

## Utjecaj flavonoida iz cvijeta *Prunus spinosa* L. i Whey proteina na oksidacijsko/antioksidacijski status u C57BL/6 miša

Irena Landeka Jurčević<sup>1\*</sup>, Domagoj Đikić<sup>2</sup>, Vedran Balta<sup>2</sup>, Ivona Paradžik<sup>1</sup>, Lea Sabljčić<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Zagreb,  
Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

<sup>2</sup>Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet Zagreb,  
Rooseveltova trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

\*Dopisni autor: ilandeka@pbf.hr

### Sažetak

Ova studija je provedena kako bi se procijenili učinci visoko-proteinske dijeta (Whey protein - WP) i flavonoida izoliranih iz cvijeta *Prunus spinosa* L. na različite biljege oksidacijskog stresa u jetri i bubregu miša. Pri normalnim fiziološkim uvjetima stanični sustav je sposoban neutralizirati slobodne radikale katalitičkim uklanjanjem reaktivnih kisikovih vrsta (ROS-a) djelovanjem antioksidacijskih enzima. Antioksidacijsko djelovanje Whey proteina (WP) bazirano je na visokom sadržaju i bioiskoristljivosti aminokiseline cistein koja pomaže u sintezi glutaciona (GSH), moćnog unutarstaničnog antioksidansa. Djelovanje WP i flavonoida izoliranih iz cvijeta trnina (ECT) istraženo je na laboratorijskim životinjama (C57BL/6 miš) kroz 30 dana tretmana. Životinje su bile podijeljene u 4 grupe: grupa I – kontrolna grupa (KO); grupa II – ekstrakt cvijeta trnina (ECT); grupa III – Whey protein (WP) i grupa IV – WP+ECT. Istraživani biomarkeri oksidacijskog stresa u organima bili su malonildialdehid (MDA) i reducirani glutation (GSH). Rezultati pokazuju da je tretman s ECT statistički značajno smanjio aktivnosti MDA u organima miša u odnosu na kontrolnu skupinu životinja, dok su ostale grupe ostale na razini kontrolne skupine. Koncentracije reduciranog glutaciona (GSH) u ispitivanim organima statistički su značajno (ANOVA,  $p < 0,05$ ) povećane u svim grupama u odnosu na kontrolnu grupu. Ovi rezultati ukazuju na to da ekstrakt cvijeta trnina i proteini sirutke mogu djelovati kao nutritivni sastojak za povećanje endogenih antioksidacijskih enzima i smanjenje oksidacijskog stresa.

*Ključne riječi:* *Prunus spinosa* L., Whey protein, lipidna peroksidacija, reducirani glutation

### Uvod

Trnina (*Prunus spinosa* L.) je samonikla biljka koja raste u gotovom svim dijelovima Europe. Cvijet trnina bogat je polifenolima, spojevima koji imaju izrazito jako antioksidacijsko djelovanje, poput kvercetina, kamferola i rutina. Blagotvorni učinak polifenola na organizam proizlazi iz sposobnosti vezanja slobodnih radikala (antioksidacijsko djelovanje), keliranja metala (vezanje dvovalentnih kationa) te inaktivacije određenih enzima zbog čega im se pripisuju antibakterijska, antikancerogena, antialergijska i protuupalna svojstva (Valls i sur., 2009).

Oksidacijski stres, koji se definira kao posljedica neravnoteže između stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i antioksidacijske obrane organizma, povezan je s oštećenjima različitih molekula uključujući lipide, proteine i nukleinske kiseline. Oksidacijski stres u stanicama određuje se aktivnošću i koncentracijom antioksidacijskih enzima, kao što su superoksid dismutaza, katalaza, reducirani glutation, te koncentracijom karboniliranih proteina i malondialdehida (marker lipidne peroksidacije). Navedeni enzimi neophodni su za zaštitu stanica od toksičnog djelovanja reaktivnih kisikovih vrsta koje se stvaraju tijekom metabolizma. Istraživanja su pokazala da visoko-proteinska dijeta u kojoj su korišteni proteini sirutke smanjuje oksidacijski stres u životinja i povećava mitohondrijsku aktivnost u mozgu (Shertzer i sur., 2013).

