnici su dokazali kako dugotrajna (90 dana) prehrana listom kelja ( u dozi do 60 g/kg hrane ) u Wistar štakora proizvodi pozitivne učinke, poglavito u kontekstu poboljšanog antioksidacijskog statusa, ali ne utječe značajno na hematološke parametre (172). Iz opisanog može se primijetiti da je u većini istraživanja, koja

se pronašla statistički značajne promjene u hematološkim parametrima nakon primjene brokule, riječ o nekom patološkom stanju ili modelu bolesti. U našem istraživanju, slično kao i u istraživanju Papierska i suradnika, nije pronađena statistički značajna razlika u vrijednostima hematoloških parametara, a u oba su istraživanja eksperimentalne životinje bile zdrave.

Iako ovo istraživanje nije pronašlo statistički značajnu razliku u broju trombocita između kontrolne i eksperimentalne skupine, značajno niže vrijednosti MPV-a u eksperimentalnim skupinama ukazuju na smanjenu funkciju trombocita. Ova specifičnost djelovanja može značiti da bioaktivni spojevi iz brokule ciljaju specifične putove, bez narušavanja opće hematološke ravnoteže. Ovo podržava potencijalnu uporabu ekstrakata kljanaca brokule kao funkcionalnog dodatka s ciljanim učincima, ali bez neželjenih promjena u široj krvnoj slici.

### 5.3. *Učinak sinigrina i ekstrakata kljanaca brokule na visoko osjetljivi srčani troponin (hs-cTnI)*

Troponin je proteinski kompleks ključan za kontrakciju mišića, a sastoji se od tri podjedinice: troponin C (TnC), troponin I (TnI) i troponin T (TnT). TnC odgovaran je za vezivanje kalcija, a time i za kontrakciju samog miokarda. TnI je inhibitorna podjedinica, a TnT veže tropomiozin. Srčani troponin I (cTnI) i srčani troponin T (cTnT) specifične su izoforme enzima koje se nalaze isključivo u miokardu, a oslobađaju se u krvotok tijekom oštećenja miokarda (173). Upravo su zato visokoosjetljivi biljezi oštećenja miokarda (174). U ovom je istraživanju pronađena statistički značajno povišena vrijednost ( $p < 0,05$ ) hs-cTnI u miokardu eksperimentalne skupine miševa koji su tretirani vodenim ekstraktom kljanaca brokule uzgajanih pri visokoj temperaturi ( $HT_{ekst.}$ ) u odnosu na skupinu koja je tretirana vodenim ekstraktom kljanaca brokule uzgajanih pri normalnoj temperaturi ( $RT_{ekst.}$ ), kao i u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,01$ ) (Slika 14a). U razdiobi po spolu (Slika 14b) uočene su statistički značajno više razine ( $p < 0,05$ ) hs-cTnI u ispitivanoj skupini ženki ( $HT_{ekst.-\text{ž}}$ ) i ispitivanoj skupini mužjaka ( $HT_{ekst.-M}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu mužjaka ( $Kont._M$ ). U drugom dijelu eksperimenta, tretman sinigrinom nije rezultirao statistički značajnim razlikama u koncentracijama hs-cTnI između ispitivane i kontrolne skupine (Slika 13). Naši su rezultati u kontrastu s brojnim istraživanjima koja dokazuju kardioprotektivne učinke ekstrakata kljanaca brokule, kao i glukozinolata i polifenola. Hadi i sur. pronašli su kako

pretretman izotiocijanatom sulfarafanom (u dozi 5 mg/kg tjelesne mase, primijenjen intraperitonealno) značajno reducira ozljedu miokarda u mišjem modelu sepse, i to preko inhibitorynog djelovanja na *toll-like receptor 4* (TLR-4) i NF- $\kappa$ B signalne puteve. U odnosu na skupinu koja je prethodno izazivanju sepse primila sulforafan, skupina koja je primala samo otopinu (bez sulfarofana) imala je značajno povišene vrijednosti TLR-4, IL-6, TNF  $\alpha$ , MIF, ali i CK-MB i cTn-i u srčanom tkivu. Ovaj rezultat je dodatno potvrđen patohistološkim nalazom, u kojem se u kontrolne skupine pronašlo znatno veće oštećenje miokarda, u odnosu na skupinu koja je tretirana sulfarafanom (175). Sergazy i suradnici su u istraživanju na štakorima Wistar pronašli kako groždani koncentrat polifenola prevenira kardiotskični učinak kemoterapeutika doksirubicina. Tretman grožđanim koncentratom polifenola prevenirao je doksirubicinom potaknutu redukciju hemoglobina, akumulaciju slobodnih radikala, ali i redukciju antioksidacijske aktivnosti u krvi. Iako se autori nisu poslužili mjerenjem srčanog troponina u tkivu, kao što je to slučaj u ovom doktorskom radu, kardioprotektivni učinak iščitali su, između ostalog, kroz sniženu vrijednost cirkulirajućeg enzima – aspartat aminotransferazu (AST). AST je, iako zasigurno manje specifičan, slično kao troponin, biljeg oštećenja miokarda i prilikom oštećenja kardiomiocita i „pucanja“ stanica dolazi do njegova oslobađanja u cirkulaciju. Stoga se 20% manja vrijednost cirkulirajućeg AST-a u skupine tretirane polifenolnim ekstraktom, u odnosu na kontrolnu skupinu, može protumačiti kao kardioprotektivni učinak. Međutim, ovaj je nalaz dodatno potvrđen preciznijom metodom elektronske mikroskopije, koja je pokazala normalizaciju ultrastrukturne građe krvnih kapilara i kardiomiocita, nakon toksičnog djelovanja doksirubicina. Štoviše, opazila se potpuna obnova struktura mitohondrija, nestanak subhondralnog edema, normalizacija struktura miofibrila i jasan prikaz glikogenskih granula, ali bez učinka na fokuse unutarstaničnog edema i mijelinizaciju membrana sarkoplazmatskog retikuluma (176). Akhlaghi i Bandy pronašli su kako prehrana klijancima brokule (2% osušeni klijanci) snažno štiti miokard štakora od oksidacijskog stresa i stanične smrti u modelu ishemije-reperfuzije miokarda. Iako nisu direktno mjerili hs-cTnI, zabilježili su značajno smanjenje LDH, kao markera nekroze, kao i 78-86%-tno smanjenje kaspaze-3, kao markera apoptoze (10). Singh i suradnici su pronašli kako sulforafan značajno smanjuje razinu plazmatskog cTnI u miševa izloženih kardiotskičnom djelovanju doksirubicina i predložili su da je srčano zatajenje moguće djelomično preokrenuti tretmanom sulfarafanom (177). U istraživanju Li i suradnika pretretman s I3C (100 mg/ kg TT primijenjen intraperitonealno) je u modelu ishemije/reperfuzije miokarda u miševa uspješno spriječio povećanje infarktne volumena i smanjio markere oštećenja miokarda, poput LDH i CK

(178). Uzevši u obzir da se povišenje hs-cTnI u miokardu u ovom istraživanju može promatrati kao posljedica ozljede miokarda, nameće se pretpostavka o štetnom djelovanju HT ekstrakta, pogotovo zato što se nije opazila povišena koncentracija hs-cTnI za tretman RT ekstraktom i sinigrinom. Kako smo naveli na početku diskusije, visoka temperatura je znatno promijenila količinu ukupnih glukozinolata, fenola i fenolne kiseline u brokuli. U odnosu na RT ekstrakt, u HT ekstraktu sadržaj ukupnih glukozinolata smanjio se za 28%, fenolnih kiselina za 40 %, dok se sadržaj ukupnih fenola povećao za 30 %. Samo povećanje sadržaja fenola ne mora značiti i jačanje antioksidacijskog potencijala ekstrakta. Naime, Šola i suradnici (1) su u svojem istraživanju utvrdili kako visoka i niska temperatura uzgoja brokule značajno smanjuju sposobnost njenih ekstrakata u smanjenju unutarstaničnih razina kisikovih radikala. Također, sami antioksidacijski kapacitet ekstrakta HT, mjeren metodom DPPH i FRAP, niži je u odnosu na ekstrakt RT. (1). Pokazalo se da visoka temperatura uzgoja brokule dominantno utječe na povećanje glikoliziranih polifenola, ali je antioksidacijski kapacitet mjeren metodom DPPH pokazao smanjenje antioksidacijskog kapaciteta tih polifenola (146). Jedno od mogućih tumačanja povišenih vrijednosti troponina je da je ekstrakt HT iz našeg istraživanja sadržavao znatno manje zaštitnih spojeva (glukozinolata) i promijenjen sastav polifenola, što je moglo dovesti do gubitka kardioprotektivnog učinka. Zasad u literaturi nisu opisani štetni učinci ekstrakata klijanaca brokule na miokard. Također, životinje su u pokusu uzgajane u fiziološkim uvetima, stoga ne možemo govoriti o „ gubitku kardioprotektivnog svojstva“. Isto tako, kako je samo serumski, ali ne i tkivni troponin, sigurni biljeg oštećenja, ovakvu povišenu razinu troponina u samom tkivu miokarda ne možemo sa sigurnosti označiti posljedicom oštećenja miokarda. Na temelju svega rečenog, rezultati ovog istraživanja ukazuju da specifična promjena molekula u ekstraktu klijanaca brokule, odnosno promjena sastava glukozinolata i polifenola, može utjecati na neke od čimbenika indukcije sinteze troponina, ali priroda i značaj te indukcije nam je za sada nepoznat i trenutno je nedovoljno informacija da bismo ovaj rezultat označili štetnim ili povoljnim na sam miokard. Svakako su potrebna daljnja istraživanja koja bi detaljnije ispitala učinak aktivnih biomolekula, pogotovo mješavine glukozinolata i polifenola u različitim omjerima, na sintezu troponina u miokardu.

Fiziološka uloga i učinci tretmana u pokusu :

- hs-cTnI regulator je kontrakcije kardiomiocita; inhibira interakciju aktina i miozina u odsutnosti  $Ca^{2+}$  i omogućuje preciznu kontrolu kontrakcije, a prilikom oštećenja miokarda oslobađa se u krvotok te služi kao visokoosjetljivi dijagnostički biljeg (174).

- ekstrakt HT – primjena je rezultirala statistički značajnim povišenjem hs-cTnI u miokardu, što upućuje na moguće promjene kardioprotektivnog djelovanja ili indukciju sinteze
- ekstrakt RT– primjena nije rezultirala povišenjem razina u odnosu na kontrolnu skupinu.
- Sinigrin – nema učinka na razinu hs-cTnI; nije zabilježena statistički značajna razlika u koncentracijama između tretirane i kontrolne skupine.

#### 5.4. Učinak sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule na atrijski natrijuretski peptid (ANP)

U ovom istraživanju subkronična primjena sinigrina rezultirala je statistički značajnom razlikom u koncentraciji ANP-a u miokardu ženki ispitivane skupine (Sinig.ž) u odnosu na ženke kontrolne skupine ( $p < 0,01$ ) i mužjake ispitivane skupine (Sinig. M) ( $p < 0,05$ ). Dodatan rezultat je da su ženke kontrolne skupine imale statistički značajno više koncentracije ANP-a u odnosu na kontrolnu skupinu mužjaka (**Slika 15**). ANP je hormon koji se oslobađa iz pretklijetki (atrija) srca, kao odgovor na istežanje srčanog zida, obično zbog povećanog volumena krvi ili povišenog krvnog tlaka. Općenito je prihvaćeno kako se ANP dominantno proizvodi u pretklijetkama, a BNP u ventrikulima (179). Iako oba peptida imaju kardioprotektivni učinak, BNP je osjetljiviji pokazatelj kod težeg opterećenja srca (180). Uloga ANP-a je regulacija ravnoteže tekućine i elektrolita, krvnog tlaka i funkcije srca, bubrega i krvnih žila, stoga se često koristi kao biološki biljeg za procjenu srčanog stresa, zatajenja srca i srčane hipertrofije. (179). U istraživanjima koja se bave učinkom različitih spojeva na zdravlje srca, poglavito hipertrofiju, osim cirkulirajućeg ANP-a, ustaljeno je mjerenje ANP-a u homogenatima miokarda, kao što je to učinjeno i ovom istraživanju (181). Analiza rezultata pokazala je povišenu koncentraciju ANP-a u miokardu u kontrolnoj skupini ženki u odnosu na kontrolnu skupinu mužjaka, što potencijalno sugerira da su bile izložene nekom stresu ili da fiziološki ženke imaju povišene razine ANP-a u odnosu na mužjake. Prva premisa, koja se tiče stresa, manje je izgledna, iako se teoretski ne može otkloniti. Mužjaci i ženke su u eksperimentu bili izloženi jednakim i kontroliranim uvjetima pokusa, s neograničenim pristupom hrani i vodi, stoga je moguće otkloniti utjecaj vanjskog stresora koji bi mogao činiti razliku u spolnim skupinama. Ovaj bi se, relativno neočekivani

rezultat našeg istraživanja, mogao objasniti spolnim razlikama u ANP-u. Iako se distenzijaatrijskog i ventrikularnog zida, odnosno kardiomiocita, općenito smatra glavnim mehaničkim stimulusom za proizvodnju ANP-a i BNP-a u miokardu, snažni stimulatori proizvodnje jesu i endotelin-1,  $\alpha$ -adrenergički agonisti i angiotenzin II, ali i glukokortikoidi, hormoni štitnjače, ženski spolni hormoni, čimbenici rasta i pojedini citokini (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) (182). Iz prethodno navedenog, upravo bi spolni hormoni mogli biti odgovorni za upadljiv rezultat povišenog ANP-a u skupini ženki ovog istraživanja. U tom kontekstu zanimljivi su rezultati istraživanja koje su proveli Kawano i sur. (183). Iako je istraživanje provedeno na ženama, a ne miševima, te BNP-u, a ne ANP-u, zanimljiv je rezultat u kojem se pokazalo da je jednako transdermalna i peroralna nadomjesna hormonska terapija estrogenom dovela do povećanja cirkulirajućeg BNP-a u ispitivanih žena. Serijskim ehokardiografijama isključile su se negativne posljedice po ventrikularnu funkciju miokarda, a u žena koje su imale neugodne senzacije u prsima povezane s premenopauzalnim tegobama, zabilježilo se znatno poboljšanje istih. Iz toga bi se dalo zaključiti kako povišena razina BNP-a, šire i ANP-a, ne mora nužno biti posljedica srčanog stresa, već može biti i fiziološka prilagodba koja je izraženija u ženskom spolu (183). Skupina talijanskih autora iznijedrila je slične rezultate, ali u postmenopauzalnih žena, gdje je dokazano kako tromjesečna primjene hormonske nadomjesne terapije dovodi do povišenih razina cirkulirajućeg BNP-a i ANP-a, također bez negativnih reperkusija na srce. Autori su čak predložili kako je moguće da natrijuretski peptidi, ANP i BNP, općenito imaju važnu ulogu u provođenju kardioprotektivnog djelovanja ženskih spolnih hormona i da su možda upravo oni odgovorni za znatno manju stopu kardiovaskularnog morbiditeta u premenopauzalnih žena, u odnosu na muškarce (184). Na tragu navedenog, Holditch i suradnici usmjerili su svoje istraživanje na kardiovaskularne posljedice genetske delecije BNP-a u ženki štakora (Nppb $^{-/-}$ ). Iako su vrijednost krvnog tlaka u odnosu na kontrolu bile nepromijenjene, u značajnog broja ženki iz skupine s genetskom delecijom BNP-a neočivano se razvio mezenterični vaskulitis sličan *poliarteritis nodosa*, koji podrazumijeva značajan stupanj upale i arterijskog remodeliranja, što dodatno naglašava protektivno djelovanje tog hormona miokarda (185). Iako postoje konfliktne rezultati oko utjecaja ženskih spolnih hormona na endokrinu funkciju miokarda, odnosno proizvodnju ANP-a i BNP-a, pokazalo se da ženski spolni hormoni mogu dovesti to povećanja genske ekspresije ANP-a na način ovisan o dozi i da su jednako estradiol i progesteron neophodni za održavanje primjerenih razina genske ekspresije ANP-a u kardiomiocitima štakora (182). Konsenzus dosadašnjih saznanja, od čega je dio izložen i

ovdje, može objasniti rezultat povišenih razina ANP-a u homogenatima tkiva miokarda kontrolne skupine ženki u odnosu na kontrolnu skupinu mužjaka.

Drugi statistički značajan rezultat vezan za koncentracije ANP-a u miokardu bio je opažanje značajno nižih razina ANP-a u skupini ženki tretiranih sinigrinom, u odnosu na ženke kontrolne skupine. Ako ANP promatramo kao biljeg srčanog stresa, ovakav rezultat se može protumačiti kao kardioprotektivno djelovanje sinigrina. S druge strane, s obzirom na prethodno opisanu ulogu ANP-a u zaštiti ženskog srca, snižene razine ANP-a moguće je tumačiti i kao gubitak dijela njegova protektivnog učinka. U istraživanju na zečjem modelu srčanog zatajenja Ma i suradnici (111) pronašli su kako primjena sulforafana dovodi do poboljšanja srčane funkcije, između ostalog, vidljivo i kroz koncentraciju ANP-u u homogenatu miokarda. Skupina zečeva koja je subkutano primala sulforafan (0.5 mg/ kg 5 x tjedno/12 tjedana) imala je statistički značajno niže koncentracije ANP-u u homogenatima tkiva miokarda, u odnosu na skupinu koja ga nije primala. Isto tako, obje spomenute skupine imale su znatno više koncentracije ANP-a u odnosu na zdravu kontrolu (bez zatajenja srca), što je potvrda uloge ANP-a kao markera srčanog stresa, odnosno zatajenja (111). Za usporedbu, eksperimentalne životinje u našem istraživanju bile su zdrave, stoga se s oprezom treba uzeti premisa da je ANP u našem slučaju bio odraz stresa na miokard. Ipak, neupitno je da je primjena sinigrina povezana s promjenama u njegovoj koncentraciji u tkivu miokarda. Postoje jasni dokazi da glukozinolati i polifenoli mogu direktno utjecati na ekspresiju ANP-a unutar kardiomiocita. Dong i suradnici pronašli su kako (-)-epikatehin, polifenol iz skupine flavonoida, direktno utječe na proteinsku ekspresiju ANP-a i BNP-a u kardiomiocitima, i to preko signalnog puta SP1/SIRT1, koji ima istaknutu ulogu u metaboličkoj ravnoteži, zdravlju srca i upali općenito. U kultiviranim kardiomiocitima neonatalnih miševa dvotjedna primjena epikatehina (1 $\mu$ M) značajno je inhibirala angiotenzinom II (1 $\mu$ M) inducirano povećanje kardiomiocita (znak hipertrofije miokarda) i povišenje razina ANP-a i BNP-a, a učinak je bio popraćen povišenjem genskih ekspresija komponentni signalnog puta SP1/SIRT1, dok je inhibicija spomenutog signalnog puta poništila učinak (186). Do sličnog rezultata je došla i skupina kineskih autora, u metodološki sličnom istraživanju, na kulturi kardiomiocita neonatalnih štakora, ali primjenom flavonoida *Dracocephalum heterophyllum Benth flavonoid (DHBF)*, poznatog u tibetanskoj narodnoj medicini. Slično epikatehinu, primjena DHBP rezultirala je inhibitornim djelovanjem na angiotenzinom II izazvanu hipertrofiju i direktno je utjecala na smanjenje ekspresije ANP-a i BNP-a u miokardu. Iako nisu ispitivali signalni put, predložili su moguće djelovanje putem NO i Ca<sup>2+</sup> (187).

U dijelu istraživanja u kojem su se kao eksperimentalna intervencija koristili vodeni ekstrakti klijanaca brokule, nije zapažena statistički značajna razlika u koncentracijama ANP-a u homeogamatima tkiva miokarda između eksperimentalne i kontrolne skupine, kao ni prilikom razdiobe skupina prema spolu (Slika 16.). Mogući uzrok tome je miješani sastav ekstrakata klijanaca brokule, koji osim sinigrina, sadrži druge glukozinolate, ali i polifenole, s brojnim kompleksnim, moguće i međusobno poništavajućim učinkom ili nedovoljnom koncentracijom biološki aktivnih sastojaka. Xu i suradnici (158) su u svojem istraživanju utvrdili kako ekstrakti klijanaca brokule mogu prevenirati dijabetičku kardiomiopatiju putem aktivacije Nrf2, slično kao sulforafan, spoj koji je inače poznat po svojem poticajnom djelovanju na Nrf2. U tom smislu, pronašli su kako primjena ekstrakta klijanaca brokule rezultira sniženjem vrijednosti ANP-a u tkivu miokarda, kao markera kardiomiopatije. Važno je istaknuti razlike u odnosu na eksperiment iz ove doktorske disertacije. Prvenstveno, za razliku od 28 dana, istraživači su primijenjivali ekstrakt klijanaca brokule ukupno 3 mjeseca, svaki drugi dan. Također, koristili su visoke doze ekstrakata klijanaca brokule, koje su bile ekvivalentne dozi sulforafana od 1 mg/ kg. Iako su i niske doze ekstrakata klijanaca brokule, koje su ekvivalentne dozi sulforafana od 0.5 mg/ kg (dvostruko manja doza), proizvele pozitivan učinak, on je ipak bio puno vidljiviji prilikom primjene visokih doza klijanaca brokule (158). Ovo bi moglo potkrijepiti objašnjenje našeg rezultata da u ekstraktima klijanaca brokule nije bilo dovoljno visoke koncentracije biološki aktivnog spoja, npr. sinigrina, koji bi proizveli vidljivi učinak. Metodološki, istraživači su dozu ekstrakata klijanaca brokule prilagodili vrijednosti spoja (sulforafana), čije im je djelovanje bilo dobro poznato od prije. Doza vodenog ekstrakta klijanaca brokule u našem je istraživanju bila 300 mg suhog biljnog ekstrakta/kg tjelesne mase miša. Uzevši u obzir ukupni sadržaj glukozinolata u ekstraktima RT i HT, izražene u obliku ekvivalenta sinigrina (RT -  $22.70 \pm 2.30$  mg SinE/g suhe mase; HT -  $16.44 \pm 2.41$  mg SinE/g suhe mase), miševi ispitivanih skupina su dnevno primali 6,81 mg SinE /kg TT / dan ako su primali ekstrakt RT i 4,93 mg SinE / kg TT /dan ako su primali ekstrakt HT. Te su vrijednosti usporedive, ali ipak značajno niže od doze sinigrina od 10 mg/kg TT koja je korištena u dijelu eksperimenta sa sinigrinom, a koja je ujedno i rezultirala statistički značajnom promjenom vrijednosti ANP-a. Ako se vratimo na usporedbu sa istraživanjem Xu i suradnika, važno je istaknuti očitu razliku – eksperimentalne su životinje u ovom istraživanju bile zdrave, a kod prethodno navedenog istraživanja životinje su imale šećernu bolest (model dijabetesa). Logično se čini da je učinak na vrijednosti ANP-a izgledno lakše uočiti kod patološki promijenjenog miokarda, kakav je obično u modelu šećerne bolesti.

Fiziološka uloga i učinci tretmana u pokusu:

- ANP – hormon koji regulira volumen tekućine i krvni tlak; u miokardu sudjeluje u odgovoru na istežanje srčanog zida i ima antihipertrofični učinak (179) (181).
- Sinigrin – ima učinak (potencijalno kardioprotektivan); subkronična primjena rezultirala je statistički značajno nižim koncentracijama ANP-a u miokardu tretiranih ženki u odnosu na ženke kontrolne skupine
- ekstrakt RT – nema značajnog učinka; nije zabilježena statistički značajna razlika u koncentracijama ANP-a
- ekstrakt HT – nema značajnog učinka; jednako kao i kod RT ekstrakta.