Svjetska zdravstvena organizacija (World Health Organization-WHO) i Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih Naroda (Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO) 2007. godine definirali su preporučeni dnevni unos proteina koji iznosi 0,8 g proteina po kilogramu tjelesne mase čovjeka, što je otprilike 10% preporučenog dnevnog unosa energije. Visoko-proteinska dijeta (više od 2-3 grama proteina po kilogramu tjelesne mase) često se preporuča kao dijeta koja se koristi za redukciju tjelesne mase i održavanje dobrog zdravlja. Rezultati različitih provedenih studija (Journal i sur., 2012; Kinsey-Jones i sur., 2015; Santesso i sur., 2012) pokazuju da povećanje unosa proteina u prehrani smanjuje ukupan unos energije, što dovodi do redukcije tjelesne mase.

Prednost Whey proteina u odnosu na druge proteine je u brznoj apsorpciji u crijevima, što u konačnici rezultira sintezom proteina koji izgrađuju mišiće (Mansour i sur., 2015). Jedan od najznačajnijih efekata koje proteini sirutke izazivaju u organizmu je njihova sposobnost da podiže koncentraciju glutationa (GSH), koji je najvažniji u vodi topljiv antioksidans koji se nalazi u tijelu. Tijekom intenzivnog vježbanja, visok udio aminokiselina donatora sulfidrilnih skupina može reducirati intracelularne koncentracije GSH. Unos proteina sirutke ne samo da može usporiti oksidacijski stres induciran vježbanjem, nego i može pomoći u održavanju redoks statusa u imunološkim stanicama budući da one mogu biti osjetljive na koncentracije unutarstaničnih sulfhidrilnih spojeva, GSH i cisteina. Učinak ovog mehanizma potvrđen je eksperimentalnim dokazima (Marshall, 2004).

Whey proteini se smatraju i izvorom aminokiselina, budući da sadrže do 26% aminokiselina razgranatog lanca - BCAA (valin, leucin, izoleucin), te L-arginina, L-lizina, L-glutamina, cisteina, laktoalbumina, laktozu, mineralne tvari i lipide u tragovima. Prema tome, učinci proteina sirutke u imunološkom sustavu mogu predstavljati učinak pojedinih aminokiselina samih po sebi. Osim toga, proteini sirutke se brzo probavljaju i apsorbiraju, što poslije unosa rezultira sintezom proteina koji izgrađuju mišiće (Nada i sur., 2015.; Burd i sur., 2012.). Proteini sirutke imaju mnoge pozitivne učinke na organizam, kao što su kontrola metabolizma glukoze u zdravih osoba, regulacija prekomjerne tjelesne mase, hipertenzije i oksidacijskog stresa. Također, dolazi do smanjenja ekspresije upalnih i oksidacijskih markera stresa, kao i do smanjenja krvnog tlaka (Sousa i sur., 2012).

Cilj ovog rada bio je ispitati antioksidacijski utjecaj polifenola ekstrakta cvijeta trnine (*Prunus spinosa L.*) i visoko-proteinske dijetete (Whey protein) na markere oksidacijskog stresa u jetri i bubregu C57BL/6 miša.

## Materijali i metode

### *Pokusne životinje*

Pokusni su provedeni na životinjama iz jedinice za uzgoj laboratorijskih životinja Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Pokusne životinje bile su C57BL/6 miševi, u dobi od tri mjeseca. U ovo istraživanje ukupno je bilo uključeno 20 životinja. Životinje su hranjene tijekom 30 dana. Po pet životinja je bilo smješteno u kavezu, na temperaturi od 22°C, uz neograničen pristup hrani i vodi. Životinje su hranjene komercijalno dostupnom hranom koja je životinjama bila dostupna *ad libitum*. Životinje su držane u slijedećim uvjetima: 12 sati svjetla i 12 sati tame pri 22 °C i 60% vlažnosti. Hrana kojom su hranjeni miševi je standardna hrana za miševe 4RF21 (Mucedola, Italija, oblik 12 mm), a sadrži pšenicu, kukuruz, soju, riblji ekstrakt, dikalcijev fosfat, kalcijev karbonat, natrijev klorid, sojino ulje, kvasac i ljuške lješnjaka. Održavanje i njega svih pokusnih životinja provedena je u skladu sa smjernicama koje su na snazi u Republici Hrvatskoj (Zakon o dobrobiti životinja, NN #135, 2006 i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u pokusima ili druge znanstvene svrhe, NN #47, 2011), a provodi se u skladu s Uputama za njegu i korištenja laboratorijskih životinja, DHHS Publ. # (NIH) 86-123. Pokuse je odobrilo Etičko povjerenstvo Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu (No. 251-58-10617-14-21).