#### 5.5. Učinak sinigrina na metaboličke parametre miokarda – irizin, adropin i acil-CoA oksidazu (ACOX1)

U ovom je istraživanju nakon 28 dana svakodnevne *ig* primjene vodene otopine sinigrina utvrđena statistički značajno povišena koncentracija irizina u homogenitima tkiva miokarda u eksperimentalnoj skupini ženki u odnosu na kontrolnu skupinu ženki ( $*p \leq 0,05$ ) i eksperimentalnu skupinu mužjaka ( $p \leq 0,05$ ) (Slika 17.). Irizin je miokin/ adipokin koji se u krvotok oslobađa nakon cijepanja membranskog proteina 5 (FNDC5, eng. *fibronectin type III domain- containing protein 5*), što je potaknuto mišićnom kontrakcijom. Irizin se ponajviše oslobađa iz skeletnih mišića i miokarda tijekom tjelovježbe. Dosadašnja istraživanja o irizinu sugeriraju njegove brojne fiziološke učinke u organizmu životinja i čovjeka, pogotovo one koji se tiču regulacije raznih endokrinih i metaboličkih funkcija (188). Primjerice, za cirkulirajući irizin utvrđeno je da povećava izražaj UCP1 (eng. *mitochondrial uncoupling protein 1*), koji olakšava konverziju bijelog u smeđe masno tkivo, ali i sudjeluje u regulaciji homeostaze lipida i glukoze (189). Upravo su zato brojna istraživanja usmjerena na terapijski potencijal u liječenju metaboličkih poremećaja kao što su pretilost i dijabetes tip II. Isto tako, recentna su istraživanja pokazala kako je disfunkcija irizina izgledno povezana s kardiovaskularnim bolestima poput arterijske hipertenzije, koronarne arterijske bolesti, infarktomiokarda i ishemijsko-reperfuzijskom ozljedom miokarda. Dodatno, neke varijante

gena za irizin povezane su s kardiovaskularnim bolestima (190). Iako je važnost irizina neupitna, rezultati istraživanja koja su proučavala odnos između razina irizina i fizičke aktivnosti ponešto su kontradiktorni. Tako su primjerice u pacijenata s dijabetesom tip II pronađene statistički značajno niže razine cirkulirajućeg irizina u odnosu na zdrave pojedince, dok su pak u morbidno pretilih pacijenata pronađene statistički značajno povišene razine ovog miokina u odnosu na pojedince s normalnom tjelesnom masom (191). Prema dosadašnjim istraživanjima koncentracija irizina u tijelu povećava se s fizičkom aktivnosti. Nakon tjelesne aktivnosti, skeletni mišići i miokard proizvode irizin i druge razne citokine i peptide, poput IL-6, IL-8, IL-15, čimbenika rasta fibroblasta i moždanog neurotrofnog čimbenika (eng. *brain-derived neurotrophic factor, BDNF*). Ovi miokini, zajedno s irizinom, moduliraju energetske homeostazu i utjecaj tjelesne aktivnosti na kardiovaskularni sustav. Zanimljivo je spomenuti da kardiomiociti proizvode više irizina nego skeletni mišići (192). Zbog spomenutog, potpuno je validno izmjeriti koncentraciju irizina u homogenatu tkiva miokarda, kao što je učinjeno i u ovom istraživanju. Nakon ozljede miokarda, kardiomiociti započinju obnavljačke procese koji su povezani s oksidacijskim stresom, apoptozom, upalom i energetske homeostazom, gdje se vjeruje kako irizin ima jednu od vodećih uloga. Irizin potiče obnovu induciranu srčanim progenitorskim stanicama. Dodatno, djelujući putem eNOS signalizacije, irizin može modulirati krvni tlak i endotelnu disfunkciju. Ipak, slično kao što je navedeno za istraživanja koja su proučavala pretilost i šećernu bolest, brojna istraživanja koja su proučavale razine irizina i njihovu prognostičku vrijednost u kardiovaskularnim bolestima, pružila su relativno konfliktne rezultate, sugerirajući mogućnost da irizin ima različitu, odnosno dvostruku ulogu, u različitim fazama kardiovaskularnih bolesti (192). Također, poznato je kako su fiziološke vrijednosti irizina u ljudi i glodavaca podložne utjecaju nekoliko čimbenika, uključivši tjelesnu aktivnost, pretilost, dijetu, bolesti i izloženost različitim lijekovima (193). Iako ne postoji jasan konsenzus oko fizioloških vrijednosti irizina, smatra se kako postoji spolni dimorfizam u razinama irizina, gdje je ženski spol neovisno povezan s višim koncentracijama irizina (194), što je u skladu s rezultatima našeg istraživanja. Naime, u našem je istraživanju pronađena statistički značajno povišena koncentracija irizina u homogenatima tkiva miokarda ispitivane skupine ženki u odnosu prema, jednako kontrolnoj skupini ženki, ali i ispitivanoj skupini mužjaka, koji su također tretirani sinigrinom. Međutim, rezultati istraživanja općenito su nedosljedni; dok se s jedne strane, u istraživanjima pronalazi povišena razina irizina u žena i djevojčica, s druge strane u pojedinim istraživanjima nisu pronađene statistički značajne razlike u koncentracijama irizina između spolova (195). Također, čini se da je prolazno povećanje razina serumskog irizina nakon akutne tjelovježbe

više naglašeno u vitkih, „fizički spremnijih“, žena, nego li u muškaraca (193). Postoji pretpostavka kako su razine cirkulirajućeg irizina, ali i njegove koncentracije u tkivima, pod značajnim utjecajem koncentracija spolnih hormona. Tako su Garcés i suradnici (191) pronašli kako su koncentracije cirkulirajućeg irizina ovisne o razinama ženskih spolnih hormona. Njihovo istraživanje otkriva kako su u zdravih žena s održanim menstrualnim krvarenjem (eumenorejične žene) serumske koncentracije irizina za 26 % više tijekom lutealne faze, u usporedbi s folikularnom fazom menstrualnog ciklusa. Isto tako, pronađeno je kako su serumske koncentracije irizina tijekom trudnoće više u usporedbi s koncentracijama irizina tijekom folikularne i lutealne faze menstrualnog ciklusa u žena koje nisu trudne (191). Ovi rezultati sugeriraju kako razine irizina variraju ovisno o različitim fazama menstrualnog ciklusa. 17  $\beta$ - estradiol (E2) može utjecati na razine irizina kroz djelovanje na anaboličke procese i povećanje mišićne mase, potencijalno dovodeći do veće ekspresije irizina i inducirajući mehanizme irizinske rezistencije. Ovo je potkrijepljeno opažanjem da visoka koncentracija cirkulirajućeg irizina kolerira s oslabljenom tolerancijom glukoze, s time da je spomenuta koleracija izraženija u djevojčica nego li u dječaka (194). Nadalje, spolnom dimorfizmu u razinama irizina mogle bi doprinosti i razlike u sastavu i rasporedu masnog tkiva između spolova. Točnije, smeđe masno tkivo je poznato po većoj proizvodnji irizina, a žene, barem u odrasloj dobi, obično imaju više aktivnog masnog tkiva u usporedbi s muškarcima. Dodatno, irizin proizvodi i bijelo masno tkivo, čija distribucija, što je i općenito poznato, također pokazuje očiti spolni dimorfizam (195). Istraživanje provedeno na mladim i zdravim pojedincima pokazalo je kako je „nemasna“ tjelesna masa (eng. *lean body mass*), koja odgovara vrijednosti dobivenoj oduzimanjem mase masti od ukupne tjelesne mase, snažni pozitivni prediktor razina irizina, s napomenom da su te razine više u žena nego li u muškaraca (194). Dokazi spolnog dimorfizma u distribuciji i učinku irizina opažene su u istraživanju koje je identificiralo irizin u središnjem živčanom sustavu. Specifičnije, istraživanje provedeno na uzorcima mozgovca majmuna otkrilo je različitost u distribuciji FNDC5 (preteča irizina) i PGC-1 $\alpha$  (eng. *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha*) između spolova. U ženki su hipofiza i stražnji hipotalamus pokazali statistički značajno više transkripcijske razine FNDC5 i PGC1A u usporedbi s mužjacima (196). Uzevši u obzir da je u ovom istraživanju zapažena statistički značajna razlika u koncentracijama irizina u homogenatima tkiva miokarda između eksperimentalne i kontrolne skupine ženki, kao i eksperimentalne skupine ženki i mužjaka, ali ne i između kontrolne skupine mužjaka (Cont.<sub>M</sub>) i ženki (Cont.<sub>ž</sub>), ne možemo u potpunosti uspoređivati naše rezultate s prethodno predstavljenim istraživanjima. Ipak, ono što možemo reći je da se ovaj

rezultat može uklopiti u mozaičnu sliku o spolnom dimorfizmu irizina.

Parsanathan and Jain (197) istraživali su utjecaj manjka  $H_2S$  na smanjenu sekreciju FNDC5 i irizina, kao i na metabolizam glukoze u miševa. U miševa hranjenih dijetom s visokim udjelom masti uočene su povišene razine glukoze, skupa sa značajno sniženim razinama  $H_2S$ , PGC-1 $\alpha$  i cistationin  $\gamma$ -liaze (CSE), enzima koji proizvodi  $H_2S$ . Dodatno, miševi hranjeni dijetom s visokim udjelom masti imali su snižene razine FNDC5/irizina i povišene parametre oksidacijskog stresa u svojim mišićima u odnosu na kontrolnu skupinu. Visoke razine glukoze ili palmitata reducirale su razine CSE/PGC-1 $\alpha$ /FNDC5 i unos glukoze u miotubule. Inhibitori enzima koji proizvode  $H_2S$  (propargilglicin i aminooksiacetat) ili siRNA za CSE značajno su smanjili razine  $H_2S$  i FNDC5 zajedno s PGC-1 $\alpha$ ; slični uvjeti nedostatka  $H_2S$  također su doveli do smanjene ekspresije GLUT4 i unosa glukoze. Razine  $H_2S$ , PGC-1 $\alpha$  i FNDC5, kao i unosa glukoze, bile su značajno povišene nakon tretmana s l-cisteinom ili donorom  $H_2S$ . Autori su sugerirali da povećanje razina  $H_2S$  može imati korisne učinke na homeostazu glukoze putem aktivacije signalnog puta PGC-1 $\alpha$ /FNDC5/irizin (197). U kontekstu ovog istraživanja, statistički značajno povišenje koncentracije irizina u ženki miševa tretiranih vodenom otopinom sinigrina u usporedbi s kontrolnom skupinom ženki moglo bi se potencijalno povezati sa sposobnošću sinigrina da donira  $H_2S$ . Povećana koncentracija  $H_2S$ , posredstvom sinigrina, mogla je rezultirati pojačanom aktivacijom signalnog puta PGC-1 $\alpha$ /FNDC5/irizin. Međutim, priroda ove veze ostaje nepoznata, stoga naglašavamo da je ova hipoteza tek indikativna, otvarajući potencijalne smjerove i mogućnosti za daljnja istraživanja.

Analizirajući dobivene vrijednosti ANP-a između eksperimentalnih skupina, posebno je zanimljivo istaknuti da ženke miševa tretirane vodenom otopinom sinigrina (Sinig. $\_z$ ) imaju statistički značajno niže koncentracije ANP-a u usporedbi s kontrolnom skupinom ženki (Kont. $\_z$ ) kao i usporedbi s mužjacima tretiranim vodenom otopinom sinigrina (Sinig. $\_m$ ) (**Slika 15**). Ovaj se rezultat može interpretirati kao moguća posljedica statistički značajnog povišenja koncentracije irizina u miokardu ženki tretiranih vodenom otopinom sinigrina. Naime, Li i suradnici (198) su predložili da irizin sprječava porast razine mRNA ANP-a u miokardu, kao odgovor na hipertrofiju izazvanu preopterećenjem tlakom. Stoga je vjerojatno da modulacija proizvodnje ANP-a nije izravan učinak irizina, već njegov neizravni inhibicijski učinak na hipertrofiju i remodeliranje srčanog tkiva. Ovu tezu potvrđuju rezultati njihovog istraživanja na životinjskom modelu srčane hipertrofije. U normalnim uvjetima nisu pronađene značajne razlike u razinama ANP-a između FNDC5 "knockout" miševa, miševa divljeg tipa ili FNDC5 transgeničnih miševa. U modelu srčane hipertrofije, izazvane poprečnom konstrikcijom aorte,

značajno povišene razine ANP-a pronađene su u srcima miševa divljeg tipa, dok su još više razine opažene kod FNDC5 "knockout" miševa. Nasuprot tome, FNDC5 transgenični miševi pokazali su značajno smanjene razine ANP-a u usporedbi s miševima divljeg tipa. Rezultati prethodno predstavljenog istraživanja podržavaju zaštitnu ulogu irizina isključivo u prisutnosti hipertrofičnih podražaja. Iako se rezultati spomenutog istraživanja ne podudaraju u potpunosti s rezultatima ovog istraživanja – gdje je značajan pad razine ANP-a opažen specifično u skupini sa značajno povišenom razinom irizina u miokardu, bez prisutnosti hipertrofičnog podražaja – važno je napomenuti da je naše istraživanje uključivalo skupinu tretiranu sinigrinom. Za sinigrin su, osim povoljnih učinaka, također zabilježeni i negativni utjecaji na miokard. Slično hipertrofiji u prethodno opisanom istraživanju, ti bi negativni učinci mogli poslužiti kao poticaj za "aktiviranje" zaštitnog učinka irizina. Konkretno, za sinigrin, odnosno njegov aktivni oblik, AITC, opisani su neželjeni učinci pri inhalaciji ovog spoja. U normotenzivnih i spontano hipertenzivnih štakora opaženi su simptomi poput bradikardije, atrioventrikularnog bloka, produljenog PR intervala i bifaznog odgovora krvnog tlaka. Dodatno, u spontano hipertenzivnih štakora, AITC je izazvao abnormalan obrazac elektrokardiograma, karakteriziran povećanom pojavom negativnih P valova, njihovim produljenim trajanjem te produljenim intervalima PR i RR u usporedbi s kontrolnom skupinom (25).

Adropin je relativno nedavno otkriven peptidni hormon, kodiran genom *Enho* (eng. *energy homeostasis-associated*), koji posjeduje važnu ulogu u održavanju energetske homeostaze te regulaciji metabolizma glukoze i masnih kiselina (199). Prvenstveno se izlučuje iz jetre, ali se njegovi učinci očituju i na drugim organima, uključivši srce, gdje modulira metabolizam energije i vaskularnu funkciju (200). Općenito, adropin doprinosi kardiovaskularnom zdravlju djelujući na endotelnu funkciju, modulacijom lipidnog profila te smanjenjem oksidacijskog stresa (201). Svoju vazoprotektivnu ulogu uglavnom ostvaruje utjecajem na sintezu NO u endotelu (202). U ovom istraživanju nije se se uočila statistički značajna razlika u koncentracijama adropina u homogenatima tkiva miokarda između eksperimentalne skupine tretirane sinigrinom i kontrolne skupine (**Slika 18.**). Razlika nije bilo niti prilikom razdiobe prema spolu. Nastavno na prethodno spomenuti mehanizam djelovanja preko NO, valja istaknuti kako nije bilo statistički značajnih razlika niti u koncentracijama NO u homogenatima tkiva miokarda između eksperimentalne skupine tretirane sinigrinom i kontrolne skupine, a statistički uočljivih rezultata nije bilo niti prilikom razdiobe prema spolu (**Slika 27.**). Iako naši rezultati nisu pokazali spolni dimorfizam kod adropina, druga su istraživanja pokazala značajne razlike u regulaciji adropina između spolova. Istraživanje

Meda i sur. (203) pronašlo je kako adropin pokazuje o spolu ovisnu regulaciju preko estrogenskog receptoru  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) u jetri miševa, posebno u uvjetima prehrane bogate mastima, zaključivši kako bi indukcija proizvodnje adropina preko  $ER\alpha$  mogla biti validni terapijski pristup smanjenju ili prevenciji masne bolesti jetre (203). Ghoshal i suradnici (204) potvrdili su spolni dimorfizam za adropin i u ljudi, mjereći njegovu koncentraciju u plazmi nakon noćnog posta. Naime, rezultati su pokazali kako je koncentracija adropina u plazmi obrnutno proporcionalna vrijednosti aterogenog LDL-kolesterola (LDL-C) u muškaraca, ali ne i u žena (204). S obzirom da je uistinu ograničen broj istraživanja koja su proučavala utjecaj određene fitokemikalije na razinu adropina u srcu, ovo bi istraživanje izgledno bio jedno od prvih koje bi proučalo navedeno. Li i suradnici (205) su u svojem istraživanju proučavali utjecaj miricetina na razinu cirkulirajućeg adropina u dijabetičkih štakora. Utvrdili su kako miricetin, flavonoid prisutan u voću, povrću i određenim čajevima, potiče proizvodnju adropina u jetri, ponajviše preko receptora GLP-1, što posljedično dovodi do povećanja endogenog beta-endorfina. Iako su autori istraživali učinak miricetina na adropin u kontekstu utjecaja na šećernu bolest, a ne konkretno na miokard, ovo je istraživanje pokazalo da jedan polifenol iz skupine flavonoida, kao sekundarni biljni metabolit, može direktno utjecati na proizvodnju adropina i njegove koncentracije u tkivima. S obzirom da se adropin većinski proizvodi u jetri i iz nje otpušta u cirkulaciju, ne iznenađuje rezultat ovog istraživanja i nepostojanje statistički značajne razlike u njegovim koncentracijama u homogenatima tkiva miokarda između eksperimentalne i kontrolne skupine. Ovo bi se istraživanje moglo proširiti s novim mjerenjima, primjerice mjerenjem koncentracije adropina u plazmi ili u homogenatu jetre. Također, upitno je postoji li korelacija opisana u istraživanju Li i suradnika, odnosno indukcija proizvodnje adropina djelovanjem biljnih metabolita, izvan određenih patofizioloških uvjeta (npr. šećerna bolest), točnije na zdravim životinjama, kao što je to bio slučaj u ovom istraživanju. Unatoč činjenici da se u ovom istraživanju mjerenjem razina adropina u homogenatima tkiva miokarda dobio neutralan rezultate, takav nalaz ipak ukazuje da subkronična primjena glukozinolata, kao što je sinigrin, ne utječe na ekspresiju adropina u tkivu miokarda pokusnih životinja. Poučeni tim rezultatima, mogu se predložiti daljnja istraživanja koja bi mogla polučiti novim saznanjima. Ukoliko bi se u budućnosti htio proučavati učinak glukozinolata i/ili polifenola na proizvodnju adropina, prijedlog bi svakako bio provesti istraživanje na pokusnim životinjama sa šećernom bolesti ili pretilosti, a ne zdravim životinjama, a koncentraciju adropina izmjeriti u plazmi ili homogenatu jetre, kao organu gdje se miokin i proizvodi. Također, istraživanje bi trebalo proširiti i s molekularnom analizom, radi otkrivanja mogućih signalnih puteva. Prema dosad dostupnim podacima

izgledno je da adropin, slično kao i irizin, pokazuje spolni dimorfizam, stoga bi bilo poželjno na adekvatan način organizirati pokusne životinje.

ACOX1 je ključni enzim u peroksisomalnoj oksidaciji masnih kiselina. U miokardu, ovaj enzim igra presudnu ulogu u energetskeg metabolizmu kardiomiocita i regulaciji lipidne homeostaze, služeći kao senzor za unutarstanične razine slobodnih masnih kiselina (206). Njegova je aktivnost pod strogom kontrolom peroksisom-proliferator aktiviranih receptora (PPAR), čime se sprječava prekomjerno nakupljanje lipida i razvoj lipotoksičnosti u srčanom tkivu (206). U ovom istraživanju nisu pronađene statistički značajne razlike u koncentraciji ovog enzima u homogenatima tkiva miokarda između kontrolne i ispitivane skupine, ni prilikom tretmana sinigrinom (**Slika 19.**), niti prilikom tretmana ekstraktima klijanaca brokule (**Slika 20.**). Statistički značajnih rezultata nije bilo niti prilikom razdiobe skupina prema spolu. U patološkim modelima, poput šećerne bolesti ili hiperkalorijske prehrane bogate mastima, dolazi do hiperaktivacije PPAR-  $\alpha$  i značajnog porasta ekspresije ACOX1, što može dovesti do nakupljanja vodikovog peroksida i posljedičnog lipotoskičnog djelovanja (207). Povišena aktivnost ACOX1 u miokardu može pridonijeti nakupljanju reaktivnih kisikovih vrsta te, osobito u uvjetima lipotoksičnosti, sudjelovati u mehanizmima koji potiču razvoj srčanog zatajenja (207). Zato se neutralan rezultat iz ovog istraživanja može se protumačiti tvrdnjom da primjena sinigrina i ekstrakata klijanca brokule ne ometaju osnovni regulatorni put energetske homeostaze u miokardu zdravih miševa. U literaturi je opisano kako sinigrin i njegov metabolit (AITC) mogu utjecati na metabolizam lipida, ali u tkivima s visokim metaboličkim prometom, poput jetre. Neka istraživanja su pronašla poticajno djelovanje glukozinolata/iziotiocijanata na ekspresiju ACOX1 u perifernim tkivima. Tako su npr. Zhang i sur. otkrili da sulforafan (glavni metabolit glukorafanina iz brokule) zapravo povećava ekspresiju ACOX1 u mišićima miševa kako bi potaknuo oksidaciju lipida i podržao rast mišićnih vlakana (208). Okulicz i sur. pronašli su kako dugotrajnija primjena sinigrina u visokoj dozi (50  $\mu\text{mol/kg}$ ) kod štakora može ozbiljno poremetiti metabolizam lipida, vidljivo kroz povećanje serumskog kolesterola i slobodnih masnih kiselina, ali i kroz pojavu steatoze jetre i hiperinzulinemije (209).

Fiziološka uloga i učinci tretmana u pokusu :

- Irizin - miokin/adipokin koji se oslobađa (nakon cijepanja FNDC5) potaknut mišićnom kontrakcijom, primarno iz miokarda i skeletnih mišića; sudjeluje u regulaciji energetskeg metabolizma; u miokardu doprinosi zaštiti od oksidacijskog stresa, regulaciji metabolizma i potencijalno remodeliranju srca (188).

- sinigrin – ima učinak; subkronična primjena rezultirala je statistički značajnim povišenjem koncentracije irizina u miokardu ženki, što je moguća posljedica sposobnosti sinigrina da donira H<sub>2</sub>S i aktivira zaštitne signalne puteve (PGC-1 $\alpha$ /FNDC5/irizin).
- adropin - miokin/adipokin uključen u energetske homeostazu (201); u miokardu poboljšava endotelnu funkciju, regulira metabolizam masnih kiselina i potiče sintezu NO (202)
- sinigrin – nema učinka; primjena nije izazvala statistički značajnu razliku u razini adropina u miokardu.
- acil-CoA oksidaza (ACOX) - enzim peroksisomalne  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina (188); sudjeluje u energetske metabolizmu kardiomiocita i regulaciji lipidne homeostaze (206)
- sinigrin – nije pokazao značajan učinak na koncentraciju ACOX1 u miokardu.
- RT ekstrakt – nije pokazao značajan učinak na koncentraciju ACOX1 u miokardu.
- HT ekstrakt – nije pokazao značajan učinak na koncentraciju ACOX1 u miokardu.

## 5.6. *Učinak sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule na upalne parametre miokarda*

### 5.6.1. *Učinak sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule na MMP-2 i MMP-9*

U ovom su istraživanju utvrđene statistički značajno povišene koncentracije matriks metaloproteinaze 2 (MMP-2) i matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9) u homogenatima tkiva miokarda eksperimentalne skupine ženki tretirane vodenom otopinom sinigrina u odnosu na kontrolnu skupinu ženki ( $p \leq 0,05$ ) (**Slika 21**, **Slika 23**). Analizirajući rezultate između eksperimentalnih skupina tretiranih vodenim ekstraktima klijanaca brokule i kontrolne skupine, nisu uočene statistički značajne razlike (**Slika 22.**, **Slika 24.**). Sagledavši općenito istraživanja koje su proučavale učinak različitih glukozinolata i njihovih produkata hidrolize, izotiocijanata, na metaloproteinaze, čini se da se njihova primjena predominantno povezivala sa smanjenjem koncentracija metaloproteinaza, što je posve suprotno od rezultata koje smo zabilježili u našem istraživanju. Tako su primjerice Larocca i suradnici (210) utvrdili kako dodatak praha lista cvjetače (koja je izrazito bogata glukozinolatima) u prehranu zečeva sprječava upalu i oksidacijski stres uzrokovan eksperimentalnim injiciranjem lipopolisaharida u zečeva. U skupini zečeva kojima je prehrana bila obogaćena spomenutim izvorom glukozinolata zabilježila se statistički značajno snižena serumska koncentracija podjednako

MMP-2 i MMP-9, u odnosu na kontrolnu skupinu (210). Iako se u navedenom istraživanju nije radilo o miokardu, niti su se koncentracije metaloproteinaza mjerile u tkivu, njegovi rezultati odraz su općenitog djelovanja glukozinolata na razine metaloproteinaza, koje je izgleda suprotno rezultatima ovog istraživanja. Na tragu ovih rezultata je i istraživanje koje su proveli Acosta-Navarro u suradnici, a ustanovilo je niže plazmatske koncentracije mijeloperoksidaze, MMP-2 i MMP-9, kao i omjera MMP-9/TIMP-1 (tkivni inhibitor metaloproteinaze) u izgledno zdravih muškaraca vegeterijanaca u odnosu na omnivore. Ovakav se rezultat protumačio većim postotnim unosom povrća i voća koji su bogati polifenolima i glukozinolazima, ali moguće i smanjenim brojem leukocita i neutrofila u vegeterijanaca (211). U još nekoliko radova potvrđen je jasan inhibitorski učinak glukozinolata i/ili izotiocijanata na koncentracije metaloproteinaza, uključivši istraživanja o živčanom sustavu (212) (213) i melanomu (214) (215). Slično vrijedi i za polifenole. Štoviše, stanoviti broj istraživanja, uključivši istraživanja na ljudima, životinjama i staničnim kulturama, upućuju na to da polifenoli izgledno ostvaruju svoje povoljno djelovanje na upalne bolesti upravo preko supresije genske ekspresije i enzimске aktivnosti metaloproteinaza. Jedan od važnih mehanizama putem kojih polifenoli ostvaruju ovo djelovanje je smanjivanje koncentracije slobodnih kisikovih radikala, koji pak potiču ekspresiju metaloproteinaza. Drugi važan mehanizam je direktno vezivanje molekule polifenola za metaloproteinaze i inhibicija njihove enzimске aktivnosti, što je dijelom i potvrđeno molekularnim analizama (216). Aktivno mjesto metaloproteinaza ovisi o ionu cinka, a polifenoli su zbog svojih katalolnih i karbonilnih skupina dobri kelatori metala, osobito  $Zn^{2+}$ . Polifenoli mogu izravno inhibirati MMP tako da keliraju  $Zn^{2+}$  u aktivnom mjestu ili se vežu u blizini, čime se narušava katalitička aktivnost MMP-a kao enzima (217). Xianchu i suradnici (218) pokazali su kako polifenol rutin djeluje kardioprotektivno u modelu srčane ozljede u miša, između ostalog i kroz utjecaj na metaloproteinaze. U modelu srčane ozljede, koja je izazvana konsekutivnom intraperitonealnom aplikacijom LPS-a, u skupini miševa koji su uz LPS primali i rutin, zabilježene su statistički značajno niže razine genske ekspresije za i MMP-2 i MMP-9, u odnosu na miševe koji su primali samo LPS, kao i u odnosu na zdravu kontrolu. Smanjene razine genske ekspresije ovih metaloproteinaza odraz su manje stope srčanog remodeliranja, odnosno protektivnog djelovanja rutina (218). Vezano za rečeno, do Prado i suradnici istakli su kako je općenito inhibicija MMP-a i smanjenje njihove koncentracije snažno povezano s minimiziranjem ozljede miokarda te da veći broj fitokemikalija upravo na taj način ostvaruje svoje kardioprotektivno djelovanje (219). Ova korelacija je uvelike smisljena, ako uzmemo u obzir sve uloge MMP. One su obitelji o cinku ovisnih endopeptidaza, uključenih u brojne

fiziološke i patološke procese, posebice one koji se tiču obnove tkiva i njihove modulacije, stanične diferencijacije i mobilnosti, angiogeneze, stanične proliferacije, migracije i apoptoze. Disfunkcija ove obitelji proteina dovodi do različitih patologija, destrukcije tkiva, fibroze i slabljenja matriksa (220). Klinička istraživanja pokazale su kako su razine MMP povišene u većini upalnih bolesti, uključivši osteoartritis i reumatoidni artritis, upalnu bolest crijeva i Alzheimerovu bolest (216). U kontekstu srca, MMP-e i njihovi tkivni inhibitori pokazali su se bitnim čimbenicima kod akutnog i kroničnog srčanog zatajenja, akutnog infarkta miokarda, ateroskleroze, kao i kardiomiopatija. Štoviše, oksidacijski stres, koji je u podlozi gotovo svih prethodno navedenih stanja, potiče proliferaciju srčanih fibroblasta i aktivira te potiče MMP-e (221). Povišene razine MMP-2, TIMP-1 i N-terminalnog peptida koleagena tipa III, kao markera obrtaja izvanstaničnog matriksa u pacijenata s akutnim zatajenjem srca, smatraju se posljedicom ubrzanog patološkog remodeliranja srca.  $\Delta$ MMP-2, definiran kao razlika u koncentracijama MMP-2 između prvog i trećeg dana nakon započinjanja liječenja akutnog zatajenja srca, mogao bi biti koristan u predviđanju ishoda liječenja, budući da se veće smanjenje u koncentraciji MMP-2 statistički značajno povezuje s boljim ishodom (222). Također, povišene razine i aktivnosti MMP-9 mogli bi se koristiti kao novi marker za dijagnosticiranje razvoja srčanog zatajenja u pacijenata koji su preboljeli akutni infarkt miokarda (223). Općenito, opterećenje srca izgledno inducira brojne MMP-ove, pogotovo MMP-2. To se potvrdilo i kroz biopsije miokarda u pacijenata s tlačnim opterećenjem lijeve klijetke posljedično aortalnoj stenozii, gdje se detektirala povišena ekspresija i aktivnost MMP-2 u uzorcima biopsija (223). No, povišene razine MMP-a nisu opažene samo u tkivu, već i u krvi – tako su se u pacijenta s kroničnim srčanim zatajenjem opazile povišene serumske razine MMP-1 i TIMP-1, uz istovremeni porast koncentracije karkobsi-terminalnog telopeptida kolagena tipa I (eng. *C-terminal telopeptide of type I collagen*, CITP), markera razgradnje kolagena, što govori u prilog prevazi kolagenolitičke aktivnosti u kroničnom srčanom zatajenju (224). Poremećaj u omjeru MMP/TIMP i drastično povećanje u razinama BNP –a odražavaju uznapredovalo remodeliranje klijetke, dilataciju i rastezanje komora srca (223).