### *Eksperimentalne grupe životinja*

Eksperimentalne grupe su činile četiri grupe životinja (5 životinja po grupi): KO – Kontrolna grupa (0,3 mL fiziološke otopine); ECT – Ekstrakt cvijeta trnine (100 mg/kg na dan); WP – Whey protein (40% koncentracija proteina; 400 g/kg na dan); WP + ECT – Ekstrakt cvijeta trnine + Whey protein. Životinje su žrtvovane 30.-ti dan pokusa te su uzeti organi bubrega i jetre za daljnju analizu. Životinje su anestetizirane eterom te su iskrvarene punkcijom iz srca bez antikoagulansa. Bubrezi i jetra su izolirani iz životinja odmah nakon skupljanja uzorka krvi. Izvagani su, zabilježena je masa i potom su pohranjeni na -80°C za daljnju analizu.

### *Priprema tkiva za određivanje antioksidacijskih enzima*

Svježe tkivo homogenizira se u 50 mM fosfatnom puferu pH 7 u omjeru 1 : 10 (w/v). Organi se potom homogeniziraju na ultrazvučnom homogenizatoru u 3 ciklusa od po 30 sekundi uz stanku od 10 sekundi između ciklusa. Uzorke je potrebno cijelo vrijeme držati na ledu. Homogenate bubrega i jetre potom je potrebno centrifugirati pri 20 000 x g tijekom 15 min na 4°C.

### *Mjerenje lipidne peroksidacije*

Prisutnost lipidne peroksidacije smo određivali modificiranom metodom koju su opisali Jayakumar i sur., 2008. Ova metoda se temelji na mjerenju koncentracije malondialdehida (MDA) koji je jedan od glavnih produkata lipidne peroksidacije. Malondialdehid reagira sa tiobarbiturnom kiselinom i stvara kromogen koji je moguće mjeriti spektrofotometrijski. Uzorcima jetre i bubrega mase 100 mg dodali smo 1 mL 50 mM fosfatnog pufera (pH 7.0) i homogenirali ultrazvučnim homogenizatorom Bandelin Sonoplus HD2070 (Bandelin, Njemačka) upotrebom sonde MS73 (Bandelin, Njemačka), snagom od 10%. Homogenate smo centrifugirali centrifugom Mikro 200R (Hettich, Njemačka) 15 minuta pri brzini od 10 000 rpm. 200 µL supernatanta pomiješali smo sa 200 µL 8,1%-tne vodene otopine SDS-a, 1,5 mL 20%-tne vodene otopine octene kiseline (pH 3.5) i 1,5 mL 0.81%-tne

## Medicinska kemija i farmacija / *Medical Chemistry and Pharmacy*

---

vodene otopine tiobarbiturne kiseline. Smjesu smo zagrijavali 60 minuta pri temperaturi od 95 °C. Ohlađenim uzorcima izmjerili smo apsorbanciju pri 532 nm i 600 nm spektrofotometrom Libro S22 (Biochrom, Ujedinjeno Kraljevstvo). Ukupnu apsorbanciju određivali smo prema formuli  $A = A(532 \text{ nm}) - A(600 \text{ nm})$ . Koncentraciju smo izračunali prema formuli:

$$c(\text{MDA}) = A \times V_{\text{uzorka}} (\text{mL}) / \varepsilon \times V_{\text{reakcijske smjese}} (\text{mL}) \times c_{\text{proteina}} (\text{mg/mL}) \quad (1)$$

gdje:  $\varepsilon$  iznosi  $1,56 \times 10^5$  l/M cm, a duljina kivete  $l$  iznosi 1 cm. Koncentraciju lipidnih peroksida izrazili smo kao nmol MDA/mg proteina.

### *Aktivnost reduciranog glutationa*

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

$$c = \Delta A \times V_{\text{uzorka}} (\text{mL}) / \varepsilon \times V_{\text{reakcijske smjese}} (\text{mL}) \times c_{\text{proteina}} (\text{mg/mL}) \quad (2)$$

gdje  $\varepsilon$  (DTNB) iznosi 8,22 l/mM cm, a duljina kivete  $l$  iznosi 0,6 cm. Koncentraciju proteina u uzorku izmjerili smo metodom po Lowryju (Lowry i sur., 1951). Aktivnost enzima reduciranog glutationa (GSH) smo izrazili kao mU/mg.

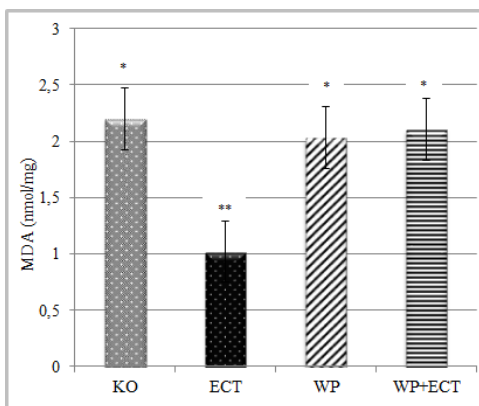
### *Statistička analiza*

Statističku analizu podataka smo napravili koristeći Microsoft Excel 2011 (Redmond, Sjedinjenje Američke Države) i StatSoft Statistica 7.0 (Tulza, Sjedinjenje Američke Države). Dobivene podatke smo izražavali u obliku srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija srednje vrijednosti. Višestruku usporedbu kontrolne i tretiranih skupina miševa izvršili smo ANOVA analizom varijance. Interval pouzdanosti namjestili smo na  $p \leq 0,05$ . Post-hoc analize smo izvršili koristeći Tukey test kako bismo ustanovili razlike između pokusnih grupa. Analiza je provedena pomoću SPSS verzija 17 (SPSS Inc, Chicago, IL).

## Rezultati i rasprava

### *Utjecaj polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine i visoko-proteinske dijeta na lipidnu peroksidaciju u homogenatu tkiva jetre i bubrega u C57BL/6 miša*

Proces lipidne peroksidacije je oblik oksidacijske promjene polinezasićenih masnih kiselina koji rezultira nastankom citotoksičnih produkata, a jedan od njih je malondialdehid (MDA). MDA je prihvaćeni biljeg lipidne peroksidacije te se koristi u evaluaciji oksidacijskog stresa (Bukan i sur., 2003). Na slici 1. i 2. prikazani su rezultati nefroprotektivnog i hepatoprotetivnog utjecaja polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine i Whey proteina na aktivnost MDA u homogenatu tkiva bubrega i jetre C57BL/6 miša.



**Slika 1.** Koncentracija MDA u homogenatima tkiva bubrega kod kontrolne i tretiranih skupina životinja u odnosu na kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ SD.

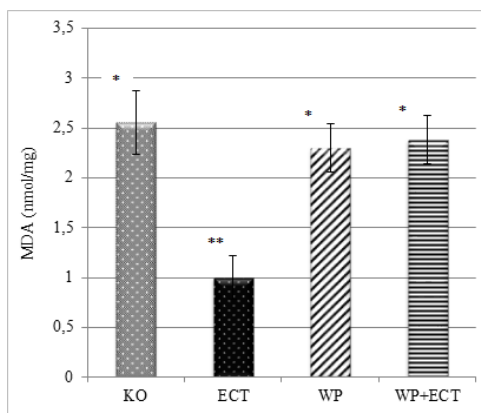
\* – razlike između tretmana;  $p < 0,05$  (ANOVA).

KO – kontrolna grupa; ECT – ekstrakt cvijeta trnine; WP – whey proteini

**Fig. 1.** MDA concentration in the tissues of the kidney of the control animals and the treated groups compared to the control. Values are expressed as means $\pm$ SD.

\* – differences between treatments;  $p < 0.05$  (ANOVA).

KO - control group; ECT - Flower Extract Trnina; WP - whey proteins



**Slika 2.** Koncentracija MDA u homogenatima tkiva jetre kod kontrolne i tretiranih skupina životinja u odnosu na kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost $\pm$ SD.

\* – razlike između tretmana;  $p < 0,05$  (ANOVA).

KO – kontrolna grupa; ECT – ekstrakt cvijeta trnine; WP – whey proteini

**Fig. 2.** MDA concentration in the tissues of the liver of the control animals and the treated groups compared to the control. Values are expressed as means $\pm$ SD.

\* – differences between treatments;  $p < 0.05$  (ANOVA).

KO - control group; ECT - Flower Extract Trnina; WP - whey proteins

## Medicinska kemija i farmacija / *Medical Chemistry and Pharmacy*

---

Statistički značajno smanjenje (ANOVA,  $p < 0.05$ ) aktivnosti MDA zabilježeno je kod grupe koja je primala ekstrakt cvijeta trnine u homogenatu tkiva bubrega ( $1,020 \pm 0,18$  nmol/ mg) u odnosu na kontrolnu grupu životinja ( $2,196 \pm 0,24$  nmol/mg) (slika 1) i u homogenatu tkiva jetre ( $0,999 \pm 0,22$  nmol/mg) u odnosu na kontrolnu grupu životinja ( $2,551 \pm 0,35$  nmol/mg) (slika 2). Smanjenje koncentracije MDA zabilježeno je i kod grupa koje su primale visoko-proteinsku dijetu ( $2,032 \pm 0,28$  nmol/mg) i kombinaciju visoko-proteinske dijetete i ekstrakta cvijeta trnine ( $2,102 \pm 0,22$  nmol/mg) u homogenatu tkiva bubrega (slika 1) i kod grupa koje su primale visoko-proteinsku dijetu ( $2,298 \pm 0,24$  nmol/mg) i kombinaciju visoko-proteinske dijetete i ekstrakta cvijeta trnine ( $2,384 \pm 0,24$  nmol/mg) u homogenatu tkiva jetre u odnosu na kontrolnu grupu (slika 2).