Iz svega prethodnog opisanog, vidljivo je da se u većini slučajeva povišene vrijednosti MMP-a tumače kao znak oštećenja miokarda. Zbog toga rezultat iz ovog istraživanja, odnosno povećan izražaj MMP-2 i MMP-9 u miokardu ženki tretiranih vodenom otopinom sinigrina (Sinig.ž) u odnosu na kontrolnu skupinu ženki (Kont.ž), možemo protumačiti kao rezultat toksičnog djelovanja sinigrina. Uzgred rečeno, što će se elaborirati i u kasnijem poglavlju ove disertacije, u miokardu ženki tretiranih vodenom otopinom sinigrina (Sinig. ž)

uočene su statistički značajno povišene koncentracije katalaze i ukupnog glutationa, u odnosu na kontrolnu skupinu ženki (Kont.ž), što može upućivati na aktivaciju antioksidacijskih obrambenih mehanizama u uvjetima pojačanog oksidacijskog stresa. Također, oksidacijski stres je dobro poznati aktivator MMP-a u miokardu (221). Ipak, nejasno je zašto je taj pretpostavljeni toksični učinak vidljiv samo u ženki miševa i postoji li neko drugo logično objašnjenje. Također, u skupini Sinig.ž zabilježena je statistički značajno snižena vrijednost ANP-a u odnosu na skupinu Kont.ž, što ne ide direktno u prilog hipotezi da se radi o toksičnom učinku. S obzirom da je u ovom istraživanju već detektirali spolni dimorfizam, i to kod irizina, je li moguće da su povišene vrijednosti MMP-ova posljedica njegova djelovanja? Kroz istraživanje angiogeneze, Wu i suradnici (225) utvrdili su da irizin stimulira ekspresiju i aktivnost matriks-metaloproteinaza, specifično MMP-2 i MMP-9, u stanicama HUVEC. Ovaj stimulirajući učinak irizina na metaloproteinaze dokazan je u *in vitro* modelu, analizom mRNA proteina, kao i u *in vivo* modelu korištenjem zebrice (eng. *zebrafish*). Povećana aktivnost MMP-a potvrđena je pomoću zimografije želatine, kojom je procijenjen kapacitet MMP-a za razgradnju želatine. Autori su također dokazali da je mehanizam kojim irizin djeluje na MMP-e u endotelnim stanicama ovisan o signalnom putu ERK te da je specifični ERK inhibitor (U0126) uspješno inhibirao irizinom induciranu pojačanu aktivnost ovih enzima (225). Iako je ovo istraživanje bilo usmjereno na učinak irizina na endotelne stanice i njihovu angiogenezu, očito je da irizin ima sposobnost utjecati i na stanice kardiovaskularnog sustava. U tom kontekstu, može se sugerirati da bi statistički značajno povećanje razine irizina u miokardu ženki miševa tretiranih vodenom otopinom sinigrina u usporedbi s kontrolnom skupinom ženki moglo odražavati svojevrsni zaštitni učinak irizina na miokard. Ovaj rezultat korelira sa statistički značajnim povećanjem razina MMP-2 i MMP-9 u miokardu ženki miševa tretiranih sinigrinom u usporedbi s kontrolnom skupinom ( $p \leq 0,05$ ). Međutim, ovaj se rezultat može promatrati iz dvije perspektive. S jednog gledišta, povišene razine MMP-2 i MMP-9, u svjetlu povišenih razina irizina induciranih sinigrinom, mogle bi se tumačiti kao odraz zaštitnog djelovanja i sinigrina i irizina u miokardu, u kontekstu održavanja homeostaze i sprječavanja srčane hipertrofije i/ili remodeliranja, izraženog u ženskom spolu. Ipak, treba napomenuti da se, za razliku od drugih istraživanja koja ispituju takve učinke na srcu koristeći životinjske modele srčane hipertrofije i srodnih patologija, naše istraživanje fokusiralo na zdrave eksperimentalne životinje, stoga ne možemo donijeti jasne zaključke u vezi s ovim potencijalnim zaštitnim učinkom. Iz druge perspektive, MMP-ovi su dominantne proteaze odgovorne za razgradnju proteina izvanstaničnog matriksa, a ravnoteža između MMP-a i njihovih endogenih tkivnih inhibitora ključna je za ograničavanje razgradnje izvanstaničnog

matriksa. Izvanstanični matriks je esencijalan za održavanje vaskularne homeostaze i smatra se da podržava stabilnost i utječe na ponašanje vaskularnih stanica (220). Uzimajući to u obzir, povišene razine MMP-a mogu se tumačiti i kao odraz potencijalnih toksičnih učinaka na miokard, pogotovo s obzirom na to da eksperimentalne životinje u ovom istraživanju nisu pokazivale srčanu hipertrofiju te se opaženo povećanje razina MMP-a ne može u potpunosti opravdati „fiziološkim obrtajem“.

U djelu istraživanja gdje su ekperimentalne skupine tretirane vodenim ekstraktima klijanaca brokule, nisu zapažene statistički značajne razlike u koncentracijama MMP-a u homogenatima tkiva miokarda između eksperimentalne i kontrolne skupine općenito, kao ni prilikom razdiobe skupina prema spolu (Slika 22, Slika 24). Osim ovog istraživanja, pregledom literature nisu pronađeni radovi koji su istraživali učinak ekstrakata klijanaca brokule na razinu MMP-a u miokardu. U većini drugih radova, što je vidljivo i u prethodnom tekstu, autori su koristili čiste agense, odnosno visokokoncentrirane glukozinolate i/ili polifenole. Stoga je limitiran broj radova s kojima se mogu usporediti rezultati ovog istraživanja. U radu Xu i suradnika ustanovljeno je kako visoke doze ekstrakata klijanaca brokule, u mišjem modelu dijabetesa tip II, preveniraju razvoj fibroze u miokardu, koju su autori objektivizirali kroz mjerenje akumulacije kolagena i profibrotskog posrednika, CTGF (eng. *connective tissue growth factor*). Iako nisu direktno mjerili MMP-e, visoko je indikativno da ekstrakti klijanaca brokule mogu utjecati na njih, s obzirom da su MMP-i ključni enzimi u procesima srčane fibroze i remodeliranja (158). Također, postoji jedno istraživanje koje nedvojbeno potvrđuje učinak ekstrakata klijanaca brokule na MMP-e, ali je provedeno na koži, a ne miokardu. Yun i Kim su na kulturi keratinocita ispitivali zaštitna svojstva ekstrakata klijanaca brokule od lebdećih, tzv. PM čestica (eng. *particulate matter*), odnosno njihovog učinka na starenje kože i upalu. Autori su zaključili kako pretretman keratinocita s ekstraktima klijanaca brokule efektivno suprimira ekspresiju MMP-1, COX-2 i IL-6, kao ključnih biljega upale i starenja. Nadalje, ustanovljeni mehanizam inhibicije ovih biljega je inhibicija aktivnosti MAPK. Naime, ekstrakti klijanaca brokule vežu se direktno na kinazu p38 $\alpha$ , bez natjecanja s ATP-om, time selektivno inhibirajući njezinu aktivnost (226).

Fiziološka uloga i učinci tretmana u pokusu :

- MMP-2 i MMP - enzimi odgovorni za razgradnju i remodeliranje izvanstaničnog matriksa; ključni su za obnovu tkiva, ali i za patološko remodeliranje miokarda (220)
- sinigrin – ima učinak (potencijalno toksičan ili kompleksan zaštitni mehanizam); subkronična primjena rezultirala je statistički značajno povišenim koncentracijama

MMP-2 i MMP-9 u miokardu ženki, što može odražavati rani znak oštećenja miokarda uzrokovanog oksidacijskim stresom, ili alternativno, irizinom posredovanu adaptaciju.

- ekstrakt RT – nema učinka; primjena vodenog ekstrakta nije dovela do statistički značajnih razlika u koncentracijama MMP-a u miokardu.
- ekstrakt HT – nema učinka; također nije zabilježena statistički značajna promjena koncentracija MMP-ova u odnosu na kontrolnu skupinu.

#### 5.6.2. *Učinak sinigrina i ekstraktata klijanaca brokule na PTX3*

Analizom koncentracija PTX3 nisu zapažene statistički značajne razlike između eksperimentalnih skupina tretiranih vodenom otopinom sinigrina (Slika 25.), kao ni eksperimentalnih skupina tretiranih vodenim ekstraktima klijanaca brokule u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (Slika 26.). Također, statistički značajne razlike nisu zapažene niti prilikom usporedbe navedenih skupina prema spolu. Naime, pentraksini su obitelj evolucijski očuvanih proteina poznatih po svojoj ulozi u urođenom imunitetu i upalnim procesima. Dijele se na dvije glavne skupine – kratke pentraksine, gdje pripadaju primjerice C-reaktivni protein (CRP) i serumski amiloid P (SAP) te duge pentraksine, čiji je najpoznatiji predstavnik pentraksin 3 (PTX3), koji je mjereno i u ovom istraživanju (227). U usporedbi s općenito poznatijim CRP-om, koji se predominantno proizvodi u jetri kao odgovor na sustavnu upalu, PTX3 se proizvodi lokalno, u različitim stanicama na mjestu upale, uključivši endotelne stanice, fibroblaste, makrofage, monocite i dendritičke stanice, a njegova koncentracija brzo raste tijekom upalnih stanja i dobro odražava stupanj oštećenja tkiva (228). S obzirom na dobivene rezultate, možemo zaključiti kako primjena vodene otopine sinigrina i vodenih ekstraktata klijanaca brokule ne rezultira takvim akutnim oštećenjem miokarda koje bi bilo vidljivo kroz povišenje vrijednosti PTX3 u miokardu. PTX3 se inače izrazito brzo proizvodi u mišjem i štakorskom modelu infarkta miokarda i prisutan je u aterosklerotskim lezijama (229). Ovakav nalaz i tumačenje suprotstavljaju se prethodno opisanim pretpostavkama o mogućem toksičnom djelovanju sinigrina na miokard, ali ga ne mogu u potpunosti isključiti. Unatoč većem broju radova koji su proučavali pentraksin, ovo istraživanje je prvo koje je mjerilo učinak primjene vodenih ekstraktata klijanaca brokule na koncentraciju PTX3 u miokardu miševa. Prema dosadašnjoj literaturi PTX3 izgledno je biljeg akutnog oštećenja – u usporedbi s CRP-om, čija razina u akutnom infarktu miokarda dostiže vrhunac nakon 24-48 sati, kod pentraksina se isti postiže kroz 6 – 8 sati (227). Upravo je zbog

toga PTX3 odličan indikator akutnog oštećenja miokarda i nije bilo za očekivati da će se detektirati povišenje njegove vrijednosti u miokardu nakon subkronične primjene sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule. Koliko dobro PTX3 korelira sa stupnjem oštećenja miokarda govori i rezultat jedne metaanalize koja je pokazala da je povišena plazmatska vrijednost PTX3 jasno povezana s lošijom prognozom u pacijenata s kardiovaskularnom bolesti, a ta je korelacija izgledno neovisna o tipu kardiovaskularne bolesti, duljini praćenja i vrijednostima CRP-a (230). Osim akutnog odgovora, PTX3 je uključen i u kronične upalne procese i remodeliranje tkiva koje karakterizira kronične kardiovaskularne bolesti. Povišene razine PTX3 povezane su s kroničnim srčanim zatajenjem, aterosklerozom, šećernom bolesti i drugim metaboličkim poremećajima (227). PTX3 se smatra neovisnim upalnim biljekom koji kolerira s disfunkcijom lijeve klijetke (231). Unatoč svim prethodno iznesenim tvrdnjama i očitaj korelaciji PTX3 s oštećenjem miokarda, istraživanja na životinjskim modelima pokazuju da ovaj protein moguće ima i zaštitnu ulogu. Danas vrijedi konsenzus da je uloga PTX3 dvojaka. S jedne strane je vrijedila dogma da pentraksin direktno sudjeluje u procesu razvoja aterosklerotskog plaka, doprinosi njegovu povećanju te da, povećavajući sekreciju tkivnog faktora, sudjeluje u aktivaciji zgrušavanja krvi i trombozi. S druge strane, u istraživanju na miševima kojima nedostaje PTX3-kodirajući gen, ustanovljeno je kako takva potpuna deficijencija PTX3 doprinosi značajnom povećanju proizvodnje proupalnih čimbenika i pogoršanja težine upale u stijenama krvnih žila, što u velikoj mjeri sugerira zaštitno svojstvo protiv razvoja ateroskleroze (228). Istraživanja su također predložila kako PTX3 ima protuupalni učinak koji ostvaruje stimulacijom proizvodnje protuupalnih citokina poput IL-10 i TGF- $\beta$  i inhibirajući proupalne odgovore (232). Još jedan antiaterosklerotski mehanizam djelovanje PTX3 je njegov inhibirajući učinak na angiogenezu stimuliranu s vaskularnim faktorom rasta fibroblasta (FGF-2), koji je inače uključen u formiranje aterosklerotskih plakova kroz poticanje proliferacije glatkih mišića stijenke krvnih žila (228). Unatoč tome što je PTX3 predominantno poznat kao biljeg oštećenja te kao takav ukazuje na pogoršanje kardiovaskularnih bolesti i učestalo je povišenih vrijednosti u brojnim patološkim stanjima, nemali broj istraživanja govori o izglednom zaštitnom učinku na kardiovaskularno zdravlje.

Fiziološka uloga i učinci tretmana u pokusu :

- PTX3 – dugi pentraksin uključen u urođeni imunitet i upalne procese; proizvodi se lokalno na mjestu upale u endotelnim stanicama, fibroblastima, makrofazima, monocitima i dendritičkim stanicama te se smatra biljgom akutnog oštećenja tkiva, uključujući oštećenje miokarda (227).
- Sinigrin – nema učinka; subkronična primjena nije dovela do statistički značajne promjene koncentracije PTX3 u homogenatima tkiva miokarda
- ekstrakt RT– nema učinka; nije zabilježena statistički značajna promjena koncentracije PTX3 u miokardu u odnosu na kontrolnu skupinu.
- ekstrakt HT – nema učinka; također nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji PTX3 u miokardu, ni ukupno ni nakon razdiobe prema spolu.

### 5.6.3. Učinak sinigrina i ekstrakata kljanaca brokule na NO

U ovom istraživanju, analizom rezultata koncentracije dušikova(II) oksida, utvrđena je statistički značajna razlika u koncentraciji NO u miokardu skupine tretirane vodenim ekstraktom kljanaca brokule uzgajanim pri 23 °C (RT<sub>ekst.</sub>) u odnosu na kontrolnu skupinu (Kont.) ( $p \leq 0,001$ ). Također, statistički značajna razlika je zapažena i prilikom razdiobe prema spolu te je u eksperimentalnim skupinama mužjaka (RT<sub>ekst.M</sub>) i ženki (RT<sub>ekst.Ž</sub>) uočena statistički značajno povišena razina NO u odnosu na mužjake kontrolne skupine (Kont.<sub>M</sub>) ( $p \leq 0,05$ ) (**Slika 28.**).

Dušikov (II) oksid (NO) od izrazite je važnosti u kontroli vaskularnog tonusa i krvnog tlaka. NO je plin s relativno malom molekulom koji snažno dilatira krvne žile te ima dodatno protuupalno i antioksidacijsko djelovanje (69). Međutim, u uvjetima pojačanog oksidacijskog stresa i povećane dostupnosti reaktivnih kisikovih vrsta, osobito superoksidnog aniona, NO može sudjelovati u stvaranju peroksinitrita i time pridonijeti prooksidacijskim i citotoksičnim učincima (233). Njegov osnovni mehanizam djelovanja sastoji se od aktivacije kaskade cGMP- ovisne protein kinaze G u glatkomišićnim stanicama arterija, prilikom čega dolazi do aktivacije natrijevih kanala, hiperpolarizacije stanične membrane i sprječavanja influksa kalcijevih iona, što potiče vazodilataciju. S druge strane, protein kinaza G reducira vazokonstrukciju stanica glatkih mišića putem fosforilacije miozina lakog lanca (8). NO sintetiziraju tri različita podtipa NO sintaza (NOS), svaki sa svojim jedinstvenim obrascima ekspresije i funkcionalnim svojstvima: neuronska NOS (nNOS ili NOS1), inducibilna NOS (iNOS, NOS2) i endotelna NOS (eNOS ili NOS3). Navedeni enzimi kataliziraju proizvodnju

NO i L-citrulina od L-arginina i O<sub>2</sub>, koristeći elektrone donirane od strane dihidronikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH). U prisutnosti hema i tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>), monomeri NOS formiraju homodimere, koji su sposobni koristiti elektrone donirane od strane NADPH, kako bi katalizirali oksidaciju, kojom u dva koraka, od L-arginina nastaju L-citrulin i NO. Izražavanje NADPH u stijenci žile uz posljedičnu prekomjernu proizvodnju NO predloženo je kao početni korak u kroničnoj disregulaciji normalne proizvodnje NO putem eNOS-a, što je karakteristično za monomerne oblike eNOS-a. Na ovaj način eNOS proizvodi superoksid, umjesto NO, koji reagira s NO formirajući peroksinitrit, koji pak pojačava razdvajanje (rasparivanje) eNOS i daljnju produkciju superoksida (69). U drugom koraku NOS katalizira oksidaciju L-arginina u L-citrulin, pritom oslobađajući NO. Primjerice, nNOS i eNOS su jako ovisne o Ca<sup>2+</sup>-aktiviranom CaM-om (kalmodulin) za homodimerizaciju i aktivnost, dok je iNOS minimalno ovisna o koncentraciji kalcija, što bitno utječe na njihovu funkciju. NADP oksidaza (NOX) se smatra jednim od ključnih elemenata u razvoju vaskularne disfunkcije. Primarna funkcija NOX-a jest proizvodnja slobodnih kisikovih radikala; štoviše smatra se primarnim izvorom reaktivnih kisikovih vrsta u endotelnim stanicama, odnosno u vaskularnom sustavu. Generalno, enzimatska produkcija NO od strane eNOS ključna je u regulaciji endotelne funkcije, a oksidacijski stres može uzrokovati disregulaciju eNOS-a i endotelnu disfunkciju (234). Disregulacija enzima poput NADPH oksidaze, NOS, ksantin oksidaze, mitohondrijskih enzima i SOD generira O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i ·OH, što zajedno sa smanjenim razinama antioksidansa dovodi do povećanog stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta u vaskulaturi. Slobodni kisikovi radikali doprinose oštećenju vaskularnog sustava promovirajući rast stanica glatkih mišića, odlaganje proteina izvanstaničnog matriksa, aktivaciju MMP-a, upalu, endotelnu disfunkciju i pojačani vaskularni tonus (69). Moguće je da rezultat opažen u ovom istraživanju, odnosno činjenica da tretman vodenom otopinom sinigrina nije rezultirao značajnim promjenama u koncentraciji NO u miokardu, kao što je to uočeno kod tretmana vodenim ekstraktima klijanaca brokule, odražava različite mehanizme antioksidacijskog djelovanja glukozinolata i polifenola. Sinigrin, kao glukozinolat, svoje antioksidacijsko djelovanje predominantno ostvaruje djelovanjem na Nrf2 i poticanjem aktivnosti antioksidacijskih enzima (158), a manje na izravno poticanje proizvodnje NO. Zanimljiv je nalaz kako aktivacija Nrf2 u endotelnim stanicama izloženima oksidacijskom stresu rezultira povišenjem biološki raspoloživog NO, dok se izražaj eNOS paradoksalno snižava (98). Heiss i suradnici (235) ovaj paradoks tumače kao zaštitu od oksidacijskog stresa. Kako je navedeno ranije u ovom paragrafu, u uvjetima oksidacijskog stresa eNOS može postati disreguliran i umjesto proizvodnje NO, on postaje važan proizvođač kisikovih

radikala. U uvjetima oksidacijskog stresa, kada je ograničena dostupnost tetrahidrobiopterina (BH4), ključnog faktora za eNOS, aktivacija Nrf2 djeluje dvojako: 1) prolazno smanjenje razina eNOS proteina, što osigurava postojanje dovoljnog omjera eNOS-a i BH4; 2) aktiviranje antioksidacijskih enzima, što smanjuje razinu kisikovih radikala. Obje spomenute aktivnosti osiguravaju održavanja stehiometrijskog omjera između eNOS i BH4, čime se znatno smanjuje rizik od „razdvajanja“ (eng. *uncoupling*), a razdvojena NOS upravo je glavni generator slobodnih kisikovih radikala. To znači da aktivacija Nrf2 ne samo da poboljšava antioksidacijsku obranu, već i na sofisticiran način regulira eNOS sustav kako bi se spriječilo njegovo oštećenje i osigurala optimalna proizvodnja NO za zdravlje endotela. Ipak, razvidno je kako glukozinolati ne djeluju direktno, odnosno snažno na pojačanu proizvodnju NO, koliko efektivno reguliraju eNOS sustav. Upravo bi iz tog razloga, povišenu koncentraciju NO u miokardu nakon tretmana vodenim ekstraktima klijanaca brokule ponajviše mogli pripisati djelovanju polifenola u ekstraktima. Za razliku od opisanog posrednog djelovanja glukozinolata, polifenoli direktno induciraju gene za iNOS i eNOS te sprječavaju razdvajanje eNOS, putem više mehanizama, uključivši i aktivaciju SIRT1 (8) (42). Ipak, ako su polifenoli najodgovorniji za opaženu povišenu koncentraciju NO u miokardu, zašto se statistički značajno povišenje NO u miokardu nije evidentiralo kod primjene ekstrakata klijanaca brokule uzgajanih pri visokoj temperaturi (HT), uzevši u obzir da je ukupni sadržaj polifenola u tim ekstraktima porastao za 30 % u odnosu na ekstrakte klijanaca uzgajanih pri normalnoj temperaturi okoline (RT). Odgovor možda leži u činjenici da su ekstrakti klijanaca uzgajanih pri visokoj temperaturi imali i 28% nižu koncentraciju ukupnih glukozinolata, koji, iako možda ne induciraju snažno proizvodnju samog NO, ipak doprinose održavanju NO kroz sofisticirani sustav regulacije eNOS. Možda je upravo sinergijsko djelovanje polifenola i glukozinolata u ekstraktima klijanaca brokule odgovorno za povećanje koncentracije NO u miokardu, koje nismo zapazili za sami glukozinolat, sinigrin.

Fiziološka uloga i učinci tretmana u pokusu:

- NO - signalna molekula koja regulira vazodilataciju, perfuziju miokarda i kontraktilnost; ima i antioksidacijske i protuupalne učinke u srcu (69)
- sinigrin – nema učinka; subkronična primjena nije rezultirala statistički značajnim promjenama u koncentraciji NO u miokardu u odnosu na kontrolnu skupinu
- ekstrakt RT - ima učinak (pozitivan/zaštitni); subkronična primjena rezultirala je statistički značajno povišenom koncentracijom NO u miokardu, općenito i prilikom razdiobe prema spolu (kod i mužjaka i ženki), što se izgledno može pripisati

sinergijskom djelovanju prisutnih polifenola (koji izravno potiču proizvodnju NO) i glukozinolata.

- ekstrakt HT - nema učinka; nije zabilježena statistički značajna promjena koncentracije NO u odnosu na kontrolnu skupinu, najvjerojatnije zbog promijenjenog omjera bioaktivnih tvari (smanjen udio glukozinolata uslijed termičkog stresa, čime je izostao potreban sinergijski učinak)

## 5.7. Učinak sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule na parametre oksidacijskog stresa u tkivu miokarda

### 5.7.1. Učinak sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule na ukupni glutation (tGSH)

U ovom je istraživanju utvrđena statistički značajno povišena koncentracija ukupnog glutationa (tGSH) u homogenatima tkiva miokarda ženki tretiranih vodenom otopinom sinigrina (Sinig.ž) u odnosu na kontrolnu skupinu ženki (Kont.ž.) ( $p \leq 0,05$ ) (Slika 29.). Također, statistički značajno povećana koncentracija tGSH je zapažena u skupini životinja tretiranih vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$  (HT<sub>ekst.</sub>) u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (Kont.) ( $p \leq 0,05$ ) (Slika 30.). Prilikom razdiobe prema spolu, zapažena je statistički značajno povećana koncentracija tGSH u homogenatima tkiva miokarda eksperimentalne skupine mužjaka (HT<sub>ekst.M</sub>), u odnosu na kontrolnu skupinu ženki (Kont.ž.) ( $p \leq 0,05$ ) (Slika 30b).

Glutation je tripeptid koji se sastoji od cisteina, glicina i glutaminske kiseline i ključni endogeni antioksidans prisutan u svim tkivima sisavaca, a njegova je glavna funkcija održavanje redoks ravnoteže u stanicama i zaštita od oksidacijskog stresa (236). U miokardu je glutation najzastupljeniji antioksidans i ključan je za normalno funkcioniranje srca (236). Djeluje kao supstrat za antioksidacijske enzime poput glutation peroksidaze i glutation S-transferaze, na taj način neutralizirajući reaktivne kisikove radikale i lipidne perokside (237). Reducirana forma glutationa igra vitalnu ulogu u ovim procesima detoksikacije, gdje se sulfhidrilna skupina cisteina koristi kao donor elektrona (238). Oksidirani glutation nastaje tijekom detoksikacijskih procesa, a glutation reduktaza ga ponovno pretvara u reduciranu formu kako bi se održao omjer GSH/GSSG, koji je indikator staničnog oksidacijskog stresa (239) (240). Ukupni glutation (tGSH) predstavlja zbroj svih molekula glutationa prisutnih u uzorku, bez obzira jesu li u reduciranom ili oksidiranom stanju. Mjerenje ukupnog glutationa

daje uvid u ukupni kapacitet sustava glutaciona u tkivu ili stanici (241). Visoka razina tGSH obično ukazuje na robustan antioksidacijski obrambeni sustav i adekvatnu sposobnost stanice da se bori protiv oksidacijskog stresa (242). U tom kontekstu, rezultate ovog istraživanja možemo promatrati kao povoljan učinak sinigrina i njegovo antioksidacijsko djelovanje, budući da se u miokardu ženki skupine tretirane sinigrinom (Sinig.Ž.) uočio povišeni tGSH u odnosu na kontrolnu skupinu ženki. Slično bismo mogli zaključiti i za vodene ekstrakte klijanaca brokule koji su uzgajani pri visokoj temperaturi okoline ( $t = 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), budući da se u miokardu tretirane skupine izmjerio statistički značajno viši tGSH u odnosu na kontrolnu skupinu. Međutim, ovakvo je tumačenje znatno pojednostavljeno. Prvo, kod sinigrina se statistički značajan rezultat uočio samo u eksperimentalnoj skupini ženki tretiranoj vodenom otopinom sinigrina što limitira zaključke o univerzalnoj primjenjivosti nalaza i otvara put alternativnim tumačenjima. Drugo, u eksperimentalnoj skupini ženki tretiranih vodenom otopinom sinigrina kod kojih je evidentiran povišen tGSH, istovremeno se nije utvrdio povećani antioksidacijski kapacitet izmjeren metodama FRAP i ABTS. Treće, činjenica je da je razina glutaciona u miokardu prirodno niža u usporedbi s drugim organima, čemu je jedan od razloga i niska aktivnost  $\gamma$ -glutamyltranspeptidaze. Ovo dodatno komplicira interpretaciju, budući da i manja apsolutna povećanja mogu imati značajan fiziološki učinak (243). Četvrto, što vrijedi i za tretman sinigrinom i ekstraktima klijanaca brokule, kod razmatranja povišene vrijednosti tGSH u miokardu ključno je razlikovati adaptivni i patološki odgovor, budući da povišene razine tGSH mogu značiti pojačanu antioksidacijsku obranu, ali i odgovor na intenzivan oksidacijski stres (244). U ovom kontekstu treba uzeti u obzir da ukupni glutacion (tGSH) ne razlikuje reduciranu od oksidirane forme, a omjer te dvije forme predstavlja precizniji pokazatelj redoks statusa (245). Iako mjerenje ukupnog glutaciona pruža vrijedne informacije, ono ne govori izravno o redoks statusu stanice, odnosno omjeru reduciranog glutaciona i oksidiranog glutaciona. Reducirana forma glutaciona je aktivna antioksidacijska molekula koja detoksicira reaktivne kisikove vrste, pretvarajući se pritom u GSSG (238). Omjer GSH/GSSG je precizniji pokazatelj oksidacijskog stresa i stanične sposobnosti da se nosi s njim. Kada je omjer GSH/GSSG smanjen, to ukazuje na povišeni oksidacijski stres i kompromitiranu antioksidacijsku obranu, što je često povezano s razvojem kardiovaskularnih bolesti (246). Smanjenje ukupnog glutaciona može signalizirati iscrpljivanje staničnih antioksidacijskih rezervi ili poremećenu sintezu glutaciona, što može kompromitirati sposobnost stanice da se zaštiti od oksidacijskog oštećenja (242). Niske razine glutaciona povezane su s patogenezom i progresijom različitih kardiovaskularnih bolesti, uključujući infarkt miokarda i zatajenje srca (246). Smanjenje, odnosno potrošnja, ukupnog glutaciona

uočeni su u krvi pacijenata s infarktom miokarda i u lijevoj klijetki pacijenata sa srčanim zatajenjem, dok je poremećen redoks status GSH i smanjena aktivnost GPX uočena u miokardu različitih životinjskih modela ozljede miokarda. To ukazuje na ključnu ulogu glutationa u očuvanju srčane funkcije i zaštiti kardiomiocita od oštećenja (242). Akhlaghi i Bandy (10) su, istražujući utjecaj ekstrakata klijanaca brokule na zdravlje srca, dobili drugačije rezultate za razinu glutationa u miokardu u odnosu na ovo istraživanje. U njihovom istraživanju ispitivana skupina štakora je uz redovnu prehranu dobivala i 2%-tne osušene klijance brokule kroz 10 dana, nakon čega su životinje žrtvovali i izolirali srca koja su podvrgli ishemiji kroz 20 minuta i reperfuziji kroz 2 sata. Unatoč vrlo kratkom trajanju terapijske intervencije (10 dana, za razliku od 28 dana u našem istraživanju), rezultati su pokazali 78- 86 %-tno smanjenje biljega nekroze (smanjenje laktat dehidrogenaze) i apoptoze (aktivnost kaspaze-3) te 82-116%-tno smanjenje pokazatelja oksidacijskog stresa u skupini tretiranoj klijancima brokule u odnosu na skupinu koja ih nije primala. Međutim, suprotno od rezultata našeg istraživanja, autori nisu pronašli statistički značajne razlike u razinama tGSH u ishemijski-reperfuziranom miokardu, između tretirane i kontrolne skupine. Zanimljivo je da su istovremeno pronašli povišene razine tGSH i pojačanu aktivnost enzima faze 2, poput glutamat cistein ligaze i kinon reduktaze u jetri (10). Ovo istraživanje upućuje na moguću selektivnu modulaciju antioksidacijskog statusa specifičnu za pojedini organ, gdje jetra pokazuje izraženiji odgovor na unos ekstrakata brokule u usporedbi s miokardom. Nadalje, važan je nalaz da je takva, čak i kraća terapijska intervencija ekstraktima klijanaca brokule, dovoljna za značajnu zaštitu srca od oksidacijskog oštećenja i apoptoze, a bez istovremenog mjerljivog utjecaja na koncentraciju tGSH u miokardu. To može govoriti u prilog antioksidacijskom djelovanju ekstrakata klijanaca brokule izvan djelovanja na sam glutation. Postoji više ograničenja zbog kojih ne možemo pojednostavljeno uspoređivati rezultate ovog istraživanja s prethodno prikazanim. Prva važna razlika krije se u samom eksperimentalnom dizajnu. U našem istraživanju korištene su zdrave eksperimentalne životinje, dok se u navedenom radu primjenjivao model ishemije i reperfuzije, i to *ex vivo*. Akutni stres uzrokovan ishemijom i reperfuzijom može drastično promijeniti staničnu homeostazu i metaboličke procese u miokardu. Iako su autori detektirali kardioprotektivna svojstva, proces ishemija-reperfuzija sama po sebi troši glutation i može maskirati ili preusmjeriti adaptivne odgovore koji bi se inače vidjeli u zdravom tkivu (247). Moguće je da je, unatoč aktivaciji antioksidacijskih puteva, potrošnja glutationa tijekom ishemije-reperfuzije bila toliko velika da nije došlo do neto povišenja ukupnih razina. Drugo ograničenje je duljina trajanje terapijske intervencije, koja je u ovom istraživanju određena prema protokolu OECD za

subkroničnu izloženost, a u istraživanju Akhlaghi i Bandy na temelju opažanja pozitivnih rezultata u nekim sličnim istraživanjima (npr. polifenolima zelenog čaja). Treće ograničenje je doziranje ekstrakata klijanaca – u ovom su istraživanju doze bile definirane tako da svaka pokusna životinja dobije 300 mg suhog biljnog ekstrakta po kg svoje tjelesne mase, dok je u predmetnom istraživanju ta doza definirana kao „2% od ukupnog unosa hrane“. Bose i suradnici (248) su u svojem istraživanju pronašli kako dodatak sulforafana sprječava doksorubicinom potaknuto smanjenje razine GSH u srcu štakora. Ovo otkriće ukazuje na zaštitni učinak sulforafana protiv oksidacijskog stresa izazvanog kemoterapijom. Naime, u navedenom istraživanju u skupini štakora koja je primala samo kemoterapeutik, doksorubicin, razina glutaciona bila je smanjena za više od 50% u usporedbi s kontrolnom skupinom, dok je istovremena primjena sulforafana spriječila to smanjenje (248). Kao što smo naglasili i u literaturnom pregledu, ovaj zaštitni mehanizam djelovanja sulforafana primarno se ostvaruje kroz aktivaciju nuklearnog faktora Nrf2, ključnog transkripcijskog faktora odgovornog za regulaciju endogenih antioksidacijskih enzima enzima faza II u kardiomiocitima (177). Naime, Nrf2 aktivira enzime poput  $\gamma$ -glutamamilcistein ligaze (GCLC i GCLM), koji su ključni za *de novo* sintezu glutaciona, te glutation reduktazu, koja obnavlja reducirani GSH iz oksidiranog GSSG (249). Navedeno istraživanje (Bose i suradnici) (113) još je jedna potvrda kako glukozinolati ostvaruju svoj kardioprotektivni učinak kroz poticanje glutaciona, što se slaže i s rezultatima opaženima i u ovom istraživanju. Ipak, treba napomenuti kako razinu glutaciona treba staviti u ispravni kontekst. Tako su primjerice Emeka i suradnici (244) u štakorskom modelu kardiomiopatije izazvane akroleinom pronašli povišene razine GSH u srčanom tkivu kao adaptivni odgovor na intenzivni oksidacijski stres uzrokovan akroleinom. Međutim, u bioptatima miokarda skupine koja je pretretirana sulforafanom uočene su značajno niže razine GSH u odnosu na skupinu tretiranu samo akroleinom, što upućuje na zaključak da sulforafan može ublažiti oksidacijski stres i time smanjiti potrebu za sintezom GSH (244).

Sergazy i autori (176) pronašli su da ekstrakt polifenola grožđa povećava razinu glutaciona u tkivu miokarda štakora s doksorubicinom induciranom kardiotoksičnošću. Štoviše, autori su predložili kako se kardioprotektivni učinak polifenola iz grožđa upravo ostvaruje putem povećanja koncentracije i aktivnosti antioksidacijskih enzima - superoksid dizmutaze, katalaze i glutation peroksidaze. Naime, u štakora tretiranih samo doksorubicinom zabilježen je značajan pad glutaciona u miokardu u odnosu na zdravu kontrolu. U skupini štakora, koji su uz doksorubicin, tretirani i polifenolima iz grožđa, razine glutaciona su se značajno oporavile, dosežući razine usporedive s onima u kontrolnoj skupini (176). Ovakav

rezultat, u kontekstu sličnih rezultata u ovom istraživanju, govorio bi u prilog kardioprotektivnog djelovanja sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule. Ipak, treba napomenuti da su u spomenutom istraživanju životinje bile izložene doksirubicinu te je primjena polifenola dovela samo do obnove glutaciona na razine usporedive s kontrolnom skupinom. Za ovo bi istraživanje bilo relevantnije da se zabilježio porast glutaciona u miokardu zdravih pokusnih životinja nakon primjene ekstrakta polifenola grožđa. Rezultati slični prethodnom istraživanju pronađeni su u štakorskom modelu infarkta miokarda izazvanog izoprenalin hidrokloridom. Naime, pretretman polibiljnom formulacijom (češnjak, pravi lan i *Trigonella foenum-graecum*) rezultirao je značajnim povišenjem razina glutaciona i drugih antioksidacijskih enzima u srčanom tkivu, koji su bili smanjeni zbog oksidacijskog stresa induciranog izoprenalinom, slično kao prethodno spomenuti doksirubicin (250). Važno je napomenuti kako je ovdje riječ o reduciranom glutationu (GSH), a ne o ukupnom (tGSH) koji je izmjeren u ovom istraživanju.

Fiziološka uloga i učinci tretmana u pokusu:

- tGSH (ukupni glutation) – najzastupljeniji endogeni antioksidans u miokardu, nužan za održavanje redoks ravnoteže, neutralizaciju reaktivnih kisikovih radikala i zaštitu kardiomiocita od oštećenja posredovanog oksidacijskim stresom (236)
- sinigrin – ima učinak; subkronična primjena rezultirala je statistički značajno povišenom koncentracijom tGSH u miokardu ženki u odnosu na kontrolnu skupinu
- ekstrakt HT – ima učinak; primjena ovog ekstrakta dovela je do statistički značajno povišene koncentracije tGSH u miokardu tretirane skupine u odnosu na kontrolnu skupinu (kao i kod mužjaka u odnosu na kontrolne ženke)
- ekstrakt RT – nema značajnog učinka na koncentraciju tGSH u miokardu

#### 5.7.2. Učinak sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule na katalazu i SOD

Analizom enzimske aktivnosti superoksid-dismutaze (SOD) nisu zapažene statistički značajne razlike između eksperimentalnih skupina tretiranih vodenom otopinom sinigrina (**Slika 33.**), kao ni eksperimentalnih skupina tretiranih vodenim ekstraktima klijanaca brokule u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (**Slika 34.**). Također, statistički značajne razlike nisu

zapažene niti prilikom usporedbe navedenih skupina prema spolu. Nadalje, rezultati dobiveni mjerenjem enzimske aktivnosti katalaze ukazuju na statistički značajan porast enzimske aktivnosti katalaze u eksperimentalnoj skupini ženki tretiranih vodenom otopinom sinigrina (Sinig.<sub>ž</sub>) u odnosu na kontrolnu skupinu ženki (Kont.<sub>ž</sub>) i ekperimentalnu skupinu mužjaka tretiranih vodenom otopinom sinigrina (Sinig.<sub>M</sub>) (**Slika 31**). Izmjerene aktivnosti katalaze i SOD-a mogu se protumačiti slično kao i koncentracija glutaciona gdje se povećanje aktivnosti navedenih enzima obično tumači kao posljedica povećanog oksidacijskog stresa, ili kao povećanje antioksidacijskih mehanizama. SOD je jedan od najpotentnijih unutarstaničnih antioksidacijskih enzima. Njena glavna uloga je kataliziranje pretvorbe visokoreaktivnog superoksid aniona u molekularni kisik i manje reaktivan vodikov peroksid (251). Uklanjanjem superoksidnog radikala, SOD sprječava stvaranje još štetnijih kisikovih radikala, poput hidroksilnog radikala, koji se može formirati iz vodikovog peroksida putem Fentonove reakcije (252). Katalaza je enzim koji se uglavnom nalazi u peroksisomima aerobnih stanica (251). Ona igra ključnu ulogu u detoksikaciji vodikovog peroksida, kojeg proizvodi SOD ili drugi stanični procesi. Katalaza katalizira brzu razgradnju u vodu i molekularni kisik (253). Ova reakcija sprječava akumulaciju vodikovog peroksida, koji je sam po sebi štetan, ali i prekursor za stvaranje izuzetno reaktivnog hidroksilnog radikala. Katalaza ima jednu od najvećih stopa obrtaja među svim enzimima, što znači da može konvertirati ogroman broj molekula u minuti, osiguravajući učinkovitu zaštitu stanica od njegovih toksičnih učinaka (251). Zajedničkim djelovanjem, SOD i katalaza uklanjaju reaktivne kisikove vrste, pri čemu SOD prvo neutralizira superoksid anion, a zatim katalaza preuzima detoksikaciju nastalog vodikovog peroksida (252). Ovo sekvencijalno djelovanje enzima esencijalno je za održavanje redoks homeostaze i zaštitu stanica od oksidacijskog oštećenja (254).

Rezultati ovog istraživanja, djelomično se poklapaju s rezultatima sličnih istraživanja. Miller-Cebert (255) i suradnici su u svojem istraživanju, koje je proučavalo kemoprotektivna svojstva različitih krstašica u azoksimetanom-induciranom karcinomu kolona, utvrdili kako prehrana određenim krstašicama može značajno povećati aktivnost jetrene katalaze u muških štakora. Osim smanjene incidencije karcinoma, u eksperimentalnim skupinama štakora koje su hranjene uljenom repicom pronađene su statistički značajno povišene aktivnosti katalaze i glutation-s-transferaze (GST) u jetri u odnosu na kontrolnu skupinu, ali i skupine hranjene drugim krstašicama (kupus, repenjak, tamni lisnati kelj). Aktivnosti SOD-a u jetri bile su sličnih vrijednosti među eksperimentalnim skupinama hranjenim različitim (255), ali u općem aspektu podržavaju rezultate ovog istraživanja, točnije premisu kako primjena sinigrina jača antioksidacijsku obranu srca, i to putem poticanja aktivnosti katalaze. U svim ostalim

aspektima razlikuje se, počevši od činjenice da u ovom istraživanju nije bilo statistički značajne promjene aktivnosti SOD-a. Također, u predmetnom istraživanju je jetra, a ne srce, promatrani organ, odnosno tkivo u kojem su se mjerile aktivnosti enzima. Naposljetku, autori su u istraživanju koristili isključivo mužjake štakora, a u našem istraživanju je statistički povišena aktivnost katalaze uočena samo u miokardu ženki ispitivane skupine tretirane sinigrinom. Razlog zašto su autori izabrali samo mužjake štakora je izgledno zbog samog modela istraživanja, odnosno proučavanja kancerogeneze koja je uočljivija u muških štakora, a moguće i zbog varijabilnosti koja proizlazi iz hormona ženki, odnosno estrusnog ciklusa (256). Sličan rezultat pronađen je u istraživanju Hazineci i suradnika, koje je metodološki bliže ovom istraživanju, a kod njega su autori mjerili aktivnost katalaze i SOD-a u miokardu štakora nakon sedmodnevne aplikacije amiodarona i bijelog kupusa. Autori su zaključili kako bi bijeli kupus zbog svog zaštitnog učinka mogao biti dobar alternativni pristup prevenciji nuspojava amiodarona. Zaštitni učinak bijelog kupusa bio je, između ostalog, vidljiv i kroz povećanje aktivnosti SOD-a i katalaze u miokardu štakora koji su, uz amiodaron primali i bijeli kupus. Povećana aktivnost ovih enzima protumačila se kao pojačanje antioksidacijske obrane, a ne kao pojačani oksidacijski stres uslijed štetnog djelovanja, što je potkrijepljeno istovremenim smanjenjem razina lipidne peroksidacije i sijalične kiseline (257). Osim što su se aktivnosti ovih enzima mjerile u srcu, kao što je to bio slučaj i u ovom istraživanju, valja istaknuti kako je sličan i sastav fitokemikalije kojom su se tretirale eksperimentalne životinje. Naime, najzastupljeniji glukozinolati u bijelom kupusu jesu sinigrin, glukobrasacin i glukoiiberin (258), a u ovom je istraživanju zabilježen statistički značajan rezultat upravo za sinigrin. Yang je u svojem istraživanju pronašao kako pretretman štatorskih kardiomiocita (H9c2 stanice) ekstraktom kupusa štiti stanice od vodikovim peroksidom ( $H_2O_2$ ) uzrokovane stanične smrte. Također je uočeno kako je ekstrakt kupusa uspješno sprječio proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta i pojačao izražaj antioksidacijskih enzima, katalaze i SOD-a u kardiomiocitima, mjereno tehnikom western blota. Opaženi učinak je ovisio o primijenjenoj dozi. Inače, sam tretman  $H_2O_2$  značajno je smanjio izražaj antioksidacijskih enzima u kardiomiocitima – u odnosu na zdravu skupinu, za SOD-1 je evidentiran 0,53 puta manji izražaj, a za katalazu 0,45 puta. Pretretman ekstraktom kupusa u svim koncentracijama (100, 200, and 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) doveo je do obnove izražaja katalaze i SOD-a u odnosu na kardiomiocite tretirane samo s  $H_2O_2$ , a pretretman s 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ekstrakta kupusa rezultirao je razinama katalaze i SOD-a usporedivima sa zdravom kontrolom (259). Iako navedeno istraživanje podržava pozitivnu korelaciju primjene sinigrina i povišene aktivnosti katalaze, ipak je riječ o istraživanju provedenom na staničnoj kulturi, a ne životinjskom modelu; mjeren

je izražaj SOD-a i katalaze, a ne njihova aktivnosti te je riječ o utjecaju ekstrakta kupusa na snižene razine enzima, nastale primjenom  $H_2O_2$ . U već prethodno spomenutom istraživanju Xu i suradnika (158), koje je proučavalo učinak primjene ekstrakata klijanaca brokule na kardiomiopatiju u dijabetičkih miševa, pronađeno je kako tromjesečna primjena visokih doza ekstrakata klijanaca brokule dovodi do znatnog smanjenja razine oksidacijskog stresa u srcu, što je između ostalog vidljivo i kroz povećani izražaj katalaze u miokardu. Autori su, mjereći izražaj transkripcijskog faktora Nrf2 (western blot), zaključili kako ekstrakti klijanaca brokule, slično kao sulfarafan, snažno aktiviraju Nrf2, a to je potkrijepljeno i praćenjem izražaja „nizvodnih gena“, uključivši i gen za katalazu. Upravo je poticajno djelovanje na Nrf2 jedan od glavnih načina na koji izitiocijanati (npr. sinigrin) i ekstrakti klijanaca brokule koji ih sadržavaju, utječu na povećanje aktivnosti SOD-a i katalaze, o čemu je više napisano u literaturnom pregledu. Nrf2 je izuzetno bitan za obranu od oksidacijskog stresa i za redoks status, a može potaknuti ekspresiju više od 200 gena, uključivši i gene za SOD i katalazu (158). Akhlaghi i Bandy su nakon 10-dnevnog tretmana 2%-tnim osušenim klicama brokule u štakorskom modelu ishemije-reperfuzije miokarda detektirali jasne benefite na miokard, u vidu smanjenja biljega nekroze, apoptoze i smenjenja oksidacijskog stresa, ali bez značajnog utjecaja na glutation i enzime faze 2 metabolizma, poput glutamat-cistein ligaze (GCL) i kinon reduktaze (NQO1) (10). Zbog toga možemo reći da glukozinolati vjerojatno na više različitih načina ostvaruju svoje antioksidacijsko djelovanje i da ono ponekad ne mora biti popraćeno povišenjem razina SOD-a i katalaze. Ako kontekstualiziramo statistički značajan nalaz izmjerenih aktivnosti katalaze s drugim parametrima oksidacijskog stresa, mogli bismo donijeti opći zaključak o povoljnom djelovanju sinigrina, odnosno vodenih ekstrakata klijanaca brokule na oksidacijski status miokarda. Prvenstveno, nije bilo statistički značajnih razlika u mjerenju MDA između eksperimentalnih skupina (sinigrin i vodeni ekstrakti klijanaca brokule) i kontrole, što barem najmanje znači da primjena sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule nije dovela do pojačanog lipidne peroksidacije u miokardu. Također, kod primjene obje vrste vodenih ekstrakata klijanaca brokule uzgajanih pri različitim temperaturama zabilježeno je statistički značajno povećanje antioksidacijskog kapaciteta izmjerenog FRAP i ABTS metodom.

U ovom istraživanju statistički značajne razlike u aktivnosti katalaze zapažene su samo u ženskog spola. Slični, o spolu ovisni odgovori, zapaženi su i za druge parametre miokarda, čak izvan parametara oksidacijskog stresa, uključivši irizin i ANP. Nekoliko je mogućih uzroka ovakvih rezultata. Postoje dokazi da su bazalne razine antioksidacijskih enzima različite između spolova, s učestalijim nalazom učinkovitije antioksidacijske obrane u ženki

(260). Melnik i suradnici su u svojem istraživanju na ukupno 60 laboratorijskih štakora utvrdili kako su u miokardu mužjaka statistički značajno niže aktivnosti SOD-a, NADPH-oksidge i H<sub>2</sub>S u odnosu na ženke, a više su razine MDA, što sveukupno potvrđuje prevladavajuću premisu o slabijem antioksidacijskog odgovoru u mužjaka. Štoviše, eksperimentalna kastracija mužjaka rezultirala je povećanjem aktivnosti SOD-a, NADPH-oksidge i razina H<sub>2</sub>S-a, a kastracija ženki dovela je do upravo oprečnih promjena. Nakon hormonske nadoknade kastriranih životinja vrijednosti navedenih parametara bile su usporedive s kontrolnim skupinama. Autori su zaključili kako je visoka razina estradiola i niska razina testosterona u plazmi povezana s visokom razinom H<sub>2</sub>S, koji u miokardu predstavlja bitan čimbenik spolnog dimorfizma (260). Borrás i suradnici su proveli istraživanje na ženama reproduktivne dobi koje su bile u procesu medicinski potpomognute oplodnje i shodno tome su bile podvrgnute medicinski induciranoj menopauzi. Istraživači su uzorkovali krvi u različitim fazama tretmana (bazalno stanje, inducirana menopauza, tretman estrogenom, tretman estrogenom i progesteronom) i u svakom uzorku odredili izražaj mRNA za antioksidacijske gene i „gene dugovječnosti“ u mononuklearima periferne krvi. Rezultati su jasno pokazali kako u razdoblju inducirane menopauze dolazi do sniženog izražaja antioksidacijskih gena, a u fazi tretmana estrogenom i progesteronom dolazi do snažnog obnavljanja antioksidacijskih kapaciteta, uključivši i izražaj SOD-a (261). Estrogeni mogu izravno utjecati na enzimske putove ili neizravno putem svojih receptora, aktivirajući signalne putove koji dovode do povećane proizvodnje antioksidacijskih enzima. Unutar stanice, estrogeni se vežu za svoje membranske receptore, aktiviraju MAP kinaza-NFκB put i pojačavaju transkripciju antioksidacijskih enzima, posebno glutation peroksidaze i SOD 2 (262). Iako pri fiziološkim uvjetima to nije kapitalni način djelovanja, jedan od mogućih učinaka estrogena je i izravno uklanjanje slobodnih radikala, što se može prepisati prisutnosti benzenskog prstena koji uklanja hidroksilne radikale (262). Estrogen također modulira NADH/NADPH oksidge i ekspresiju gena za AT1 receptor, koji su glavni izvori proizvodnje superoksidnog aniona (263). Sve navedeno govori u prilog inherentnoj razlici u snazi antioksidacijske obrane između spolova, što može utjecati na to kako se organizam mužjaka i ženki nosi s oksidacijskim stresom i kako reagiraju na prehrambene intervencije, poput tretmana sinigrinom i ekstraktima klijanaca brokule. Pojednostavljeno rečeno, postoji mogućnost da je bazalno jači antioksidacijski sustav ženki u stanju adekvatnije ili jače odgovoriti na tretman fitokemikalijama s antioksidacijskim djelovanjem, nego li sustav mužjaka, što bi moglo objasniti naše rezultate. Ovu premisu su u svojem istraživanju potvrdili Angeloni i suradnici (264) pokazavši po prvi put kako estrogen ima bitnu ulogu u moduliranju

protektivnog učinka nutritivno vrijedne, odnosno funkcionalne hrane, kao što su glukozinolati. U svojem su istraživanju istraživali učinak  $17\beta$ -estradiola (E2) i sulforafana na oksidacijsko oštećenje, inducirano vodikovim peroksidom, u staničnoj kulturi primarnih kardiomiocita štakora. Rezultati istraživanja jasno su ukazali kako E2 pojačava antioksidacijski učinak sulforafana putem stimuliranja enzima faze II i aktivacijom „signalnih puteva preživljenja“. Dok sam sulforafan (u nižoj koncentraciji od  $0,5 \mu\text{M}$ ) ili E2 samostalno nisu u potpunosti zaštitili kardiomiocite od oksidacijskog stresa, njihova kombinacija je to učinila. E2 je pospješio sposobnost sulforafana da neutralizira oksidacijski stres smanjenjem unutarstaničnih reaktivnih kisikovih vrsta i razine 8-hidroksi-2'-deoksigvanozina, te povećanjem ekspresije enzima faze II, uključivši i katalazu. Nijedan od tretmana (E2, sulforafan, E2 + sulforafan) nije značajno utjecao na razine ekspresije SOD-a, slično kao i u ovom istraživanju. Zanimljivo je da ti učinci nisu posredovani klasičnim estrogenskim receptorima  $\alpha$  i  $\beta$ . Umjesto toga, čini se da su uključeni signalni putevi ERK1/2 i Akt (264). Sumarno gledajući, rezultati ovog istraživanja mogu ponuditi valjano objašnjenje zašto je statistički značajan rezultat zapažen samo u skupini ženki, a istovjetno rezultatima ovog istraživanja, terapijska intervencija nije imala utjecaj na SOD, već samo na katalazu. Jedan od mogućih uzroka zašto se u istraživanju Angeloni i suradnika nije utvrdio učinak na aktivnost SOD jesu niže koncentracije upotrebljenog sulforafana i estradiola. Naime, neki od autora su koristeći znatno više koncentracije E2 ( $5\mu\text{M}$ ) utvrdili utjecaj na HO-1, SOD-1 i aktivaciju Nrf2 (265). Angeloni i suradnici opredjelili su se za 10 puta niže koncentracije E2 (10–50 nM), koje odgovaraju fiziološkim vrijednostima. Također, vrijednosti sulforafana odabrane su na način da odgovaraju realnim i ostvarivim vrijednostima koncentracije u plazmi nakon konzumacije brokule, uzevši u obzir slabu bioraspoloživost glukozinolata (264). Općenito, rezultati ovog istraživanja vezani za aktivnost antioksidacijskih enzima uglavnom su sukladni s dosadašnjim istraživanjima i saznanjima o antioksidacijskom djelovanju sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule na miokard. Vrlo izgledan razlog činjenici zašto je statistički značajan rezultat zapažen samo u eksperimentalnoj skupini ženki je moguće moduliranje učinka fitokemijskih spojeva od strane estrogena, za što postoje jasni dokazi u literaturi. Svakako su potrebna daljnja istraživanja s ciljem ispitivanja ovog učinka glukozinolata samo u ženki.