Višestruko nezasićene masne kiseline su često meta stvorenih slobodnih radikala. Ustanovljeno je da tkiva koja su izložena oksidacijskom stresu brže ulaze u lipidnu peroksidaciju, a razlog veće peroksidabilnosti uključuje inaktivaciju, odnosno manjak antioksidacijskih mehanizama (Štefan i sur., 2007). Kemijska modifikacija aminokiselina u proteinima tijekom lipidne peroksidacije rezultira formiranjem lipooksidacijskih produkata koji služe kao markeri oksidacijskog stresa *in vivo*. MDA reagira s proteinima krvnih žila npr. s kolagenom i dovodi do promjena u njegovoj strukturi (Tiku i sur., 2003.). Mnoge su studije pokazale da je koncentracija MDA znatno povišena kod dijabetesa (Slatter i sur., 2000.). Petlevski i suradnici proveli su studiju kojoj je cilj bio ispitati učinak akarboze (inhibitor  $\alpha$ -glukozidaze) na koncentraciju glukoze u serumu i MDA u homogenatu jetre NOD (engl. non-obese diabetic) miša. U NOD miševa je dijabetes induciran *in vivo* aplikacijom aloksan-monohidrata (75 mg/kg tjelesne mase). Nakon sedmodnevnog tretmana akarbozom zabilježeno je statistički značajno smanjenje koncentracije glukoze u krvi u skupini dijabetičnih NOD miševa tretiranih akarbozom u odnosu na skupinu dijabetičnih NOD miševa, a isto tako je uočen i statistički značajan pad koncentracije MDA (Petlevski i sur., 2006).

Pozitivni efekti aronije i njenih proizvoda na markere oksidacijskog stresa ispitivani su u malom broju dijetetskih interventnih studija kod ljudi. Rezultati tih studija potencijalno antioksidacijsko djelovanje baziraju upravo na smanjenju koncentracije MDA. Značajno smanjenje koncentracije MDA u serumu pokazano je nakon 8 tjedana konzumacije ekstrakta aronije kod ispitanika s metaboličkim sindromom (Broncel i sur., 2010), kao i kod veslača koji su konzumirali sok od aronije prije izvođenja ergonometrijskog testa (Pilaczynska-Szczesniak i sur., 2005).

Rezultati većeg broja istraživanja podupiru pretpostavku o povezanosti lipidne peroksidacije (LPO) i nastanka karcinoma bubrega te svrstavaju karcinom bubrega u skupinu sa znatnim promjenama u ravnoteži oksidacijsko/antioksidacijskog sustava. Gago-Dominguez i Castela (2006) su predložili LPO kao jednu od ključnih čimbenika u razvoju karcinoma bubrega. Naime, reaktivne kisikove vrste (RKV) koje uzrokuju LPO oštećuju i DNA izazivajući genetske mutacije, aktiviraju protoonkogene i/ili inaktiviraju tumor supresorske gene te mogu dovesti do preobrazbe zdrave u zloćudnu stanicu. Opisani proces karakterističan je za sporo proliferirajuća tkiva (npr. jetra, bubreg). Zdravo tkivo bubrega u čovjeka sadrži veliki broj peroksisoma. U stanicama karcinoma bubrega peroksisomi su potpuno odsutni. Posljedica nedostatka peroksisoma je narušeni metabolizam masnih kiselina (Grabacka i Reiss, 2008.).