Fiziološka uloga i učinci tretmana u pokusu:

- SOD i katalaza – ključni su endogeni antioksidacijski enzimi koji djeluju sekvencijalno: SOD katalizira pretvorbu visokoreaktivnog superoksid aniona u

vodikov peroksid, dok katalaza brzo razgrađuje vodikov peroksid u vodu i molekularni kisik, čime se sprječava stvaranje izrazito toksičnog hidroksilnog radikala i održava redoks homeostaza stanice (254)

- Sinigrin (utjecaj na SOD) – nema učinka; subkronična primjena nije dovela do statistički značajnih razlika u aktivnosti SOD-a u miokardu ni u jednoj skupini u odnosu na kontrolu.
- Sinigrin (utjecaj na katalazu) – ima učinak; utvrđen je statistički značajan porast enzimske aktivnosti katalaze isključivo u miokardu tretiranih ženki u odnosu na ženke kontrolne skupine i mužjake tretirane skupine
- ekstrakti RT i HT - nemaju učinka na aktivnost SOD-a i katalaze; primjena vodenih ekstrakata nije dovela do statistički značajnih promjena enzimske aktivnosti u homogenatima tkiva miokarda.

### 5.7.3. Učinak sinigrina i ekstrakata kljanaca brokule na MDA

Malondialdehid (MDA) reaktivni je aldehid koji nastaje kao krajnji produkt peroksidacije lipida, procesa u kojem slobodni radikali oštećuju polinezasićene masne kiseline u staničnim membranama. Zbog toga se MDA uvriježeno koristi kao biološki biljeg za procjenu razine oksidacijskog stresa i staničnog oštećenja, uključivši i istraživanja o srčanim bolestima. Povišene razine MDA često su povezane s raznim patološkim stanjima, poput hipertenzije, šećerne bolesti i zatajenja srca (266). U uzorcima se MDA najčešće detektira spektrofotometrijskim metodama, kao što je to bio slučaj u ovom istraživanju. Prilikom mjerenje treba uzeti u obzir moguće kemijske reakcije s različitim reagensima i artefaktnu produkciju tijekom skladištenja, pogotovo u plazmi i serumu (267). Srećom, ti su rizici su u ovom istraživanju zanemarivi jer se MDA, kao i ostali parametri, određivao u homogenatima tkiva. Analiza rezultata nije ukazala na statistički značajnu promjenu koncentracije MDA u tkivu miokarda eksperimentalnih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu, ni prilikom tretmana sinigrinom (Slika 35.), niti kod tretmana vodenim ekstraktima kljanaca brokule uzgajanih pri različitim temperaturama okoline (Slika 36.). Najopćenitije, takav rezultat mogli bismo protumačiti kao pretpostavku da sinigrin i ekstrakti kljanaca brokule, korišteni u eksperimentalnom tretmanu, nisu uzrokovali pojačanje oksidacijskog stresa u miokardu. Ipak,

kako nije zapaženo smanjenje MDA u miokardu ispitivanih skupina, samo iz vrijednosti MDA nemoguće je zaključiti o povoljnom ili prooksidacijskom djelovanju sinigrina i vodenih ekstrakata klijanaca brokule. Naši rezultati u suprotnosti su s rezultatima Raish i suradnika (268), koji su na štakorskom modelu ozljede miokarda izazvane izoprotenerolom, pronašli da pretretman sokom cikla smanjuje ozljedu miokarda reducirajući oksidacijski stres, upalu i apoptozu. Metodološki je istraživanje slično istraživanju ove doktorske disertacije – pokusne životinje tretirane su na istovjetan način (*ig* sonda), eksperimentalni tretman primijenjivao se jednako dugo (28 dana), a vrijednosti parametara izmjerene su u homogenatima tkiva miokarda. Analiza rezultata pokazala je značajno smanjenje MDA u skupini koja je, uz izoprotenerol, primala sok cikla od 150 mg/kg TT ( $4.41 \pm 0.48$  nmol/g) i 300 mg/kg ( $2.35 \pm 0.18$  nmol/g) TT, u odnosu na skupinu koja je bila tretirana samo izoprotenerolom ( $10.50 \pm 0.82$  nmol/g). Sličan učinak je bio i na razine katalaze, SOD-a i NO (268). Za razliku od ovog istraživanja, već iz analize vrijednosti MDA može se razabrati antioksidacijsko djelovanje. Ipak, slično kao što je već prethodno nekoliko puta navdano prilikom tumačenja rezultata, eksperimentalne životinje korištene u ovom istraživanju bile su zdrave, a u navedenoj, kao i u većini drugih istraživanja, radilo se o modelu neke bolesti ili je dizajn istraživanja bio takav da se namjerno izaziva ozljeda, odnosno oštećenje miokarda. U takvom kontekstu, očekivano je drastično povećanje biljega oksidacijskog stresa kao što je MDA te se, jednako tako, na takvoj povećanoj vrijednosti, puno izglednije može zabilježiti pad tijekom terapijske intervencije. U istraživanju Hazineci i suradnika primijećeno je smanjenje razina lipidne peroksidacije (uključuje i MDA) u miokardu štakora koji su tretirani ekstraktom bijelog kupusa i amiodaronom u usporedbi sa štakorima koji su uzimali samo amiodaron (257). Rezultati navedenog istraživanja ne začuđuju u sniženim vrijednostima lipidne peroksidacije u usporedbi sa skupinom štakora koja je bila podvrgnuta nekom štetnom djelovanju. Činjenica je da u zdravim biološkim sustavima prevladavaju niske vrijednosti MDA. Fiziološke razine MDA iznimno su niske; primjerice u ljudskoj plazmi koncentracija slobodnog MDA obično je ispod 25 nM (269). U jednom je istraživanju, u miševa hranjenih standardnom prehranom, izmjerena razina MDA u homogenatu ventrikularnog tkiva miokarda iznosila  $175.8 \pm 39.1$  pmol/mg proteina, što se označilo normalnom fiziološkom razinom za kontrolnu skupinu u tom istraživanju (270). Direktne spektrofotometrijske metode i HPLC-UV (eng. *High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet detection*) često nemaju dovoljnu osjetljivost za detekciju fizioloških razina MDA (obično 0–0.5  $\mu$ M). Također, klasični test s tiobarbituratnom kiselinom (TBA), korišten i u ovom istraživanju, iako formira kromogen, nije dovoljno specifičan jer i drugi spojevi popu šećera,

aminokiselina i bilirubina mogu reagirati s TBA, što dodatno otežava precizno mjerenje pravih razina MDA i dovodi do suptilnih maskiranja malih, ali biološki važnih promjena (269).

Fiziološka uloga i učinci tretmana:

- MDA (malondialdehid) – reaktivni aldehid koji nastaje kao krajnji produkt peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina u staničnim membranama; predstavlja klasični i općeprihvaćeni biološki biljeg staničnog oštećenja i razine oksidacijskog stresa u tkivima (267)
- sinigrin – nema učinka; subkronična primjena nije rezultirala statistički značajnom promjenom koncentracije MDA u miokardu u odnosu na kontrolnu skupinu
- ekstrakti RT i HT - nemaju učinka; primjena vodenih ekstrakata klijanaca brokule također nije dovela do statistički značajnih razlika u razinama MDA u tkivu miokarda eksperimentalnih životinja.

#### 5.7.4. *Učinak sinigrina i ekstrakata klijanaca brokule na antioksidacijski kapacitet tkiva miokarda*

Antioksidacijski kapacitet odnosi se na sposobnost biološkog sustava, ekstrakta ili spoja u neutraliziranju slobodnih radikala i reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva, čime se sprječava ili smanjuje oksidacijsko oštećenje stanica i molekula. U širem smislu, ukupni antioksidacijski kapacitet (engl. *Total Antioxidant Capacity* – TAC) procjenjuje kumulativnu antioksidacijsku snagu složenog materijala (npr. ekstrakta ili biološke tekućine) koja proizlazi iz sinergističkog ili antagonističkog djelovanja pojedinačnih komponenti (271). Određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta omogućava procjenu stvarne obrambene moći organizma protiv oštećenja uzrokovanih viškom slobodnih radikala i odražava stvarni redoks balans (272). U ovom su istraživanju utvrđeni statistički značajni rezultati za antioksidacijski kapacitet samo u skupini miševa tretiranih vodenim ekstraktima klijanaca brokule, ali ne i onih tretiranih sinigrinom (Slika 38 i Slika 40). Antioksidacijski kapacitet mjeren FRAP metodom bio je statistički značajno viši u obje skupine tretirane ekstraktima klijanaca brokule ( $RT_{ekst.}$  i  $HT_{ekst.}$ ) u odnosu na kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$  i  $p < 0,0001$ ), s tim da je omjer bio veći za  $RT_{ekst.}/Kont$  nego  $HT_{ekst.}/Kont$  (Slika 38a.). Prilikom razdiobe skupina prema spolu, utvrđen je statistički značajno povišen antioksidacijski kapacitet u mužjaka skupine tretirane

vodenim ekstraktom klijanaca brokule uzgajanih pri  $t = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\text{RT}_{\text{ekst.M.}}$ ) u odnosu na mužjake i ženke kontrolne skupine ( $\text{Kont.}_M$  i  $\text{Kont.}_Z$ ) ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ ) (Slika 38b). U ženki iste ispitivane skupine ( $\text{RT}_{\text{ekst.Z.}}$ ) pronađen je statistički značajno povišen antioksidacijski kapacitet u odnosu na mušku ( $\text{Kont.}_M$ ) ( $p < 0,01$ ), ali ne i žensku ( $\text{Kont.}_Z$ ) kontrolu. Relativno slični rezultati zapaženi su i kod antioksidacijskog kapaciteta mjenog ABTS metodom. Naime, obje ispitivane skupine ( $\text{RT}_{\text{ekst}}$  i  $\text{HT}_{\text{ekst.}}$ ) imale su statistički značajno povišen antioksidacijski kapacitet u odnosu na kontrolnu skupinu, s tim da je omjer u odnosu na kontrolnu skupinu također bio viši u skupini  $\text{RT}_{\text{ekst}}$  ( $p < 0,0001$ ) u odnosu na skupinu  $\text{HT}_{\text{ekst}}$  ( $p < 0,01$ ) (Slika 40a). Prilikom razdiobe prema spolu, skupina  $\text{RT}_{\text{ekst.M.}}$  imala je statistički značajno viši antioksidacijski kapacitet mjenog ABTS u odnosu na mužjake ( $\text{Kont.}_M$ ) i ženke kontrolne skupine ( $\text{Kont.}_Z$ ) ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ ). Slično, skupina  $\text{RT}_{\text{ekst.Z.}}$  imala je statistički značajno povišen antioksidacijski kapacitet u odnosu na mušku i žensku kontrolnu skupinu ( $p < 0,05$ ) (Slika 40b).

Testovi FRAP i ABTS najčešće su korištene *in vitro* metode za procjenu antioksidacijskog kapaciteta. Iako se obje metode temelje na prijenosu elektrona s antioksidansa na reagens, uzrokujući promjenu boje koja se mjeri spektrofotometrijski, postoje određene razlike, stoga se ne preporučuje korištenje samo jedne metode jer to može dovesti do pogrešnih rezultata. Upravo su se iz toga razloga u ovom istraživanju koristile obje metode. Metoda FRAP je jednostavna i brza za izvođenje, ponovljiva i relativno osjetljiva na hidrofilne antioksidanse te zato dobro kolerira s ukupnim sadržajem polifenola u nekim uzorcima (273). Nedostatak je što ne detekira antioksidanse koji djeluju mehanizmom gašenja slobodnih radikala (engl. *hydrogen atom transfer – HAT*) (274), radna pH-vrijednost otopine od 3.6 ne odgovara fiziološkoj što može utjecati na reaktivnost nekih antioksidansa i ne reagira na sve antioksidanse (273). Metoda ABTS može mjeriti antioksidacijsku aktivnost jednako hidrofилnih i lipofilnih tvari, reaktivna je s većinom antioksidanasa, brza je i primijenjiva na širok raspon uzoraka, uključivši složene biološke sustave poput krvne plazme i biljnih ekstrakata (269). Također, omogućuje mjerenje antioksidacijske aktivnosti smjesa tvari, pomažući razlikovati aditivne od sinergističkih učinaka. Jedan od nedostataka ABTS metode je činjenica da je riječ o ne-fiziološkom slobodnom radikalu što može biti nedostatak prilikom interpretacije biološkog značaja. Neki autori navode kako može davati više vrijednosti antioksidacijskog kapaciteta u usporedbi s testom DPPH, posebno za hidrofilne i visoko pigmentirane antioksidanse (269). Zanimljivo je zapažanje da postoji povećanje antioksidacijskog kapaciteta mjenog objema metodama samo u eksperimentalnim skupinama tretiranim ekstraktima klijanaca brokule, ali ne i sinigrina, za kojeg je, pak,

zabilježeno istovremeno induciranje aktivnosti antioksidacijskog enzima katalaze. Ovom opažanju nameće se logično objašnjenje da su ekstrakti klijanaca brokule složena smjesa različitih, biološki aktivnih fitokemikalija, koje mogu imati širi i mjerljiviji utjecaj na ukupni antioksidacijski kapacitet u usporedbi s pojedinačnim glukozinolatima, kao što je sinigrin. Dakle, osim što su ekstrakti složena smjesa, izglednu razliku vjerojatno čini i prisutnost samih polifenola. Iako su i glukozinolati i polifenoli poznati kao snažni antioksidansi, moglo bi se reći da polifenoli direktnije ostvaruju svoj antioksidacijski učinak. Naime, polifenoli mogu direktno djelovati na slobodne radikale i djelovati poput pufera, skupljajući elektrone jezgrom svoje molekule. Brojni polifenoli mogu vezati ione prijelaznih metala poput željeza ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) i bakra ( $\text{Cu}^{2+}$ ), čime sprječavaju sudjelovanje ovih metala u Fentonovoj reakciji, koja je glavni izvor stvaranja visoko reaktivnih hidroksilnih radikala. Indirektno djelovanje sastoji se poticajnim djelovanjem na katalazu, SOD i glutation peroksidazu te inhibitornim djelovanjem na enzime koji radikale proizvode, uključujući ksantin oksidazu i NADPH oksidazu (8). Glukozinolati svoje antioksidacijsko djelovanje ostvaruju uglavnom poticanjem signalnog puta Nrf2/ARE. Nrf2 je glavni regulator ekspresije brojnih antioksidacijskih enzima i enzima faze II detoksikacije. To uključuje enzime poput superoksid dismutaze, katalaze, heme oksigenaze-1, glutation peroksidaze, tioredoksina, NAD(P)H-kinon oksidoreduktaze 1 i glutation S-transferaze (81). Pojednostavljeno bismo polifenole mogli promatrati kao „direktne antioksidanse“, a glukozinolate kao „indirektne antioksidanse“. S obzirom na to da metode FRAP i ABTS prvenstveno mjere direktno antioksidacijsko djelovanje, odnosno sposobnost spojeva da neutraliziraju radikale, logično je očekivati da će polifenoli pokazati viši antioksidacijski kapacitet u ovim testovima u usporedbi s glukozinolatima, čak i u živom organizmu. To je zato što FRAP i ABTS nisu primarno dizajnirani za mjerenje indirektnog antioksidacijskog djelovanja, koje pokazuju upravo glukozinolati. Nadalje, *in vitro* dokazi jasno upućuju na to da polifenoli, zbog svoje sposobnosti direktnog hvatanja slobodnih radikala, pokazuju znatno veći antioksidacijski kapacitet u FRAP, ABTS i DPPH testovima u usporedbi s glukozinolatima i njihovim derivatima. Istraživanja su potvrdila da su fenolni spojevi, poput miricetina, kvercetina-3-galaktozida i kvercetina-3-glukozida, značajno jači antioksidansi od alil-izotiocijanata (nastaje od sinigrina) u *in vitro* mjerenjima (275). Ipak, ne treba zaboraviti da ne smijemo s lakoćom translirati *in vitro* odnose na živi organizam. Isto tako, u ovom istraživanju nije promatran antioksidacijski kapacitet u pripravcima fitokemikalija, odnosno vodenim ekstraktima klijanaca brokule i vodenom ekstraktu sinigrina, već u miokardu. Naime, i glukozinolati i polifenoli se odlikuju malom bioraspoloživosti nakon ingestije, uz mogućnost opsežnog

metaboliziranja i pretvorbenih reakcija koje se mogu dogoditi od početka ingestije do njihova prenošenja do ciljnog organa (23) (66). Uz to, glukozinolati su, a time i sinigrin iz našeg istraživanja, sami po sebi kemijski i biološki inertni, sve dok se posredstvom enzima mirozinaze ne prevedu u biološki aktivne spojeve, najčešće izotiocijanate, baš kao što se sinigrin prevodi u alil-izotiocijanat. Zato bioraspoloživost glukozinolata uvelike ovisi o prisutnosti endogene mirozinaze u crijevima ili drugim tkivima za konverziju u alil-izotiocijanat, njegov aktivni oblik (32). Izgledno je da do srca dođu vrlo niske koncentracije sinigrina, ali i ostalih glukozinolata iz ekstrakata klijanaca brokule. U istraživanjima koja su koristila radiokativno označene izotiocijanate najviša je distribucija radiokativnosti bila u crijevima, jetri, bubrezima, mokraćnom mjehuru, plućima i slezeni, a uz mozak, srce je pripadalo organima s nižom distribucijom radioaktivnosti (23). U kontekstu bioraspoloživosti i ocjene mogućeg doprinosa polifenola ukupnom antioksidacijskom kapacitetu u miokardu, zanimljivo je istaknuti kako se polifenoli mogu distribuirati i akumulirati u organima nakon apsorpcije u krvotok. Prema Matsui, akumulacija polifenola u organima slijedi redosljed: bubreg > jetra > pluća > srce > mišići (276). Wallace i suradnici također su poduprijeli ideju da se prehrambeni polifenoli mogu akumulirati u tkivima, što rezultira višom lokalnom koncentracijom tih spojeva, a time i većim potencijalom za razvoj kardioprotektivnog učinka. U njihovom je istraživanju koncentracija resveratrola, polifenola iz grožda, bila 2,4 puta veća u jetri i miokardu miševa nego u plazmi (277). Arunwan Udomkasemsab i suradnici su primijetili značajno više razine ukupnih flavonoida i ukupnih fenola u srčanom tkivu štakora koji su konzumirali ekstrakte mao bobica (278). Sveukupno gledajući, polifenoli se mogu nakupljati u perifernim tkivima, uključivši i miokard, što, unatoč njihovoj slaboj biodostupnosti, može potencirati biološko djelovanje. Zaključno bismo rezultat povišenog antioksidacijskog kapaciteta u miokardu nakon tretmana ekstraktima klijanaca brokule mogli protumačiti kao sinergijsko antioksidacijsko djelovanje glukozinolata i polifenola.

Fiziološka uloga i učinci tretmana u pokusu:

- ukupni antioksidacijski kapacitet mjeren metodom FRAP i ABTS – biološki biljeg koji procjenjuje kumulativnu antioksidacijsku moć tkiva u neutralizaciji slobodnih radikala, odražavajući sinergijsko djelovanje svih prisutnih antioksidansa (enzimskih i neenzimskih) i stvarnu redoks ravnotežu organizma.
- sinigrin – nema učinka na ukupni antioksidacijski kapaciteti; subkronična primjena nije dovela do statistički značajnih razlika u ukupnom antioksidacijskom kapacitetu miokarda mjerenom metodom ABTS i FRAP

- ekstrakt RT – ima učinak; primjena je rezultirala statistički značajno povišenim antioksidacijskim kapacitetom (FRAP i ABTS) u miokardu u odnosu na kontrolu,
- ekstrakt HT – ima učinak; primjena je također rezultirala statistički značajno povišenim antioksidacijskim kapacitetom (FRAP i ABTS) u miokardu u odnosu na kontrolu, iako je porast bio manjeg intenziteta nego kod RT ekstrakta

## 6. ZAKLJUČAK

Temeljem dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Visoka temperatura uzgoja mijenja biološki učinak klijanaca brokule na miokard.

Visoka temperatura (HT) uzgoja značajno mijenja fitokemijski profil klijanaca brokule - smanjuje sadržaj ukupnih glukozinolata i fenolnih kiselina, a povećava ukupne fenole, no takva preraspodjela sastava ne znači nužno i poboljšanje biološke aktivnosti. Klijanci uzgojeni pri  $t = 23 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $\text{RT}_{\text{ekst.}}$ ) pokazali su konzistentno povoljniji učinak na miokard, uključujući veći antioksidacijski kapacitet, povišenu koncentraciju NO te izostanak bioloških biljega oštećenja miokarda.  $\text{HT}_{\text{ekst.}}$ , unatoč povećanom udjelu ukupnih fenola, rezultirao je povišenim hs-cTnI, koji upućuje na moguće nepovoljno djelovanje na miokard. Razlog tome može biti smanjeni sadržaj glukozinolata i promijenjeni sastav polifenola u HT ekstraktu. Rezultati ukazuju da visoka temperatura uzgoja klijanaca brokule predstavlja relevantan čimbenik na sigurnost i kvalitetu hrane. U širem kontekstu, ovi nalazi imaju važne implikacije za prehranu i javno zdravlje: klimatske promjene, kroz utjecaj na uvjete uzgoj biljaka, mogu mijenjati nutritivnu i funkcionalnu vrijednost hrane biljnog podrijetla.

2. Ekstrakti klijanaca brokule posjeduju antitrombocitni učinak, neovisno o temperaturi okoline uzgoja.

Primjena ekstrakata klijanaca brokule, uzgajanih pri jednako visokoj i regularnoj temperaturi okoline, rezultirala je značajnim smanjenjem prosječnog volumena trombocita (MPV) bez istovremenih promjena u ostalim hematološkim parametrima. Izostanak promjena u broju eritrocita, leukocita, hemoglobinu i drugim parametrima ukazuju da ekstrakti klijanaca brokule ne djeluju modulatorno na hematopoetski sustav i stanice krvi.

3. Vodena otopina sinigrina ostvaruje o spolu ovisan učinak u tkivu miokarda

Biološki učinci sinigrina na miokard manifestiraju se pretežno u ženki miševa. Statistički značajne razlike u koncentracijama irizina, ANP-a, MMP-2, MMP-9, ukupnog glutaciona i aktivnosti katalaze u miokardu zabilježene su gotovo isključivo u ženki tretiranih sinigrinom, dok u mužjaka istovjetni učinci nisu detektirani. Ovaj obrazac ovisan o spolu najvjerojatnije

je posljedica modulirajućeg djelovanja ženskih spolnih hormona (estrogena) na signalne puteve kojima glukozinolati ostvaruju svoje učinke, poput Nrf2/ARE puta i PGC-1 $\alpha$ /FNDC5/irizin osi. Spolni dimorfizam dodatno je potvrđen i nalazom viših bazalnih razina ANP-a u ženki kontrolne skupine u odnosu na mužjake kontrolne skupine. U nekim slučajevima, opaženi učinci mogu odražavati adaptivne ili protektivne mehanizme, dok u drugima mogu upućivati na potencijalnu subkliničku toksičnost, osobito u zdravom miokardu bez prethodnog patološkog podražaja. Ovakvi rezultati sugeriraju važnu ulogu spolnih hormona u modulaciji kardiovaskularnih i metaboličkih učinaka fitokemikalija. Ovo je jedno od prvih istraživanja koje dokumentira o spolu ovisan učinak sinigrina na miokard.

#### 4. Fitokemijska modulacija miokarda ženki tretiranih sinigrinom preko osi irizin–ANP–MMP

U miokardu ženki tretiranih sinigrinom zabilježen je jedinstven obrazac promjena koji upućuje na moguću modulaciju osi irizin–ANP–MMP -istodobno povišenje koncentracije irizina i MMP-2/MMP-9 uz sniženje ANP-a, pri čemu ekstrakti klijanaca brokule ne pokazuju usporedan učinak. Takav nalaz sugerira složen, spolno uvjetovan odgovor na sinigrin, djelomično u skladu s literaturom koja irizin opisuje kao kardioprotektivni miokin uključen u regulaciju hipertrofije, ANP kao biljeg srčanog stresa, a MMP-ove kao ključne medijatore remodeliranja izvanstaničnog matriksa. Jedno od mogućih objašnjenja jest da sinigrin, putem donacije H<sub>2</sub>S i aktivacije PGC-1 $\alpha$ /FNDC5 signalnog puta, potiče porast irizina, koji, zbog inhibitornog djelovanja na hipertrofiju i remodeliranje, može smanjiti potrebu za pojačanom sekrecijom ANP-a. Istodobno, irizin, preko ERK signalnog puta, može potaknuti ekspresiju MMP-ova te time modulirati dinamiku matriksa; pritom povišene razine MMP-ova ne moraju nužno odražavati štetan, već potencijalno adaptivni odgovor u uvjetima očuvanog antioksidacijskog statusa. Ipak, s obzirom na to da je istraživanje provedeno na zdravim životinjama, bez modela srčanog opterećenja ili oštećenja i bez detaljne analize signalnih putova, navedeno tumačenje ostaje na razini hipoteze koja zahtijeva potvrdu u budućim, ciljano dizajniranim istraživanjima.

#### 5. Ekstrakti klijanaca brokule ostvaruju svoj antioksidacijski učinak na miokard sinergističkim djelovanjem glukozinolata i polifenola.

Ekstrakti klijanaca brokule i čisti sinigrin djeluju različitim, ali komplementarnim antioksidacijskim mehanizmima. Polifenoli iz ekstrakata imaju izravno antioksidacijsko djelovanje (neutralizacija slobodnih radikala i kelacija metala), što se očituje povećanim ukupnim antioksidacijskim kapacitetom i NO u miokardu. Nasuprot tome, sinigrin djeluje neizravno, aktivacijom signalnog puta Nrf2/ARE i poticanjem antioksidacijskih enzima (katalaza, GSH), bez porasta ukupnog kapaciteta mjerenog standardnim metodama. Ova razlika sugerira da kombinacija glukozinolata i polifenola u ekstraktima pruža širu i učinkovitiju zaštitu miokarda nego pojedinačni spoj.

6. Miokard ženki ima biološki jači odgovor na prehrambeni tretman funkcionalnom hranom s antioksidacijskim djelovanjem.

Zabilježene razlike između mužjaka i ženki u parametrima poput tGSH i aktivnosti katalaze potvrđuju postojanje o spolu ovisnih specifičnih odgovora miokarda na djelovanje glukozinolata i polifenola, pri čemu miokard ženki ukazuje na izraženiju aktivaciju antioksidacijskih mehanizama, što je u skladu s poznatom ulogom spolnih hormona u kardiovaskularnoj zaštiti.

7. Promijenjeni klimatski uvjeti (povišena temperatura), u interakciji sa spolnim hormonima, značajno utječu na zdravstveni učinak biljne prehrane

Biološki učinci fitokemikalija iz brokule, poput glukozinolata i polifenola, uvelike ovise o uvjetima njihova nastanka, osobito o okolišnoj temperaturi, ali i o složenim interakcijama unutar organizma, uključujući spolno-specifične odgovore. Povišena temperatura uzgoja značajno mijenja kemijski sastav klijanaca brokule, smanjujući udio zaštitnih spojeva poput glukozinolata i mijenjajući profil polifenola što može rezultirati smanjenjem zaštitnog fiziološkog učinka ili čak štetnim djelovanjem, što je pokazano na primjeru miokarda u ovom radu. Mehanizmi djelovanja različitih omjera glukozinolata i polifenola ukazuju na njihove međusobne sinergističke interakcije, i interakcije ovisne o modulaciji spolnih hormona. Stoga je razumijevanje interakcije između okolišnih čimbenika, kemijskog sastava hrane i biološkog odgovora organizma – uključujući spolne razlike – ključno za pravilnu procjenu učinaka fitokemikalija u prehrani i njihovog potencijala u prevenciji ili modulaciji bolesti.

## 7. LITERATURA

1. Šola I, Gmižić D, Pinterić M, Tot A, Ludwig-Müller J. Adjustments of the Phytochemical Profile of Broccoli to Low and High Growing Temperatures: Implications for the Bioactivity of Its Extracts. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(7):3677.
2. Gmižić D, Šola I. Developmental and Temperature-Driven Variations in Metabolic Profile and Antioxidant Capacity of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *cymosa*). *Plants*. 2025;14(12):1825.
3. Hermanson L, Smith D, Seabrook M, Bilbao R, Doblas-Reyes F, Tourigny E, et al. WMO Global Annual to Decadal Climate Update: A Prediction for 2021–25. *Bulletin of the American Meteorological Society*. 2022;103(4):E1117-E29.
4. Gmižić D, Pinterić M, Lazarus M, Šola I. High Growing Temperature Changes Nutritional Value of Broccoli (*Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* (L.) Alef. var. *cymosa* Duch.) Seedlings. *Foods*. 2023;12(3):582.
5. Le TN, Chiu C-H, Hsieh P-C. Bioactive Compounds and Bioactivities of *Brassica oleracea* L. var. *Italica* Sprouts and Microgreens: An Updated Overview from a Nutraceutical Perspective. *Plants*. 2020;9(8):946.
6. Ilahy R, Tlili I, Pék Z, Montefusco A, Siddiqui MW, Homa F, et al. Pre- and Post-harvest Factors Affecting Glucosinolate Content in Broccoli. *Frontiers in Nutrition*. 2020;7.
7. Montaner C, Mallor C, Laguna S, Zufiaurre R. Bioactive compounds, antioxidant activity, and mineral content of bróquil: A traditional crop of *Brassica oleracea* var. *italica*. *Frontiers in Nutrition*. 2023;9.
8. Iqbal I, Wilairatana P, Saqib F, Nasir B, Wahid M, Latif MF, et al. Plant Polyphenols and Their Potential Benefits on Cardiovascular Health: A Review. *Molecules*. 2023;28(17):6403.
9. Santhakumar AB, Battino M, Alvarez-Suarez JM. Dietary polyphenols: Structures, bioavailability and protective effects against atherosclerosis. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;113:49-65.
10. Akhlaghi M, Bandy B. Dietary Broccoli Sprouts Protect Against Myocardial Oxidative Damage and Cell Death During Ischemia-Reperfusion. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2010;65(3):193-9.
11. Cai Y, Yu SS, He Y, Bi XY, Gao S, Yan TD, et al. EGCG inhibits pressure overload-induced cardiac hypertrophy via the PSMB5/Nmnat2/SIRT6-dependent signalling pathways. *Acta Physiologica*. 2021;231(4).

12. Vaduganathan M, Mensah GA, Turco JV, Fuster V, Roth GA. The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk. *Journal of the American College of Cardiology*. 2022;80(25):2361-71.
13. Tiwari S, Shankar O, Singh R, Yadav AK, Maurya AK, Choudhary U. Evaluation of the Effects of Oxidative Stress and Biomarkers of Inflammation in Cardiomyopathy Sufferers. 2024.
14. Lowry OH, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R. J. Randall. . Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 1951. ;193(no. 1):265-75.
15. Griess P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen” □. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 1879;12(1):426-8.
16. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 1979;95(2):351-8.
17. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*. 1969;27(3):502-22.
18. Aebi H. [13] Catalase in vitro. Elsevier; 1984. p. 121-6.
19. Katalinic V, Modun D, Music I, Boban M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2005;140(1):47-52.
20. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. 1996;239(1):70-6.
21. Pacheco-Sangerman F, Gómez-Merino FC, Peralta-Sánchez MG, Alcántar-González G, Trejo Téllez LI. Glucosinolates: Structure, classification, biosynthesis and functions in higher plants. *Agro Productividad*. 2023.
22. Abdel-Massih RM, Debs E, Othman L, Attieh J, Cabrerizo FM. Glucosinolates, a natural chemical arsenal: More to tell than the myrosinase story. *Frontiers in Microbiology*. 2023;14.
23. Prieto MA, López CJ, Simal-Gandara J. Glucosinolates: Molecular structure, breakdown, genetic, bioavailability, properties and healthy and adverse effects. Elsevier; 2019. p. 305-50.

24. Blažević I, Montaut S, Burčul F, Olsen CE, Burow M, Rollin P, et al. Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants. *Phytochemistry*. 2020;169:112100.
25. Kamal RM, Abdull Razis AF, Mohd Sukri NS, Perimal EK, Ahmad H, Patrick R, et al. Beneficial Health Effects of Glucosinolates-Derived Isothiocyanates on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. *Molecules*. 2022;27(3):624.
26. Nguyen VPT, Stewart J, Lopez M, Ioannou I, Allais F. Glucosinolates: Natural Occurrence, Biosynthesis, Accessibility, Isolation, Structures, and Biological Activities. *Molecules*. 2020;25(19):4537.
27. Connolly EL, Sim M, Travica N, Marx W, Beasy G, Lynch GS, et al. Glucosinolates From Cruciferous Vegetables and Their Potential Role in Chronic Disease: Investigating the Preclinical and Clinical Evidence. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12.
28. Oerlemans K, Barrett DM, Suades CB, Verkerk R, Dekker M. Thermal degradation of glucosinolates in red cabbage. *Food Chemistry*. 2006;95(1):19-29.
29. Hanschen FS, Lamy E, Schreiner M, Rohn S. Reactivity and Stability of Glucosinolates and Their Breakdown Products in Foods. *Angewandte Chemie International Edition*. 2014;53(43):11430-50.
30. Ratzka A, Vogel H, Kliebenstein DJ, Mitchell-Olds T, Kroymann J. Disarming the mustard oil bomb. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(17):11223-8.
31. Angelino D, Jeffery E. Glucosinolate hydrolysis and bioavailability of resulting isothiocyanates: Focus on glucoraphanin. *Journal of Functional Foods*. 2014;7:67-76.
32. Barba FJ, Nikmaram N, Roohinejad S, Khelifa A, Zhu Z, Koubaa M. Bioavailability of Glucosinolates and Their Breakdown Products: Impact of Processing. *Frontiers in Nutrition*. 2016;3.
33. Elfoul L, Rabot S, Khelifa N, Quinsac A, Duguay A, Rimbault A. Formation of allyl isothiocyanate from sinigrin in the digestive tract of rats monoassociated with a human colonic strain of *Bacteroides thetaiotaomicron*. *FEMS Microbiology Letters*. 2001;197(1):99-103.
34. Traka M, Gasper AV, Melchini A, Bacon JR, Needs PW, Frost V, et al. Broccoli Consumption Interacts with GSTM1 to Perturb Oncogenic Signalling Pathways in the Prostate. *PLoS ONE*. 2008;3(7):e2568.
35. McMahon M, Lamont DJ, Beattie KA, Hayes JD. Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(44):18838-43.

36. Lee H-W, Lee CG, Rhee D-K, Um SH, Pyo S. Sinigrin inhibits production of inflammatory mediators by suppressing NF- $\kappa$ B/MAPK pathways or NLRP3 inflammasome activation in macrophages. *International Immunopharmacology*. 2017;45:163-73.
37. Dias C, Aires A, Saavedra M. Antimicrobial Activity of Isothiocyanates from Cruciferous Plants against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(11):19552-61.
38. Stromsnes K, Lagzdina R, Olaso-Gonzalez G, Gimeno-Mallench L, Gambini J. Pharmacological Properties of Polyphenols: Bioavailability, Mechanisms of Action, and Biological Effects in In Vitro Studies, Animal Models, and Humans. *Biomedicines*. 2021;9(8):1074.
39. Scalbert A, Williamson G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *The Journal of Nutrition*. 2000;130(8):2073S-85S.
40. Ahmad Z, Rauf A, Orhan IE, Mubarak MS, Akram Z, Islam MR, et al. Antioxidant Potential of Polyphenolic Compounds, Sources, Extraction, Purification and Characterization Techniques: A Focused Review. *Food Science & Nutrition*. 2025;13(12).
41. Su J, Xu H-T, Yu J-J, Gao J-L, Lei J, Yin Q-S, et al. Luteolin Ameliorates Hypertensive Vascular Remodeling through Inhibiting the Proliferation and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015;2015:1-14.
42. Gál R, Halmosi R, Gallyas F, Tschida M, Mutirangura P, Tóth K, et al. Resveratrol and beyond: The Effect of Natural Polyphenols on the Cardiovascular System: A Narrative Review. *Biomedicines*. 2023;11(11):2888.
43. Valls RM, Pedret A, Calderón-Pérez L, Llauradó E, Pla-Pagà L, Companys J, et al. Effects of hesperidin in orange juice on blood and pulse pressures in mildly hypertensive individuals: a randomized controlled trial (Citrus study). *European Journal of Nutrition*. 2021;60(3):1277-88.
44. Xue J-C, Yuan S, Meng H, Hou X-T, Li J, Zhang H-M, et al. The role and mechanism of flavonoid herbal natural products in ulcerative colitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2023;158:114086.
45. Tao Z, Zhang R, Zuo W, Ji Z, Fan Z, Chen X, et al. Association between dietary intake of anthocyanidins and heart failure among American adults: NHANES (2007–2010 and 2017–2018). *Frontiers in Nutrition*. 2023;10.

46. Gómez-Zorita S, González-Arceo M, Fernández-Quintela A, Eseberri I, Trepiana J, Portillo MP. Scientific Evidence Supporting the Beneficial Effects of Isoflavones on Human Health. *Nutrients*. 2020;12(12):3853.
47. Rashmi HB, Negi PS. Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. *Food Research International*. 2020;136:109298.
48. Kumar K, Debnath P, Singh S, Kumar N. An Overview of Plant Phenolics and Their Involvement in Abiotic Stress Tolerance. *Stresses*. 2023;3(3):570-85.
49. Tohge T, Watanabe M, Hoefgen R, Fernie AR. Shikimate and Phenylalanine Biosynthesis in the Green Lineage. *Frontiers in Plant Science*. 2013;4.
50. Sharma A, Shahzad B, Rehman A, Bhardwaj R, Landi M, Zheng B. Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules*. 2019;24(13):2452.
51. Ninkuu V, Aluko OO, Yan J, Zeng H, Liu G, Zhao J, et al. Phenylpropanoids metabolism: recent insight into stress tolerance and plant development cues. *Frontiers in Plant Science*. 2025;16.
52. Ferrer JL, Austin MB, Stewart C, Noel JP. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2008;46(3):356-70.
53. Wagay NA, Lone R, Rafiq S, Bashir SU. Phenolics: A Game Changer in the Life Cycle of Plants. Springer Singapore; 2020. p. 241-75.
54. Tak Y, Kumar M. Phenolics: A Key Defence Secondary Metabolite to Counter Biotic Stress. Springer Singapore; 2020. p. 309-29.
55. Šamec D, Karalija E, Šola I, Vujčić Bok V, Salopek-Sondi B. The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Response: The Influence of Molecular Structure. *Plants*. 2021;10(1):118.
56. Dehghanian Z, Habibi K, Dehghanian M, Aliyar S, Asgari Lajayer B, Astatkie T, et al. Reinforcing the bulwark: unravelling the efficient applications of plant phenolics and tannins against environmental stresses. *Heliyon*. 2022;8(3):e09094.
57. Debelo H, Li M, Ferruzzi MG. Processing influences on food polyphenol profiles and biological activity. *Current Opinion in Food Science*. 2020;32:90-102.
58. Zhang Y, Liu H. Editorial: Chemical and biological changes of polyphenols caused by food thermal processing. *Frontiers in Nutrition*. 2022;9.
59. Ebrahimi P, Lante A. Polyphenols: A Comprehensive Review of their Nutritional Properties. *The Open Biotechnology Journal*. 2021;15(1):164-72.

60. Abbasi A, Hashemi M, Samadi Kafil H, Abbasi Astamal M, Lahouty M, Ghorbani Tajani A, et al. **A Critical Review on the Bioavailability Promotion of the Food Bioactive Compounds: Nano Lipid Carriers Perspective**. *Pharmaceutical Sciences*. 2024.
61. Conte A, Martini S, Tagliazucchi D. Influence of Processing and Digestion on the Stability, Bioaccessibility and Bioactivity of Food Polyphenols. *Foods*. 2023;12(4):851.
62. Liu D, Dhital S, Wu P, Chen X-D, Gidley MJ. In Vitro Digestion of Apple Tissue Using a Dynamic Stomach Model: Grinding and Crushing Effects on Polyphenol Bioaccessibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020;68(2):574-83.
63. Silberberg M, Morand C, Mathevon T, Besson C, Manach C, Scalbert A, et al. The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. *European Journal of Nutrition*. 2006;45(2):88-96.
64. Gessner DK, Ringseis R, Eder K. Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2017;101(4):605-28.
65. Bokkenheuser VD, Shackleton CH, Winter J. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans. *Biochemical Journal*. 1987;248(3):953-6.
66. Di Lorenzo C, Colombo F, Biella S, Stockley C, Restani P. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients*. 2021;13(1):273.
67. Yang C-M, Chen Y-W, Chi P-L, Lin C-C, Hsiao L-D. Resveratrol inhibits BK-induced COX-2 transcription by suppressing acetylation of AP-1 and NF- $\kappa$ B in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Biochemical Pharmacology*. 2017;132:77-91.
68. Gal R, Deres L, Horvath O, Eros K, Sandor B, Urban P, et al. Resveratrol Improves Heart Function by Moderating Inflammatory Processes in Patients with Systolic Heart Failure. *Antioxidants*. 2020;9(11):1108.
69. Frąk W, Wojtasińska A, Lisińska W, Młynarska E, Franczyk B, Rysz J. Pathophysiology of Cardiovascular Diseases: New Insights into Molecular Mechanisms of Atherosclerosis, Arterial Hypertension, and Coronary Artery Disease. *Biomedicines*. 2022;10(8):1938.
70. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *Journal of Clinical Investigation*. 1995;96(1):60-8.

71. Mussbacher M, Schossleitner K, Kral-Pointner JB, Salzmann M, Schrammel A, Schmid JA. More than Just a Monolayer: the Multifaceted Role of Endothelial Cells in the Pathophysiology of Atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports*. 2022;24(6):483-92.
72. Jordan J, Kurschat C, Reuter H. Arterial Hypertension. *Deutsches Ärzteblatt international*. 2018.
73. Crowley SD. The Cooperative Roles of Inflammation and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Hypertension. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014;20(1):102-20.
74. Rudrapal M, Khairnar SJ, Khan J, Dukhyil AB, Ansari MA, Alomary MN, et al. Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases: Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s) of Action. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13.
75. Ambrose JA, Singh M. Pathophysiology of coronary artery disease leading to acute coronary syndromes. *F1000Prime Reports*. 2015;7.
76. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473(7347):317-25.
77. Hedayati N, Yaghoobi A, Salami M, Gholinezhad Y, Aghadavood F, Eshraghi R, et al. Impact of polyphenols on heart failure and cardiac hypertrophy: clinical effects and molecular mechanisms. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2023;10.
78. Milinković I, Polovina M, Simeunović DS, Ašanin M, Seferović PM. Oxidative stress and inflammation in heart failure: The best is yet to come. *European Journal of Preventive Cardiology*. 2020;27(5):490-3.
79. Dinkova-Kostova AT, Kostov RV. Glucosinolates and isothiocyanates in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*. 2012;18(6):337-47.
80. Citi V, Corvino A, Fiorino F, Frecentese F, Magli E, Perissutti E, et al. Structure-activity relationships study of isothiocyanates for H<sub>2</sub>S releasing properties: 3-Pyridyl-isothiocyanate as a new promising cardioprotective agent. *Journal of Advanced Research*. 2021;27:41-53.
81. Corssac GB, Campos-Carraro C, Hickmann A, Da Rosa Araujo AS, Fernandes RO, Belló-Klein A. Sulforaphane effects on oxidative stress parameters in culture of adult cardiomyocytes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;104:165-71.
82. Kim J-Y, Park H-J, Um SH, Sohn E-H, Kim B-O, Moon E-Y, et al. Sulforaphane suppresses vascular adhesion molecule-1 expression in TNF- $\alpha$ -stimulated mouse vascular smooth muscle cells: Involvement of the MAPK, NF- $\kappa$ B and AP-1 signaling pathways. *Vascular Pharmacology*. 2012;56(3-4):131-41.

83. Rose P, Won YK, Ong CN, Whiteman M.  $\beta$ -Phenylethyl and 8-methylsulphinyloctyl isothiocyanates, constituents of watercress, suppress LPS induced production of nitric oxide and prostaglandin E2 in RAW 264.7 macrophages. *Nitric Oxide*. 2005;12(4):237-43.
84. Sailaja BS, Aita R, Maledatu S, Ribnicky D, Verzi MP, Raskin I. Moringa isothiocyanate-1 regulates Nrf2 and NF- $\kappa$ B pathway in response to LPS-driven sepsis and inflammation. *PLOS ONE*. 2021;16(4):e0248691.
85. Wagner AE, Sturm C, Piegholdt S, Wolf IMA, Esatbeyoglu T, De Nicola GR, et al. Myrosinase-treated glucoerucin is a potent inducer of the Nrf2 target gene heme oxygenase 1 — studies in cultured HT-29 cells and mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2015;26(6):661-6.
86. Rajakumar T, Pugalendhi P, Jayaganesh R, Ananthakrishnan D, Gunasekaran K. Effect of allyl isothiocyanate on NF- $\kappa$ B signaling in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis. *Breast Cancer*. 2018;25(1):50-9.
87. Rajakumar T, Pugalendhi P, Thilagavathi S, Ananthakrishnan D, Gunasekaran K. Allyl isothiocyanate, a potent chemopreventive agent targets AhR/Nrf2 signaling pathway in chemically induced mammary carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2018;437(1-2):1-12.
88. Hajra S, Patra AR, Basu A, Bhattacharya S. Prevention of doxorubicin (DOX)-induced genotoxicity and cardiotoxicity: Effect of plant derived small molecule indole-3-carbinol (I3C) on oxidative stress and inflammation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2018;101:228-43.
89. Melrose J. The Glucosinolates: A Sulphur Glucoside Family of Mustard Anti-Tumour and Antimicrobial Phytochemicals of Potential Therapeutic Application. *Biomedicines*. 2019;7(3):62.
90. Steinbrecher A, Linseisen J. Dietary Intake of Individual Glucosinolates in Participants of the EPIC-Heidelberg Cohort Study. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2009;54(2):87-96.
91. Yagishita Y, Fahey JW, Dinkova-Kostova AT, Kensler TW. Broccoli or Sulforaphane: Is It the Source or Dose That Matters? *Molecules*. 2019;24(19):3593.
92. Gupta P, Wright SE, Kim S-H, Srivastava SK. Phenethyl isothiocyanate: A comprehensive review of anti-cancer mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2014;1846(2):405-24.

93. Borgonovo G, De Petrocellis L, Schiano Moriello A, Bertoli S, Leone A, Battezzati A, et al. Moringin, A Stable Isothiocyanate from *Moringa oleifera*, Activates the Somatosensory and Pain Receptor TRPA1 Channel In Vitro. *Molecules*. 2020;25(4):976.
94. Li Y, Liu Y, Zhang Z, Cao Y, Li J, Luo L. Allyl Isothiocyanate (AITC) Triggered Toxicity and FsYvc1 (a STRPC Family Member) Responded Sense in *Fusarium solani*. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11.
95. Katz E, Nisani S, Chamovitz DA. Indole-3-carbinol: a plant hormone combatting cancer. *F1000Research*. 2018;7:689.
96. Hung C-N, Huang H-P, Wang C-J, Liu K-L, Lii C-K. Sulforaphane Inhibits TNF- $\alpha$ -Induced Adhesion Molecule Expression Through the Rho A/ROCK/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. *Journal of Medicinal Food*. 2014;17(10):1095-102.
97. Liu Y-C, Hsieh C-W, Weng Y-C, Chuang S-H, Hsieh C-Y, Wung B-S. Sulforaphane inhibition of monocyte adhesion via the suppression of ICAM-1 and NF- $\kappa$ B is dependent upon glutathione depletion in endothelial cells. *Vascular Pharmacology*. 2008;48(1):54-61.
98. Shehatou GS, Suddek GM. Sulforaphane attenuates the development of atherosclerosis and improves endothelial dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Experimental Biology and Medicine*. 2016;241(4):426-36.
99. Yoo S-H, Lim Y, Kim S-J, Yoo K-D, Yoo H-S, Hong J-T, et al. Sulforaphane inhibits PDGF-induced proliferation of rat aortic vascular smooth muscle cell by up-regulation of p53 leading to G1/S cell cycle arrest. *Vascular Pharmacology*. 2013;59(1-2):44-51.
100. Gwon M-H, Im Y-S, Seo AR, Kim KY, Moon H-R, Yun J-M. Phenethyl Isothiocyanate Protects against High Fat/Cholesterol Diet-Induced Obesity and Atherosclerosis in C57BL/6 Mice. *Nutrients*. 2020;12(12):3657.
101. Im YS, Gwon MH, Yun JM. Protective effects of phenethyl isothiocyanate on foam cell formation by combined treatment of oxidized low-density lipoprotein and lipopolysaccharide in THP-1 macrophage. *Food Science & Nutrition*. 2021;9(6):3269-79.
102. Zhang Q, Liu J, Duan H, Li R, Peng W, Wu C. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: An important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress. *Journal of Advanced Research*. 2021;34:43-63.
103. Fuentes E, Alarcón M, Fuentes M, Carrasco G, Palomo I. A Novel Role of *Eruca sativa* Mill. (Rocket) Extract: Antiplatelet (NF- $\kappa$ B Inhibition) and Antithrombotic Activities. *Nutrients*. 2014;6(12):5839-52.

104. Li C-X, Gao J-G, Wan X-Y, Chen Y, Xu C-F, Feng Z-M, et al. Allyl isothiocyanate ameliorates lipid accumulation and inflammation in nonalcoholic fatty liver disease *via* the Sirt1/AMPK and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *World Journal of Gastroenterology*. 2019;25(34):5120-33.
105. Choi B-R, Kim H-J, Lee Y-J, Ku S-K. Anti-Diabetic Obesity Effects of Wasabia Japonica Matsum Leaf Extract on 45% Kcal High-Fat Diet-Fed Mice. *Nutrients*. 2020;12(9):2837.
106. Maiyoh GK, Kuh JE, Casaschi A, Theriault AG. Cruciferous Indole-3-Carbinol Inhibits Apolipoprotein B Secretion in HepG2 Cells. *The Journal of Nutrition*. 2007;137(10):2185-9.
107. Wang M-L, Lin S-H, Hou Y-Y, Chen Y-H. Suppression of Lipid Accumulation by Indole-3-Carbinol Is Associated with Increased Expression of the Aryl Hydrocarbon Receptor and CYP1B1 Proteins in Adipocytes and with Decreased Adipocyte-Stimulated Endothelial Tube Formation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(8):1256.
108. Fernandes RO, De Castro AL, Bonetto JHP, Ortiz VD, Müller DD, Campos-Carraro C, et al. Sulforaphane effects on postinfarction cardiac remodeling in rats: modulation of redox-sensitive prosurvival and proapoptotic proteins. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2016;34:106-17.
109. Silva-Palacios A, Ostolga-Chavarría M, Sánchez-Garibay C, Rojas-Morales P, Galván-Arzate S, Buelna-Chontal M, et al. Sulforaphane protects from myocardial ischemia-reperfusion damage through the balanced activation of Nrf2/AhR. *Free Radical Biology and Medicine*. 2019;143:331-40.
110. Peng N, Jin L, He A, Deng C, Wang X. Effect of sulphoraphane on newborn mouse cardiomyocytes undergoing ischaemia/reperfusion injury. *Pharmaceutical Biology*. 2019;57(1):753-9.
111. Ma T, Zhu D, Chen D, Zhang Q, Dong H, Wu W, et al. Sulforaphane, a Natural Isothiocyanate Compound, Improves Cardiac Function and Remodeling by Inhibiting Oxidative Stress and Inflammation in a Rabbit Model of Chronic Heart Failure. *Medical Science Monitor*. 2018;24:1473-83.
112. Kee HJ, Kim GR, Kim IK, Jeong MH. Sulforaphane suppresses cardiac hypertrophy by inhibiting GATA4/GATA6 expression and MAPK signaling pathways. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2015;59(2):221-30.