Pad koncentracije MDA u jetri pronađen je i kod zdravih štakora koji su tretirani prehranom bogatom polifenolima iz voća poput jagoda ili šljiva u usporedbi s kontrolnom grupom životinjama (Mateos i sur., 2005). Diamanti i sur. su istraživali utjecaj dvije različite sorte jagoda (Adria i Sveva) na toksičnost u štakora izazvanu doksorubicinom (DOX). Doksorubicin je drastično povećao

oštećenja DNA, lipidnu peroksidaciju i sadržaj mitohondrijskih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), te je značajno smanjio aktivnost antioksidacijskih enzima i mitohondrijske funkcije. Dva mjeseca nakon što su životinja tretirane jagodama, došlo je do značajnog smanjenja oštećenja DNA i koncentracije ROS i značajnog poboljšanja markera oksidacijskog stresa, aktivnosti antioksidacijskih enzima i mitohondrijske performanse. Autori su zaključili da se unosom jagoda može utjecati na toksičnost izazvanu doksorubicinom, ta da povećani unos jagoda ima potencijalne zdravstvene benefite od oksidacijskog stresa *in vivo* (Diamanti i sur; 2014.). Sličan pad MDA u jetri pronađen je i kod zdravih štakora koji su tretirani prehranom bogatom polifenolima iz voća poput jagoda ili šljiva u usporedbi s kontrolnom grupom životinjama (Mateos i sur., 2005).

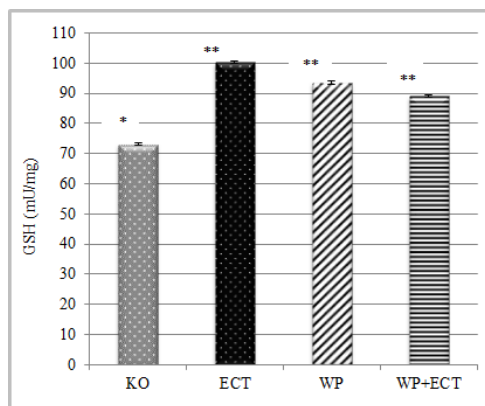
U skladu s prethodnim istraživanjima, u ovom istraživanju, snižena razina MDA u homogenatu tkiva bubrega i jetre kod grupe životinja koja je uz normalnu prehranu dobivala i ekstrat cvijeta trnine pokazuje značajan pad lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolnu grupu životinja što ukazuje na antioksidacijski učinak ekstrakta cvijeta trnine koji je bogat polifenolima. Grupe životinja koje su tretirane WP i WP+TC također nisu izazvale oksidacijski stres. Ovi se rezultati mogu objasniti činjenicom da polifenoli štite stanice od lipidne peroksidacije, ne samo u situacijama oksidacijskog stresa, nego i u normalnim uvjetima.

*Utjecaj polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine i Whey proteina na aktivnost GSH enzima u homogenatu tkiva (bubreg i jetra) miša*

Reaktivni radikali kisika (ROS) stvaraju se tijekom različitih patoloških procesa u povećanim koncentracijama. Međutim, mehanizmi antioksidacijske zaštite, uključujući različite antioksidacijske enzime, sprječavaju oštećenja tkiva i druge komplikacije povezane s ROS-om. Antioksidacijska zaštita je važna u uklanjanju slobodnih radikala jer osigurava maksimalnu zaštitu bioloških mjesta kao što su tiolne skupine koje su dio aktivnih mjesta u nekim metabolizirajućim enzimima. Dobar antioksidans specifično potiskuje slobodne radikale, kelira redoks-metale, međusobno djeluje s drugim antioksidansima unutar antioksidacijske mreže, lako se apsorbira, ima fiziološki relevantnu koncentraciju u tkivima i biološkim tekućinama, te djeluje i u vodenim i/ili membranskim domenama (Valko i sur., 2006.). Polifenolni spojevi, koji se javljaju u izobilju u prehranbenim izvorima kao što su voće, povrće, čaj i vino, mogu imati važnu ulogu u jačanju antioksidacijskog djelovanja (Pandey i sur., 2009).

Na slikama 3. i 4. prikazani su rezultati utjecaja na aktivnost reduciranog glutationa (GSH) u bubregu i jetri tretiranih grupa životinja. Statistički značajno povećanje (ANOVA,  $p < 0,05$ ) aktivnosti GSH zabilježeno je kod uzorka ekstrakt cvijeta trnine u homogenatu tkiva bubrega ( $100,36 \pm 0,34$  mU/mg) u odnosu na kontrolnu grupu ( $73,11 \pm 0,48$  mU/mg<sup>-</sup>), dok je statistički značajno povećanje zabilježeno i u grupama WP ( $93,67 \pm 0,56$  mU/mg) i WP+TC ( $89,17 \pm 0,42$  mU/mg) (slika 3) i u homogenatu tkiva jetre ( $116,33 \pm 0,48$  mU/mg) u odnosu na kontrolnu grupu ( $83,58 \pm 0,46$  mU/mg). Također, statistički značajno povećanje zabilježeno je u grupama koje su tretirane sa Whey proteinom ( $110,46 \pm 0,44$  mU/mg), kao i WP+TC ( $105,33 \pm 0,42$  mU/mg) (slika 4).