113. Bose C, Alves I, Singh P, Palade PT, Carvalho E, Børsheim E, et al. Sulforaphane prevents age-associated cardiac and muscular dysfunction through Nrf2 signaling. *Aging Cell*. 2020;19(11).
114. Cascajosa-Lira A, Prieto AI, Pichardo S, Jos A, Cameán AM. Protective effects of sulforaphane against toxic substances and contaminants: A systematic review. *Phytomedicine*. 2024;130:155731.
115. Yu H, Peng Y, Dong W, Shen B, Yang G, Nie Q, et al. Nrf2 attenuates methamphetamine-induced myocardial injury by regulating oxidative stress and apoptosis in mice. *Human & Experimental Toxicology*. 2023;42.
116. Rhoden A, Friedrich FW, Brandt T, Raabe J, Schweizer M, Meisterknecht J, et al. Sulforaphane exposure impairs contractility and mitochondrial function in three-dimensional engineered heart tissue. *Redox Biology*. 2021;41:101951.
117. Li YJ, Ji QQ, Wang Z, Shen LH, He B. Moringa oleifera seeds mitigate myocardial injury and prevent ventricular failure induced by myocardial infarction. *Am J Transl Res*. 2020;12(8):4511-21.
118. Alotaibi B, El-Masry TA, Tousson E, Alarfaj SJ, Saleh A. Therapeutic effect of rocket seeds (*Eruca sativa* L.) against hydroxyapatite nanoparticles injection induced cardiac toxicity in rats. *Pak J Pharm Sci*. 2020;33(4(Supplementary)):1839-45.
119. Oguri G, Nakajima T, Kikuchi H, Obi S, Nakamura F, Komuro I. Allyl isothiocyanate (AITC) activates nonselective cation currents in human cardiac fibroblasts: possible involvement of TRPA1. *Heliyon*. 2021;7(1):e05816.
120. Wang Z, Ye D, Ye J, Wang M, Liu J, Jiang H, et al. The TRPA1 Channel in the Cardiovascular System: Promising Features and Challenges. *Frontiers in Pharmacology*. 2019;10.
121. Deng W, Zong J, Bian Z, Zhou H, Yuan Y, Zhang R, et al. Indole-3-carbinol protects against pressure overload induced cardiac remodeling via activating AMPK- $\alpha$ . *Mol Nutr Food Res*. 2013;57(9):1680-7.
122. Akkiraju S, Kanala SR, Khatri S, Kutagulla VK, Mallela V, Peraman R. Cardioprotective potential of indol-3-carbinol against high salt induced myocardial stress and hypertrophy in Sprague dawley rats besides molecular docking on muscarinic receptor-2. *Natural Product Research*. 2022;36(10):2610-4.
123. Yang YS, Su YF, Yang HW, Lee YH, Chou JI, Ueng KC. Lipid-Lowering Effects of Curcumin in Patients with Metabolic Syndrome: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Phytotherapy Research*. 2014;28(12):1770-7.

124. Hurtado-Barroso S, Quifer-Rada P, Rinaldi De Alvarenga JF, Pérez-Fernández S, Tresserra-Rimbau A, Lamuela-Raventos RM. Changing to a Low-Polyphenol Diet Alters Vascular Biomarkers in Healthy Men after Only Two Weeks. *Nutrients*. 2018;10(11):1766.
125. Song J, Huang Y, Zheng W, Yan J, Cheng M, Zhao R, et al. Resveratrol reduces intracellular reactive oxygen species levels by inducing autophagy through the AMPK-mTOR pathway. *Frontiers of Medicine*. 2018;12(6):697-706.
126. Fernandez-Cruz E, Cerezo AB, Cantos-Villar E, Richard T, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC. Inhibition of VEGFR-2 Phosphorylation and Effects on Downstream Signaling Pathways in Cultivated Human Endothelial Cells by Stilbenes from *Vitis* Spp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019;67(14):3909-18.
127. Meng J, Chen Y, Wang J, Qiu J, Chang C, Bi F, et al. EGCG protects vascular endothelial cells from oxidative stress-induced damage by targeting the autophagy-dependent PI3K-AKT-mTOR pathway. *Annals of Translational Medicine*. 2020;8(5):200-.
128. Sharifi-Rad J, Quispe C, Zam W, Kumar M, Cardoso SM, Pereira OR, et al. Phenolic Bioactives as Antiplatelet Aggregation Factors: The Pivotal Ingredients in Maintaining Cardiovascular Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021;2021:1-19.
129. Gu XS, Wang ZB, Ye Z, Lei JP, Li L, Su DF, et al. Resveratrol, an activator of SIRT1, upregulates AMPK and improves cardiac function in heart failure. *Genetics and Molecular Research*. 2014;13(1):323-35.
130. Zhang L, Chen J, Yan L, He Q, Xie H, Chen M. Resveratrol Ameliorates Cardiac Remodeling in a Murine Model of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12.
131. Matsumura N, Takahara S, Maayah ZH, Parajuli N, Byrne NJ, Shoieb SM, et al. Resveratrol improves cardiac function and exercise performance in MI-induced heart failure through the inhibition of cardiotoxic HETE metabolites. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2018;125:162-73.
132. Rimbaud S, Ruiz M, Piquereau J, Mateo P, Fortin D, Veksler V, et al. Resveratrol Improves Survival, Hemodynamics and Energetics in a Rat Model of Hypertension Leading to Heart Failure. *PLoS ONE*. 2011;6(10):e26391.
133. Nooprom K, Santipracha Q. Growth and Yield of Broccoli Planted Year Round in Songkhla Province, Thailand. *Research Journal of Applied Sciences, Engineering and Technology*. 2014;7(19):4157-61.

134. Quizhpe J, Ayuso P, Rosell MDLÁ, Peñalver R, Nieto G. Brassica oleracea var italica and Their By-Products as Source of Bioactive Compounds and Food Applications in Bakery Products. *Foods*. 2024;13(21):3513.
135. Bhaswant M, Shanmugam DK, Miyazawa T, Abe C, Miyazawa T. Microgreens—A Comprehensive Review of Bioactive Molecules and Health Benefits. *Molecules*. 2023;28(2):867.
136. Syed RU, Moni SS, Break MKB, Khojali WMA, Jafar M, Alshammari MD, et al. Broccoli: A Multi-Faceted Vegetable for Health: An In-Depth Review of Its Nutritional Attributes, Antimicrobial Abilities, and Anti-inflammatory Properties. *Antibiotics*. 2023;12(7):1157.
137. Ragusa L, Picchi V, Tribulato A, Cavallaro C, Lo Scalzo R, Branca F. The effect of the germination temperature on the phytochemical content of broccoli and rocket sprouts. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2017;68(4):411-20.
138. Mahn A, Pérez CE, Zambrano V, Barrientos H. Maximization of Sulforaphane Content in Broccoli Sprouts by Blanching. *Foods*. 2022;11(13):1906.
139. Patras A, Stoleru V, Filimon RV, Padureanu S, Chelariu EL, Biliaderis CG. Influence of Sodium and Maturity Stage on the Antioxidant Properties of Cauliflower and Broccoli Sprouts. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2017;45(2):458-65.
140. Moreira-Rodríguez M, Nair V, Benavides J, Cisneros-Zevallos L, Jacobo-Velázquez D. UVA, UVB Light, and Methyl Jasmonate, Alone or Combined, Redirect the Biosynthesis of Glucosinolates, Phenolics, Carotenoids, and Chlorophylls in Broccoli Sprouts. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(11):2330.
141. Guo R, Wang X, Han X, Li W, Liu T, Chen B, et al. Comparative transcriptome analyses revealed different heat stress responses in high- and low-GS Brassica alboglabra sprouts. *BMC Genomics*. 2019;20(1).
142. Rodríguez VMS, P.; Cartea, E.; Sotelo, T.; Velasco, P. . Suitability of A European Nuclear Collection of Brassica oleracea L. Landraces to Grow at High Temperatures. . *J Agron Crop Sci*. 2013; 200:183–90.
143. Ishida M, Hara M, Fukino N, Kakizaki T, Morimitsu Y. Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breeding Science*. 2014;64(1):48-59.
144. Guo L, Yang R, Wang Z, Guo Q, Gu Z. Glucoraphanin, sulforaphane and myrosinase activity in germinating broccoli sprouts as affected by growth temperature and plant organs. *Journal of Functional Foods*. 2014;9:70-7.

145. Jan R, Khan M, Asaf S, Lubna, Asif S, Kim K-M. Bioactivity and Therapeutic Potential of Kaempferol and Quercetin: New Insights for Plant and Human Health. *Plants*. 2022;11(19):2623.
146. Šola I, Gmižić D. Structural Variations of Broccoli Polyphenolics and Their Antioxidant Capacity as a Function of Growing Temperature. *Plants*. 2025;14(8):1186.
147. Al-Qaraghli ANH, Ayed HS. Determination of the Efficacy of Broccoli Sprouts Seeds on Growth, Blood Parameters, and Immunological Indicators in Experimentally Immunosuppressed Male Rats. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2023;1158(11):112008.
148. Van Steenwijk HP, Winter E, Knaven E, Brouwers JF, Van Baardwijk M, Van Dalum JB, et al. The beneficial effect of sulforaphane on platelet responsiveness during caloric load: a single-intake, double-blind, placebo-controlled, crossover trial in healthy participants. *Frontiers in Nutrition*. 2023;10.
149. Balykina A, Naida L, Kirkgöz K, Nikolaev VO, Fock E, Belyakov M, et al. Antiplatelet Effects of Flavonoid Aglycones Are Mediated by Activation of Cyclic Nucleotide-Dependent Protein Kinases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(9):4864.
150. Paško P, Prochownik E, Krośniak M, Tyszka-Czochara M, Francik R, Marcinkowska M, et al. Animals in Iodine Deficiency or Sulfadimethoxine Models of Thyroid Damage Are Differently Affected by the Consumption of Brassica Sprouts. *Biological Trace Element Research*. 2020;193(1):204-13.
151. Pogorzelska A, Świtalska M, Wietrzyk J, Mazur M, Milczarek M, Medyńska K, et al. Antitumor and antimetastatic effects of dietary sulforaphane in a triple-negative breast cancer models. *Scientific Reports*. 2024;14(1).
152. Houshialsadat Z, Mirmiran P, Zare-Javid A, Bahadoran Z, Houghton C. Beneficial Effects of Sulforaphane-Yielding Broccoli Sprout on Cardiometabolic Health: A Systematic Review and Meta-analysis. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2022;17(4).
153. Mirmiran P, Bahadoran Z, Golzarand M, Zojaji H, Azizi F. A comparative study of broccoli sprouts powder and standard triple therapy on cardiovascular risk factors following *H.pylori* eradication: a randomized clinical trial in patients with type 2 diabetes. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. 2014;13(1):64.
154. Bahadoran Z, Mirmiran P, Hosseinpanah F, Rajab A, Asghari G, Azizi F. Broccoli sprouts powder could improve serum triglyceride and oxidized LDL/LDL-cholesterol ratio in

type 2 diabetic patients: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2012;96(3):348-54.

155. Wu L, Ashraf MHN, Facci M, Wang R, Paterson PG, Ferrie A, et al. Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004;101(18):7094-9.

156. Sotokawauchi A, Ishibashi Y, Matsui T, Yamagishi S-I. Aqueous Extract of Glucoraphanin-Rich Broccoli Sprouts Inhibits Formation of Advanced Glycation End Products and Attenuates Inflammatory Reactions in Endothelial Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018;2018(1):1-6.

157. Noble RMN, Jahandideh F, Armstrong EA, Bourque SL, Yager JY. Broccoli Sprouts Promote Sex-Dependent Cardiometabolic Health and Longevity in Long-Evans Rats. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2022;19(20):13468.

158. Xu Z, Wang S, Ji H, Zhang Z, Chen J, Tan Y, et al. Broccoli sprout extract prevents diabetic cardiomyopathy via Nrf2 activation in db/db T2DM mice. *Scientific Reports*. 2016;6(1):30252.

159. Wang J, Zhang J, Chen L, Cai J, Li Z, Zhang Z, et al. Combination of Broccoli Sprout Extract and Zinc Provides Better Protection against Intermittent Hypoxia-Induced Cardiomyopathy Than Monotherapy in Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019:1-12.

160. Pereyra KV, Andrade DC, Toledo C, Schwarz KG, Uribe-Ojeda A, Ríos-Gallardo AP, et al. Dietary supplementation of a sulforaphane-enriched broccoli extract protects the heart from acute cardiac stress. *Journal of Functional Foods*. 2020;75:104267.

161. Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 1999;64(4):555-9.

162. Wabaidur SM, Obbed MS, Alothman ZA, Alfaris NA, Badjah-Hadj-Ahmed AY, Siddiqui MR, et al. Total phenolic acids and flavonoid contents determination in Yemeni honey of various floral sources: Folin-Ciocalteu and spectrophotometric approach. *Food Science and Technology*. 2020;40(suppl 2):647-52.

163. Tanaka T, Mori Y, Morishita Y, Hara A, Ohno T, Kojima T, et al. Inhibitory effect of sinigrin and indole-3-carbinol on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in male ACI/N rats. *Carcinogenesis*. 1990;11(8):1403-6.

164. Truong T.T.P. KT. Glucosinolate Sinigrin Improves Insulin Resistance to Suppress Glutathione Consumption in Type 2 Diabetic Mice. *J Diab Metab* 2020;11:859.

165. Jang YJ, Pyo S. Anti-atherosclerotic effect of sinigrin in ApoE-deficient mice. *The FASEB Journal*. 2015;29(S1).
166. Waz S, Matouk AI. Cardioprotective effect of allyl isothiocyanate in a rat model of doxorubicin acute toxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2022;32(3):194-203.
167. Jacob S, Nair AB, Morsy MA. Dose Conversion Between Animals and Humans: A Practical Solution. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2022;56(3):600-7.
168. Pérez-Balibrea S, Moreno DA, García-Viguera C. Influence of light on health-promoting phytochemicals of broccoli sprouts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2008;88(5):904-10.
169. Henshaw Uchechi Okoroiwu COO. Mean platelet volume as diagnostic and therapeutic marker of risk and prognosis of heart disease. *Italian Journal of Medicine*. 2018;12(1):10-4.
170. Choi D-H, Kang S-H, Song H. Mean platelet volume: a potential biomarker of the risk and prognosis of heart disease. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2016;31(6):1009-17.
171. Mahmoud Y. USING BROCCOLI PLANT WASTES IN SHEEP RATIONS. *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds*. 2016;19(2):277-87.
172. Papierska K, Ignatowicz E, Jodynis-Liebert J, Kujawska M, Biegańska-Marecik R. Effects of Long-Term Dietary Administration of Kale ( *Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC) Leaves on the Antioxidant Status and Blood Biochemical Markers in Rats. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2022;72(3):239-47.
173. Lee MMY, Masri A. Differentiating Cardiac Troponin Levels During Cardiac Myosin Inhibition or Cardiac Myosin Activation Treatments: Drug Effect or the Canary in the Coal Mine? *Current Heart Failure Reports*. 2023;20(6):504-18.
174. Carrara M, Antenucci P, Liu S, Kohler A, Langer R, Jakob SM, et al. Autonomic and circulatory alterations persist despite adequate resuscitation in a 5-day sepsis swine experiment. *Scientific Reports*. 2022;12(1).
175. Hadi NR, Hadi SMH, Majeed S, Ghafil FA, Altoraihi K. Effect of Sulforaphane on cardiac injury induced by sepsis in a mouse model: Role of toll-like receptor 4. *Journal of Medicine and Life*. 2023;16(7):1120-6.
176. Sergazy S, Shulgau Z, Fedotovskikh G, Chulenbayeva L, Nurgozhina A, Nurgazyev M, et al. Cardioprotective effect of grape polyphenol extract against doxorubicin induced cardiotoxicity. *Scientific Reports*. 2020;10(1).

177. Singh P, Sharma R, McElhanon K, Allen CD, Megyesi JK, Beneš H, et al. Sulforaphane protects the heart from doxorubicin-induced toxicity. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015;86:90-101.
178. Li Q, Xia B, Wu J, Yuan X, Lu X, Huang C, et al. Indole-3-Carbinol (I3C) Protects the Heart From Ischemia/Reperfusion Injury by Inhibiting Oxidative Stress, Inflammation, and Cellular Apoptosis in Mice. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13.
179. Fu S, Ping P, Wang F, Luo L. Synthesis, secretion, function, metabolism and application of natriuretic peptides in heart failure. *Journal of Biological Engineering*. 2018;12(1).
180. Kuwahara K. The natriuretic peptide system in heart failure: Diagnostic and therapeutic implications. *Pharmacology & Therapeutics*. 2021;227:107863.
181. Jalal IA, Elkhoely A, Mohamed SK, Ahmed AAE. Linagliptin and secoisolariciresinol diglucoside attenuate hyperlipidemia and cardiac hypertrophy induced by a high-methionine diet in rats via suppression of hyperhomocysteinemia-induced endoplasmic reticulum stress. *Frontiers in Pharmacology*. 2023;14.
182. Clerico A, Giannoni A, Vittorini S, Passino C. Thirty years of the heart as an endocrine organ: physiological role and clinical utility of cardiac natriuretic hormones. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2011;301(1):H12-H20.
183. Kawano H, Nagayoshi Y, Soejima H, Tanaka Y, Hokamaki J, Miyamoto S, et al. B-type natriuretic peptide after hormone therapy in postmenopausal women with chest pain and normal coronary angiogram. *Menopause*. 2008;15(2):352-6.
184. Clerico A, Ry SD, Maffei S, Prontera C, Emdin M, Giannessi D. The Circulating Levels of Cardiac Natriuretic Hormones in Healthy Adults: Effects of Age and Sex. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2002;40(4).
185. Holditch SJ, Schreiber CA, Burnett JC, Ikeda Y. Arterial Remodeling in B-Type Natriuretic Peptide Knock-Out Females. *Scientific Reports*. 2016;6(1):25623.
186. Dong Z-X, Wan L, Wang R-J, Shi Y-Q, Liu G-Z, Zheng S-J, et al. (-)-Epicatechin Suppresses Angiotensin II-induced Cardiac Hypertrophy via the Activation of the SP1/SIRT1 Signaling Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;41(5):2004-15.
187. Jiang H, Zhang C, He W. The Effects of *Dracocephalum heterophyllum* Benth Flavonoid on Hypertrophic Cardiomyocytes Induced by Angiotensin II in Rats. *Medical Science Monitor*. 2018;24:6322-30.

188. Ferrara N, Balta V, Đikić D, Odeh D, Mojsović-Ćuić A, Feher Turković L, et al. The Effect of the Glucosinolate Sinigrin on Alterations in Molecular Biomarkers of the Myocardium in Swiss Mice. *Foods*. 2025;14(2):327.
189. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012;481(7382):463-8.
190. Fu J, Li F, Tang Y, Cai L, Zeng C, Yang Y, et al. The Emerging Role of Irisin in Cardiovascular Diseases. *Journal of the American Heart Association*. 2021;10(20).
191. Garcés MF, Peralta JJ, Ruiz-Linares CE, Lozano AR, Poveda NE, Torres-Sierra AL, et al. Irisin Levels During Pregnancy and Changes Associated With the Development of Preeclampsia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014;99(6):2113-9.
192. Ho M-Y, Wang C-Y. Role of Irisin in Myocardial Infarction, Heart Failure, and Cardiac Hypertrophy. *Cells*. 2021;10(8):2103.
193. Luo Y, Qiao X, Xu L, Huang G. Irisin: circulating levels in serum and its relation to gonadal axis. *Endocrine*. 2022;75(3):663-71.
194. Barbagallo F, Cannarella R, Garofalo V, Marino M, La Vignera S, Condorelli R, et al. The Role of Irisin throughout Women's Life Span. *Biomedicines*. 2023;11(12):3260.
195. Roca-Rivada A, Castelao C, Senin LL, Landrove MO, Baltar J, Crujeiras AB, et al. FND5/Irisin Is Not Only a Myokine but Also an Adipokine. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e60563.
196. Wahab F, Khan IU, Polo IR, Zubair H, Drummer C, Shahab M, et al. Irisin in the primate hypothalamus and its effect on GnRH in vitro. *Journal of Endocrinology*. 2019;241(3):175-87.
197. Parsanathan R, Jain SK. Hydrogen Sulfide Regulates Irisin and Glucose Metabolism in Myotubes and Muscle of HFD-Fed Diabetic Mice. *Antioxidants*. 2022;11(7):1369.
198. Li R-L, Wu S-S, Wu Y, Wang X-X, Chen H-Y, Xin J-J, et al. Irisin alleviates pressure overload-induced cardiac hypertrophy by inducing protective autophagy via mTOR-independent activation of the AMPK-ULK1 pathway. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2018;121:242-55.
199. Jasaszwili M, Pruszyńska-Oszmałek E, Wojciechowicz T, Strowski MZ, Nowak KW, Skrzypski M. Adropin Slightly Modulates Lipolysis, Lipogenesis and Expression of Adipokines but Not Glucose Uptake in Rodent Adipocytes. *Genes*. 2021;12(6):914.
200. Mushala BAS, Scott I. Adropin: a hepatokine modulator of vascular function and cardiac fuel metabolism. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2021;320(1):H238-H44.

201. Rooban S, Arul Senghor KA, Vinodhini VM, Kumar JS. Adropin: A crucial regulator of cardiovascular health and metabolic balance. *Metabolism Open*. 2024;23:100299.
202. Bozic J, Kumric M, Ticinovic Kurir T, Males I, Borovac JA, Martinovic D, et al. Role of Adropin in Cardiometabolic Disorders: From Pathophysiological Mechanisms to Therapeutic Target. *Biomedicines*. 2021;9(10):1407.
203. Meda C, Dolce A, Vegeto E, Maggi A, Della Torre S. ER $\alpha$ -Dependent Regulation of Adropin Predicts Sex Differences in Liver Homeostasis during High-Fat Diet. *Nutrients*. 2022;14(16):3262.
204. Ghoshal S, Stevens JR, Billon C, Girardet C, Sitaula S, Leon AS, et al. Adropin: An endocrine link between the biological clock and cholesterol homeostasis. *Molecular Metabolism*. 2018;8:51-64.
205. Li Y-X, Cheng K-C, Liu IM, Niu H-S. Myricetin Increases Circulating Adropin Level after Activation of Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) Receptor in Type-1 Diabetic Rats. *Pharmaceuticals*. 2022;15(2):173.
206. Ding L, Sun W, Balaz M, He A, Klug M, Wieland S, et al. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation acts as a sensor for intracellular fatty acids and regulates lipolysis. *Nature Metabolism*. 2021;3(12):1648-61.
207. Finck BN, Han X, Courtois M, Aimond F, Nerbonne JM, Kovacs A, et al. A critical role for PPAR $\alpha$ -mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: Modulation by dietary fat content. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(3):1226-31.
208. Zhang R, Chen S, Zhao F, Wang W, Liu D, Chen L, et al. Sulforaphane enhanced muscle growth by promoting lipid oxidation through modulating key signaling pathways. *Bioscience Reports*. 2024;44(7).
209. Okulicz M. Multidirectional Time-Dependent Effect of Sinigrin and Allyl Isothiocyanate on Metabolic Parameters in Rats. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2010;65(3):217-24.
210. Larocca M, Perna AM, Simonetti A, Gambacorta E, Iannuzzi A, Perucatti A, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of cauliflower leaf powder-enriched diet against LPS induced toxicity in rabbits. *Food & Function*. 2017;8(9):3288-96.
211. Navarro JA, De Gouveia LA, Rocha-Penha L, Cinegaglia N, Belo V, Castro MMD, et al. Reduced levels of potential circulating biomarkers of cardiovascular diseases in apparently healthy vegetarian men. *Clinica Chimica Acta*. 2016;461:110-3.

212. Latronico T, Larocca M, Milella S, Fasano A, Rossano R, Liuzzi GM. Neuroprotective potential of isothiocyanates in an in vitro model of neuroinflammation. *Inflammopharmacology*. 2021;29(2):561-71.
213. Lee C-S, Cho H-J, Jeong Y-J, Shin J-M, Park K-K, Park Y-Y, et al. Isothiocyanates inhibit the invasion and migration of C6 glioma cells by blocking FAK/JNK-mediated MMP-9 expression. *Oncology Reports*. 2015;34(6):2901-8.
214. Jeong Y-J, Cho H-J, Chung F-L, Wang X, Hoe H-S, Park K-K, et al. Isothiocyanates suppress the invasion and metastasis of tumors by targeting FAK/MMP-9 activity. *Oncotarget*. 2017;8(38):63949-62.
215. Yi-Shih Ma Y-TH, Jen-Jyh Lin, Ching-Lung Liao, Chin-Chung Lin, Jing-Gung Chung Phenethyl Isothiocyanate (PEITC) and Benzyl Isothiocyanate (BITC) Inhibit Human Melanoma A375.S2 Cell Migration and Invasion by Affecting MAPK Signaling Pathway In Vitro. *Anticancer Research*. 2017;37(11).
216. Suzuki T, Ohishi T, Tanabe H, Miyoshi N, Nakamura Y. Anti-Inflammatory Effects of Dietary Polyphenols through Inhibitory Activity against Metalloproteinases. *Molecules*. 2023;28(14):5426.
217. Latronico T, Petraglia T, Sileo C, Bilancia D, Rossano R, Liuzzi GM. Inhibition of MMP-2 and MMP-9 by Dietary Antioxidants in THP-1 Macrophages and Sera from Patients with Breast Cancer. *Molecules*. 2024;29(8):1718.
218. Xianchu L, Lan Z, Ming L, Yanzhi M. Protective effects of rutin on lipopolysaccharide-induced heart injury in mice. *J Toxicol Sci*. 2018;43(5):329-37.
219. Do Prado AF, Bannwart CM, Shinkai VMT, De Souza Lima IM, Meschiari CA. Phyto-derived Products as Matrix Metalloproteinases Inhibitors in Cardiovascular Diseases. *Current Hypertension Reviews*. 2021;17(1):47-58.
220. Laronha H, Caldeira J. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells*. 2020;9(5):1076.
221. Zhang N, Wei W-Y, Li L-L, Hu C, Tang Q-Z. Therapeutic Potential of Polyphenols in Cardiac Fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9.
222. Shirakabe A, Asai K, Hata N, Yokoyama S, Shinada T, Kobayashi N, et al. Clinical Significance of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 in Patients With Acute Heart Failure. *International Heart Journal*. 2010;51(6):404-10.
223. Pytliak M, Vaník V, Bojčik P. Heart Remodelation: Role of MMPs. *InTech*; 2017.
224. López B, González A, Querejeta R, Larman M, Díez J. Alterations in the Pattern of Collagen Deposition May Contribute to the Deterioration of Systolic Function in

Hypertensive Patients With Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(1):89-96.

225. Wu F, Song H, Zhang Y, Zhang Y, Mu Q, Jiang M, et al. Irisin Induces Angiogenesis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells In Vitro and in Zebrafish Embryos In Vivo via Activation of the ERK Signaling Pathway. *PLOS ONE*. 2015;10(8):e0134662.

226. Yun J, Kim J-E. Broccoli Sprout Extract Suppresses Particulate-Matter-Induced Matrix-Metalloproteinase (MMP)-1 and Cyclooxygenase (COX)-2 Expression in Human Keratinocytes by Direct Targeting of p38 MAP Kinase. *Nutrients*. 2024;16(23):4156.

227. Ristagno G, Fumagalli F, Bottazzi B, Mantovani A, Olivari D, Novelli D, et al. Pentraxin 3 in Cardiovascular Disease. *Frontiers in Immunology*. 2019;10.

228. Chodkowski A, Nabrdalik K, Kwiendacz H, Tomasik A, Bartman W, Gumprecht J. Pentraxin 3 and retinopathy among type 2 diabetic patients in relation to carotid atherosclerosis and systolic and diastolic cardiac function — a pilot study. *Clinical Diabetology*. 2018;7(4):196-202.