Medicinska kemija i farmacija / *Medical Chemistry and Pharmacy*



**Slika 3.** Koncentracija GSH u homogenatima tkiva bubrega kod kontrolne i tretiranih skupina životinja u odnosu na kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost±SD.

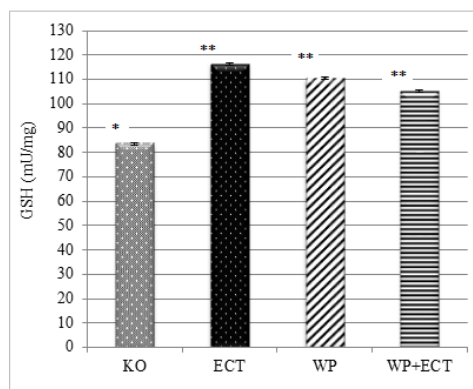
\* – razlike između tretmana;  $p < 0,05$  (ANOVA).

KO – kontrolna grupa; ECT – ekstrakt cvijeta trnina; WP – whey proteini

**Fig. 3.** GSH concentration in the tissues of the kidney of the control animals and the treated groups compared to the control. Values are expressed as means±SD.

\* – differences between treatments;  $p < 0.05$  (ANOVA).

KO - control group; ECT - Flower Extract Trnina; WP - whey proteins



**Slika 4.** Koncentracija GSH u homogenatima tkiva jetre kod kontrolne i tretiranih skupina životinja u odnosu na kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost±SD.

\* – razlike između tretmana;  $p < 0,05$  (ANOVA).

KO – kontrolna grupa; ECT – ekstrakt cvijeta trnina; WP – whey proteini

**Fig. 4.** GSH concentration in the tissues of the liver of the control animals and the treated groups compared to the control. Values are expressed as means±SD.

\* – differences between treatments;  $p < 0.05$  (ANOVA).

KO - control group; ECT - Flower Extract Trnina; WP - whey proteins



Oksidacijski stres je stanje promijenjene ravnoteže u oksidacijskom/antioksidacijskom statusu organizma u korist oksidacijskog stanja. Oksidacijski stres ima za posljedica nastanak oksidacijskih oštećenja proteina, lipida i DNA, što dovodi do promjene u staničnoj strukturi i funkciji, do pojave kroničnih nezaraznih bolesti poput kardiovaskularnih bolesti, degenerativnih bolesti, dijabetesa, karcinoma i raznih drugih patoloških stanja (Scalbert i sur., 2005.). Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) i Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO) kronične nezarazne bolesti su glavni uzrok prerane smrti u cijelom svijetu. Pojava nekroničnih zaraznih bolest povezuje se s neadekvatnom prehranom i nedovoljnom fizičkom aktivnošću. Namirnice biljnog porijekla bogate su biološki aktivnom tvarima, poput polifenola. Polifenoli predstavljaju najznačajnije antioksidanse s obzirom da su visoko zastupljeni u namirnicama i da imaju visoki antioksidacijski kapacitet.

Zahvaljujući cisteinu koji sadrži tiolnu skupinu, glutation je važan unutarstanični neenzimski antioksidans koji sudjeluje u prijenosu aminokiselina kroz plazmatsku membranu, izravno čisti singletni kisik i hidroksilni radikal te time detoksificira vodikov peroksid i lipidne perokside katalitičkim djelovanjem glutation peroksidaze (GPx). Glutation je obilato prisutan u citosolu (1-11 mM), jezgrama (3-15 mM) i mitohondrijima (5-11 mM) te je glavni topljivi antioksidans u staničnim odjeljcima. Unutarstanični sadržaj glutationa ovisi o čimbenicima okoliša i funkcionira kao ravnoteža između njegova iskorištenja i sinteze. Izlaganje ROS-u i/ili spojevima koji mogu stvarati ROS, može povećati sadržaj GSH povećanjem brzine sinteze GSH (Valko i sur., 2006.).