229. Latini R, Maggioni AP, Peri G, Gonzini L, Lucci D, Mocarelli P, et al. Prognostic Significance of the Long Pentraxin PTX3 in Acute Myocardial Infarction. *Circulation*. 2004;110(16):2349-54.

230. Ding K, Shi Z, Qian C, Yang X. Higher Plasma Pentraxin-3 Level Predicts Adverse Clinical Outcomes in Patients With Coronary Artery Disease: A Meta-Analysis of Cohort Studies. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2022;8.

231. Matsubara J, Sugiyama S, Nozaki T, Sugamura K, Konishi M, Ohba K, et al. Pentraxin 3 Is a New Inflammatory Marker Correlated With Left Ventricular Diastolic Dysfunction and Heart Failure With Normal Ejection Fraction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;57(7):861-9.

232. Slusher AL, Huang C-J, Acevedo EO. The Potential Role of Aerobic Exercise-Induced Pentraxin 3 on Obesity-Related Inflammation and Metabolic Dysregulation. *Mediators of Inflammation*. 2017;2017:1-9.

233. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews*. 2007;87(1):315-424.

234. Mourouzis K, Siasos G, Oikonomou E, Zaromitidou M, Tsigkou V, Antonopoulos A, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 levels, endothelial dysfunction and arterial stiffness in patients with stable coronary artery disease. *Lipids in Health and Disease*. 2021;20(1).

235. Heiss EH, Schachner D, Werner ER, Dirsch VM. Active NF-E2-related Factor (Nrf2) Contributes to Keep Endothelial NO Synthase (eNOS) in the Coupled State. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(46):31579-86.
236. Labarrere CA, Kassab GS. Glutathione: A Samsonian life-sustaining small molecule that protects against oxidative stress, ageing and damaging inflammation. *Frontiers in Nutrition*. 2022;9.
237. Dasari S, Ganjayi MS, Yellanurkonda P, Basha S, Meriga B. Role of glutathione S-transferases in detoxification of a polycyclic aromatic hydrocarbon, methylcholanthrene. *Chemico-Biological Interactions*. 2018;294:81-90.
238. Zanginyan HV, Hovsepyan LM, Kazaryan GS, Zakaryan GV. ANALYSIS OF THE EXPRESSION LEVEL OF T-CELL GENES AND OXIDATIVE PROCESSES IN STROKE. *Medical Immunology (Russia)*. 2019;21(2):251-6.
239. Lavryshyn YY, Varkholyak IS, Martyschuk TV, Guta ZA, Ivankiv LB. THE BIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF THE ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM OF ANIMALS BODY. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnology*. 2016;18(2(66)):100-12.
240. Souza LMV, Costa RDA, Santos JDMD, Santos JLD, Costa LS, Oliveira JUD, et al. Treinamento intervalado de alta intensidade e estresse oxidativo: uma breve apresentação. *Research, Society and Development*. 2020;9(8):e741986478.
241. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2003;57(3-4):145-55.
242. Tan M, Yin Y, Ma X, Zhang J, Pan W, Tan M, et al. Glutathione system enhancement for cardiac protection: pharmacological options against oxidative stress and ferroptosis. *Cell Death & Disease*. 2023;14(2).
243. Salyha N. Effect of glutamic acid and cysteine on oxidative stress markers in rats. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2020;92(6): 65. .
244. Emeka PM, Ibrahim, H.-I. M., Morsy, M. A., Alhaider, I. A., Hussian, S., & Ahmed, E. A. . Attenuation of Cardiomyopathy Induced in Sub-Chronic Exposure of Acrolein by Sulforaphane via Indirect PPAR $\gamma$  Expression Promoter. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*. 2021;55(4).
245. Bagatini MD C-RA, editors. *Glutathione System and Oxidative Stress in Health and Disease* [Internet]. London: IntechOpen; 2020.

246. Al-Mubarak AA, Esquivel-Gaytan A, Silljé HHW, Van Der Meer P, Bomer N. Glutathione deficiency and heart failure: a systematic review of human and animal evidence. *Advances in Redox Research*. 2025;15:100131.
247. Bertero E, Maack C. Ins and Outs of Glutathione in Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation Research*. 2023;133(10):877-9.
248. Bose C, Awasthi S, Sharma R, Beneš H, Hauer-Jensen M, Boerma M, et al. Sulforaphane potentiates anticancer effects of doxorubicin and attenuates its cardiotoxicity in a breast cancer model. *PLOS ONE*. 2018;13(3):e0193918.
249. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, et al. Nrf2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009;46(4):443-53.
250. P K, C S. ANTIOXIDANT EFFECT OF POLYHERBAL FORMULATION IN ISOPRENALINE HYDROCHLORIDE INDUCED MYOCARDIAL INFARCTION IN RATS. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2017;9(10):273.
251. Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition Journal*. 2015;15(1).
252. Skoryk OD, Horila MV. Oxidative stress and disruption of the antioxidant defense system as triggers of diseases. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2023;14(4):665-72.
253. Z R. Therapeutic potentials of catalase: Mechanisms, applications, and future perspectives. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2024;18(2):1-6.
254. Khan MA, Younus H. Superoxide Dismutase Glycation: A Contributor to Disease and Target for Prevention. *Catalysts*. 2025;15(3):247.
255. Miller-Cebert RL, Boateng J, Cebert E, Shackelford L, Verghese M. Chemopreventive Potential of Canola Leafy Greens and Other Cruciferous Vegetables on Azoxymethane (AOM)-Induced Colon Cancer in Fisher-344 Male Rats. *Food and Nutrition Sciences*. 2016;07(11):964-76.
256. Plevkova J, Brozmanova M, Harsanyiova J, Sterusky M, Honetschlager J, Buday T. Various Aspects of Sex and Gender Bias in Biomedical Research. *Physiological Research*. 2021:S367-S78.
257. Hazineci H, Türkyılmaz İB, Üstündağ ÜV, Emekli-Alturfan E, Tüzüner BA, İpekçi H, et al. White Cabbage Extract Reduces the Harmful Effects of Amiodarone on Heart Tissue in Rats. *Experimed*. 2020:1-6.

258. Ahmad N, Lesa KN, Ujiantari NSO, Sudarmanto A, Ikawati Z, Fakhrudin N. Phytochemical identification and *in silico* study of ethanolic extract of white cabbage as a phosphodiesterase 1B inhibitor. *Journal of Herbmed Pharmacology*. 2023;12(4):521-35.
259. Yang DK. Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) Protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress by Preventing Mitochondrial Dysfunction in H9c2 Cardiomyoblasts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018;2018(1):1-10.
260. Melnik A, Zaichko N, Kachula S, Strutynska O. Analysis of sex hormones influence on biochemical indicators of heart state in rats: connection with hydrogen sulfide levels in miocardium. *ScienceRise: Medical Science*. 2017;0(3 (11)):35-9.
261. Borrás C, Ferrando M, Inglés M, Gambini J, Lopez-Grueso R, Edo R, et al. Estrogen Replacement Therapy Induces Antioxidant and Longevity-Related Genes in Women after Medically Induced Menopause. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021;2021(1):1-9.
262. Kanno S-I, Tomizawa A, Yomogida S, Hara A. Glutathione peroxidase 3 is a protective factor against acetaminophen-induced hepatotoxicity in vivo and in vitro. *International Journal of Molecular Medicine*. 2017;40(3):748-54.
263. Novella S, Dantas AP, Segarra G, Medina P, Hermenegildo C. Vascular Aging in Women: is Estrogen the Fountain of Youth? *Frontiers in Physiology*. 2012;3.
264. Angeloni C, Teti G, Barbalace MC, Malaguti M, Falconi M, Hrelia S. 17β-Estradiol enhances sulforaphane cardioprotection against oxidative stress. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2017;42:26-36.
265. Yu J, Zhao Y, Li B, Sun L, Huo H. 17β-Estradiol regulates the expression of antioxidant enzymes in myocardial cells by increasing Nrf2 translocation. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 2012;26(7):264-9.
266. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry*. 2017;524:13-30.
267. Tsikas D, Mikuteit M. N-Acetyl-L-cysteine in human rheumatoid arthritis and its effects on nitric oxide (NO) and malondialdehyde (MDA): analytical and clinical considerations. *Amino Acids*. 2022;54(9):1251-60.
268. Raish M, Ahmad A, Ansari MA, Alkharfy KM, Ahad A, Khan A, et al. Beetroot juice alleviates isoproterenol-induced myocardial damage by reducing oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. *3 Biotech*. 2019;9(4).

269. Shahidi F, Samarasinghe A. How to assess antioxidant activity? Advances, limitations, and applications of in vitro, in vivo, and ex vivo approaches. *Food Production, Processing and Nutrition*. 2025;7(1).
270. Emelyanova L, Boukatina A, Myers C, Oyarzo J, Lustgarten J, Shi Y, et al. High calories but not fat content of lard-based diet contribute to impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in C57BL/6J mice heart. *PLOS ONE*. 2019;14(7):e0217045.
271. Sadowska-Bartosz I, Bartosz G. Evaluation of The Antioxidant Capacity of Food Products: Methods, Applications and Limitations. *Processes*. 2022;10(10):2031.
272. Silvestrini A, Meucci E, Ricerca BM, Mancini A. Total Antioxidant Capacity: Biochemical Aspects and Clinical Significance. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(13):10978.
273. Rusandi FS, Sadek NF. Comparison of different methods for evaluating the antioxidant activity of instant Torbangun (*Coleus amboinicus* L.) drinks. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2024;1324(1):012124.
274. Abraham AM, Quintero C, Carrillo-Hormaza L, Osorio E, Keck CM. Production and Characterization of Sumac Plant Crystals: Influence of High-Pressure Homogenization on Antioxidant Activity of Sumac (*Rhus coriaria* L.). *Plants*. 2021;10(6):1051.
275. Fusari CM, Nazareno MA, Locatelli DA, Fontana A, Beretta V, Camargo AB. Phytochemical profile and functionality of Brassicaceae species. *Food Bioscience*. 2020;36:100606.
276. Matsui T. Polyphenols-absorption and occurrence in the body system. *Food Science and Technology Research*. 2022;28(1):13-33.
277. Wallace CHR, Baczkó I, Jones L, Fercho M, Light PE. Inhibition of cardiac voltage-gated sodium channels by grape polyphenols. *British Journal of Pharmacology*. 2006;149(6):657-65.
278. Udomkasemsab A, Ngamlerst C, Adisakwattana P, Aroonnuan A, Tungtrongchitr R, Prangthip P. Maoberry (*Antidesma bunius*) ameliorates oxidative stress and inflammation in cardiac tissues of rats fed a high-fat diet. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2018;18(1).

## 8. ŽIVOTOPIS

**Nikola Ferara** rođen je 23. kolovoza 1994. godine u Šibeniku, Republika Hrvatska. Osnovnu i srednju školu završio je u rodnome gradu. 2013. godine upisao je Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. 2014. godine primio je Dekanovu nagradu kao najbolji student prve godine studija medicine. Tijekom studijskog razdoblja bio je višestruki dobitnik stipendije za izvrsnost Sveučilišta u Zagrebu, kao i stipendije za izvrsnost Šibensko-kninske županije, radio je kao demonstrator na Katedri za anatomiju Medicinskog fakulteta te aktivno sudjelovao u radu i organizaciji studentske sekcije za dermatovenerologiju. Diplomirao je 1.srpnja 2019 godine čime je stekao titulu doktora medicine. Njegov prvi posao bio je rad pod nadzorom na OHBP-u OB Šibensko-kninske županije, gdje je radio do travnja 2020.g. Potom je ukupno 13 mjeseci radio kao liječnik i voditelj T1 medicinskog tima izvanbolničke hitne službe Zavoda za hitnu medicinu Šibensko-kninske županije, u ispostavama Šibenik i Vodice. U listopadu 2020. godine upisao je poslijediplomski doktorski studij Biologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U travnju 2021. započeo je specijalističko usavršavanje iz dermatologije i venerologije u sklopu Opće bolnice Šibensko-kninske županije, a u srpnju 2023. isto usavršavanje nastavlja kao specijalizant Klinike za kožne i spolne bolesti, KBC-a Sestre Milosrdnice. U lipnju 2025. završava poslijediplomski specijalistički studij iz Dermatologije i venerologije. U kolovozu 2025. polaganjem specijalističkog ispita stječe naziv specijalista dermatologije i venerologije, nakon čega nastavlja raditi u matičnoj ustanovi. Redovito sudjeluje u radu Multidisciplinarnog tima za melanom KBC-a Sestre milosrdnice, objavio je više znanstvenih radova u cijenjenim domaćim i inozemnim časopisima relevantnih citatnih baza, pozvani je predavač na domaćim stručnim skupovima i kongresima, koautor je nekoliko monografija i sveučilišnih udžbenika iz područja dermatologije i venerologije, pomoćni urednik dviju monografija i član organizacijskih odbora domaćih stručnih skupova i simpozija. Član je Hrvatske liječničke komore (HLK), Hrvatskog liječničkog zbora (HLZ), Hrvatskog dermatovenerološkog društva HLZ-a, Hrvatskog društva za dermatološku onkologiju HLZ-a, Međunarodnog društva za dermatoskopiju te Europske akademije za dermatologiju i venerologiju. Osim hrvatskog, fluentno priča i razumije engleski i talijanski jezik.

### *Prilozi u knjizi*

1. Bosnić, Filip; **Ferara, Nikola**; Košuta, Leo; Prkačin, Ivana; Šitum, Mirna; Filipović Mioč, Nika. PLEVA kao prvi znak hematološke bolesti // Dermatovenerološke priče za pamćenje /Šitum, Mirna (ur.). Zagreb: Medicinska naklada, 2024. str. 139-142.
2. **Ferara, Nikola**; Špoljar, Sanja; Haralović, Vanda; Lelas, Judita; Bosnić, Filip; Šitum, Mirna. Limfom kože - tiha progresija do eritrodermije // Dermatovenerološke priče za pamćenje / Šitum, Mirna (ur.). Zagreb: Medicinska naklada, 2024. str. 177-186.
3. **Ferara, Nikola**; Lugović Mihić, Liborija; Šitum, Mirna; Haralović, Vanda; Buljan, Marija. Podsjetnik na rijetku kliničku prezentaciju česte dermatovenerološke bolesti // Dermatovenerološke priče za pamćenje / Šitum, Mirna (ur.). Zagreb: Medicinska naklada, 2024. str. 234-243.
4. Jelavić, Maja; Šitum, Mirna; Bosnić, Filip; **Ferara, Nikola**; Prkačin, Ivana. Gorlin-Goltz sindrom - perspektive liječenja // Dermatovenerološke priče za pamćenje / Šitum, Mirna (ur.). Zagreb: Medicinska naklada, 2024. str. 189-193.
5. Dragun, Katarina; Ranogajec, Adela; Haralović, Vanda; **Ferara, Nikola**; Šitum, Mirna; Blajčić, Iva. Djevojka sa solitarnim hiperkeratotičnim nodusom na podlaktici - prikaz bolesnice // Dermatovenerološke priče za pamćenje / Šitum, Mirna (ur.). Zagreb: Medicinska naklada, 2024. str. 193-199.
6. Madiraca Glasović, Dora; **Ferara, Nikola**; Franceschi, Nika; Šitum Čepnja, Zdenka; Brajčić, Hrvoje; Mataija, Mirna; Tumbri, Jasna; Vučić, Majda; Šitum, Mirna. Rijedak slučaj kongenitalnog melanoma // Dermatološka onkologija u kliničkoj praksi / Šitum, Mirna (ur.). Zagreb: Medicinska naklada; Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, 2023. str. 1-6.

### *Stručni radovi*

1. Šitum, Mirna; **Ferara, Nikola**; Stanimirović, Andrija. Najčešće virusne i bakterijske bolesti kože u kliničkom radu // Infekcije kože, mikrobiom i imunost / Lugović-Mihić, Liborija (ur.). Zagreb: Medicinska naklada, 2025. str. 1-38.

## *Prilozi u časopisu*

### *Izvorni znanstveni radovi*

1. **Ferara, Nikola**; Balta, Vedran; Đikić, Domagoj; Odeh, Dyana; Mojsović-Ćuić, Ana; Feher-Turković, Lana; Dilber, Dario; Beletić, Anđelo; Landeka Jurčević, Irena; Šola, Ivana. The Effect of the Glucosinolate Sinigrin on Alterations in Molecular Biomarkers of the Myocardium in Swiss Mice // *Foods*, 14 (2025), 2; 327, 19. doi: <https://doi.org/10.3390/foods14020327>
2. Prkačin, Ivana; Šamija, Ivan; Filipović, Nika; Vucić, Matej; Vučić, Majda; **Ferara, Nikola**; Šitum, Mirna. Frequency of BRAF Mutations in Dysplastic Nevi, Lentigo Maligna, and Melanoma In Situ // *Journal of clinical medicine*, 13 (2024), 16; 4799-4805. doi: 10.3390/jcm13164799
3. Prkačin, Ivana, Mokos, Mislav, **Ferara, Nikola**, Šitum, Mirna. (2024). Melanoma's New Frontier: Exploring the Latest Advances in Blood-Based Biomarkers for Melanoma. *Cancers*, 16 (24), 4219. <https://doi.org/10.3390/cancers16244219>
4. **Ferara, Nikola**; Špoljar, Sanja; Lugović-Mihić, Liborija; Gverić Grginić, Ana; Rezo Vranješ, Violeta; Bešlić, Iva; Perović, Judita; Regović Džombeta, Tihana. Cutaneous Hyalohyphomycosis and Its Atypical Clinical Presentations in Immunosuppressed Patients // *Life*, 14 (2024), 1; 154-154.. doi: 10.3390/life14010154
5. Balta, Vedran; Đikić, Domagoj; Landeka Jurčević, Irena; Odeh, Dyana; Oršolić, Nada; **Ferara, Nikola**; Dilber, Dario; Dragičević, Petar; Dragović-Uzelac, Verica. The Effect of a High-Protein Diet Supplemented with Blackthorn Flower Extract on Polyphenol Bioavailability and Antioxidant Status in the Organs of C57BL/6 Mice // *Nutrients*, 15(18) (2023), 4066, 27. doi: <https://doi.org/10.3390/nu15184066>
6. Aždajić Delaš, Marija; Bešlić Iva, Gašić Ana; **Ferara Nikola**; Pedić Lovre; Lugović-Mihić Liborija. Increased Scabies Incidence at the Beginning of the 21st Century: What Do Reports from Europe and the World Show? // *Life*, 12 (2022), 10; 1598, 15. doi: 10.3390/life12101598.

- Lampalo, Marina; Jukić, Irena; Bingulac-Popović, Jasna; Safić Stanić, Hana; **Ferara, Nikola**; Popović-Grle, Sanja. ABO blood group genotypes and ventilatory dysfunction in patients with allergic and nonallergic asthma // Medicinski glasnik Ljekarske komore Zeničko-dobojskog kantona, 17 (2020), 2; 369-374. doi: 10.17392/1099-20.
- Lampalo, Marina; Majer, Marjeta; **Ferara, Nikola**; Milošević, Milan; Barišić Kutija, Marija; Jukić, Irena. Gender differences in relationship between body mass index and asthma // Psychiatria Danubina, 31 (2019), Suppl 5; 786-791.

#### *Ostali radovi u časopisima*

- Lampalo, Marina; Jukić, Irena; Bingulac-Popović, Jasna; Safić, Hana; **Ferara, Nikola**; Popović-Grle, Sanja. The Role of Pai-1 Gene 4g/5g Polymorphism and Diagnostic Value of Biomarkers in Allergic and Non-Allergic Asthma Phenotype // Acta clinica Croatica, 57. (2018), 1.; 96-102.

#### *Pregledni rad (znanstveni)*

- Prkačin, Ivana; Mokos, Mislav; **Ferara, Nikola**; Šitum, Mirna. Melanoma's New Frontier: Exploring the Latest Advances in Blood-Based Biomarkers for Melanoma // Cancers, 16 (2024), 24; 4219, 24. doi: 10.3390/cancers16244219

#### *Prikaz slučaja*

- Ferara, Nikola**; Lovrić Kojundžić, Sanja ; Šain, Milenka ; Jeličić, Ivo. Challenge of hemodialysis: A patient with glioblastoma cerebri, cerebral edema, and hemorrhagic stroke //Therapeutic apheresis and dialysis, 25 (2020), 1; 124-125. doi: 10.1111/1744-9987.13499

#### *Stručni rad*

- Šitum, Mirna; Franceschi, Nika; **Ferara, Nikola**; Šitum Čepnija, Zdenka. Treatment of Actinic Keratoses and Field Cancerization - Croatian perspective // Rad Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti. Medicinske znanosti, 563 (2024), 66-67; 38-47.

#### *Prilozi sa skupa (u zborniku radova)*

#### *Kratko priopćenje*

- Lampalo, Marina; **Ferara, Nikola**; Safić Stanić, Hana; Bingulac Popović, Jasna; Hecimović, Ana ; Jukić, Irena. Association between male and female body mass index

with lung function parameters in asthma // Kongres Europske akademije za alergiju i kliničku imunologiju - EAACI (The European Academy of Allergy and Clinical Immunology) kongres, 1- 6.lipanj 2019. Lisbon, Portugal. 2019. str. 369-369.

### ***Sažetci izlaganja sa skupa***

1. **Ferara, Nikola**; Lampalo, Marina; Jukić, Irena; Bingulac-Popović, Jasna; Kilić, Paula; Popović- Grle, Sanja; Significance of platelet serotonin concentration in allergic rhinitis and asthma // 2nd Symposium of the International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) in cooperation with Croatian Dermatovenereological Society of the Croatian Medical Association. 2023. str. 61-61.
2. Feher Turković, Lana; **Ferara, Nikola**; Balta, Vedran; Domjanić Drozdek, Sara; Mojsović Ćuić, Ana; Kapetanović, Antonia; Landeka Jurčević, Irena; Đikić, Domagoj; Šola, Ivana .Učinak sinigrina na molekularne markere miokarda // Knjiga sažetaka radova: 22. konferencija medicinskih sestara i tehničara i 8. konferencija zdravstvenih profesija - Tehnologije i inovacije u zdravstvenoj skrbi i obrazovanju / Rađenović, Ozren (ur.). Zagreb: Zdravstveno veleučilište u Zagrebu, 2023. str. 52-52.
3. Špoljar Sanja, **Ferara Nikola**, Pedić Lovre, Haralović Vanda, Perović Judita, Kilić Paula, Lampalo Marina Consider fixed drug reaction before conducting unnecessary diagnostic tests // 2nd Symposium of the International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) in cooperation with Croatian Dermatovenereological Society of the Croatian Medical Association 2023. str. 42-42.
4. **Ferara, Nikola**; Vujević, Luka; Haralović, Vanda; Buljan, Marija. Case Report on Croatian Family with BAP1 predisposition syndrome (mother and daughter) // EADV 31TH CONGRESS 2022. 2022. str. 86-86.
5. Kuna, Matea; Štrajtenberger, Maja; Čulina, Lucija; **Ferara, Nikola**; Pravica, Nika ; Lugović Mihić, Liborija. Significant role of the coagulation system and fibrinolysis in the pathophysiology of chronic spontaneous urticaria. 2022.
6. Rnjak, Dina; Štajduhar, Anamarija; Popović-Grle, Sanja; **Ferara, Nikola**; Jelavić, Iva; Lampalo, Marina First Outcomes of Anti-IL5 Biological Therapy in Patients with Severe Asthma in Croatia. 2022. str. 1-1.

7. **Ferara, Nikola**; Špoljar, Sanja; Culina, Lucija; Haralović, Vanda; Kuna, Matea. Consider subacute and systemic lupus erythematosus when dealing with typical presentation of erythema multiforme. 2022.

***Neobjavljeni prilozi sa skupa***

1. Dragun, Katarina; Šitum, Mirna; Visser, Willem Izak; Bosnić, Filip; **Ferara, Nikola**. Kliničke posebnosti upalnih dermatoza na tamnoj koži // 22. Prosinački znanstveni simpozij: Koža svijeta - dermatološki izazovi u doba migracija. Zagreb, Hrvatska, 05.12.2025-05.12.2025.
2. **Ferara, Nikola**; Šitum, Mirna; Špoljar, Sanja; Radnić, Mišela; Krpeta, Snježana; Čubrilović, Željka. Apremilast u dermatovenerologiji - mala molekula i velika nada // 4. simpozij udruge medicinskih sestara i tehničara Hrvatske za dermatovenerologiju. Opatija, Hrvatska, 25.04.2025-27.04.2025.
3. Haralović, Vanda; **Ferara, Nikola**; Prkačin, Ivana; Lugović Mihić, Liborija; Mocos, Mislav; Šitum, Mirna. Under the Radar: Detecting and Treating Norwegian Scabies in an Elderly Patient // European Academy of Dermatology and Venereology Congress 2024. Amsterdam, Nizozemska, 25.09.2024-29.09.2024.
4. Mocos, Mislav; **Ferara, Nikola**; Bosnić, Filip; Haralović, Vanda; Ranogajec, Adela; Prkačin, Ivana; Šitum, Mirna. Clinical Response to Vismodegib in Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome: A Case Report // European Academy of Dermatology and Venereology Congress 2024. Amsterdam, Nizozemska, 25.09.2024-29.09.2024.
5. Madiraca Glasović, Dora; **Ferara, Nikola**; Filipović, Nika; Franceschi, Nika; Haralović, Vanda; Šitum, Mirna. Suspect lichenoid drug eruption when dealing with clinical presentation of lichen planus // 2nd Symposium of the International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG) in cooperation with Croatian Dermatovenerological Society of the Croatian Medical Association. Split, Hrvatska, 31.03.2023-02.04.2023.
6. **Ferara, Nikola**; Perović, Judita; Prkačin, Ivana; Šitum, Mirna; Buljan, Marija; Blajić, Iva. Consider skin biopsy in patient with unexpected poor response to biological therapy for psoriasis // European Academy of Dermatology and Venereology Congress. Berlin, Njemačka, 11.10.2023-14.10.2023.

7. **Ferara, Nikola**; Špoljar, Sanja; Lugović Mihić, Liborija; Gverić-Grginić, Ana; Rezo Vranješ, Violeta; Regović Džombeta, Tihana; Šitum, Mirna. Suspect invasive fungal infection when dealing with atypical skin lesions in immunosuppressed patient 1 patient // European Academy of Dermatology and Venereology Congress. Berlin, Njemačka, 11.10.2023-14.10.2023.
8. **Ferara, Nikola**; Franceschi, Nika; Filipović, Nika; Haralović, Vanda; Šitum, Mirna; Madiraca Glasović, Dora. Carcinoma en cuirasse mistaken for allergic and infectious diseases – case report // European Academy of Dermatology and Venereology Congress. Berlin, Njemačka, 11.10.2023-14.10.2023.
9. Filipović, Nika; Šitum, Mirna; Mihatov Štefanović, Iva; Franceschi, Nika; **Ferara, Nikola**; Madiraca Glasović, Dora. Acneiform eruption as a side effect of selumetinib in a patient with neurofibromatosis // European Academy of Dermatology and Venereology Congress. Berlin, Njemačka, 11.10.2023-14.10.2023.