Journel i sur. su promatrali utjecaj visoko-proteinske na mozak, odnosno kako visoko-proteinska dijeta utječe na sitost. Ovi znanstvenici smatraju da konzumacijom obroka bogatog proteinima postajemo brže siti i ostajemo dulje siti, nego što je to nakon konzumacije obroka bogatog drugim makronutrijentima (ugljikohidrati i masti). Nakon konzumacije proteina, peptidni hormoni se otpuštaju iz gastrointestinalnog trakta i šalju informacije mozgu o stanju energije. Peptidni hormoni kontroliraju unos hrane djelujući na područje mozga koji je uključen u homeostazu energije. Visoko-proteinska dijeta dovodi do veće aktivacije peptidnih hormona nego što bi dovela dijeta s normalnim unosom proteina. Budući da proteini imaju važnu ulogu u nastanku sitosti, autori smatraju da dugotrajna visoko-proteinska dijeta dovodi do smanjenja unosa hrane i do smanjenja tjelesne mase kod laboratorijskih životinja (Journel i sur., 2012.).

Ho i sur. su istraživali učinak visoko-proteinske dijetete na rast stanica raka. Smatra se da stanice raka više ovise o glukozu nego normalne stanice u organizmu, stoga su autori proučavali učinak nisko-ugljikohidratne dijetete i visoko-proteinske dijetete na brzinu rasta tumora kod miševa. Otkrili su da karcinom i kod miševa i kod ljudi raste puno sporije provođenjem visoko-proteinska dijetete, nego što bi to bilo provođenjem uobičajene prehrane (Ho i sur., 2011.).

Lipopolisaharidi (LPS), poznati i kao lipoglikani su velike molekule koje se sastoje od lipida i polisaharida. Nalaze se u vanjskim membranama gram-negativnih bakterija i izazivaju snažan imunogen odgovor kod životinja tj. stimuliraju sintezu i lučenje reaktivnih kisikovih vrsta i citokina. U studiji koju su proveli Mansour i suradnici ispitivan je učinak izolata proteina sirutke na lipopolisaharidom inducirani oksidacijski stres i akutno oštećenje jetre u štakora. Nakon izlaganja štakora LPS, rezultati su pokazali veliko oštećenje jetre tj. došlo je do porasta serumskih razina jetrenih enzima - alanin aminotransferaze (ALT) i aspartat aminotransferaze (AST). Izlaganje lipopolisaharidu rezultirao je povećanjem razine MDA, markera lipidne peroksidacije i povećanjem razine nitrita u hepatocitima te smanjenjem koncentracije glutationa (GSH) u hepatocitima. Tretman

## Medicinska kemija i farmacija / *Medical Chemistry and Pharmacy*

---

proteinima sirutke, nakon oksidacijskog stresa izazvanog LPS, rezultirao je poboljšanim funkcijama jetre što pokazuje pad serumskih razina jetrenih enzima AST i ALT. Također, izolati proteina sirutke smanjili su razinu nitrita i peroksidaciju lipida te povećali koncentraciju GSH u tkivu jetre. Autori su zaključili kako proteini sirutke mogu biti korisno farmakološko sredstvo za modulaciju oštećenja nastalih oksidacijskim stresom i akutnom ozljedom jetre (Mansour i sur., 2013).

Hesham i suradnici proučavali su djelovanje proteina sirutke (100-200 mg kg<sup>-1</sup>) na štakore kojima je bila inducirana hepatotoksičnost primjenom paracetamola (500 mg kg<sup>-1</sup>) i alkohola (5 ml kg<sup>-1</sup>) tijekom dva i četiri tjedna, te su prikupljeni i analizirani tkivo jetre i plazma. Alkohol i paracetamol su povisili jetrene enzime (AST i ALT), no nakon što su štakori dobivali visoku dozu proteina sirutke došlo je do smanjenja serumskih enzima (AST i ALT) i MDA, dok su markeri oksidacijskog stresa GSH i SOD porasli. Autori su zaključili da oralna primjena proteina sirutke poboljšava induciranu hepatotoksičnost (Hesham i sur., 2014.).

U studiji koju su proveli Petzke i suradnici ispitivan je utjecaj visokog unosa proteina na povećanje oksidacijskog stresa u štakora. Životinje su bile podijeljene u 4 skupine: skupina koja je imala adekvatan unos proteina (13,8%), skupina koja je imala srednji unos proteina (25,7%), skupina koja je imala visoki unos proteina (51,3 %), te skupina koja je imala visoki unos proteina ali nije dobivala tokoferol acetat. Nakon 15 tjedana, skupinama su izmjerene koncentracije malonildialdehida (MDA), karboniliranih proteina (PC) i GSH. Koncentracija GSH u plazmi nije se značajno razlikovala između skupina, dok je jetrena koncentracija GSH bila značajno niža u skupini koja je imala adekvatan unos proteina. Povišena koncentracija karboniliranih proteina pronađena je u skupini koja je imala adekvatan unos proteina u usporedbi sa skupinom koja je imala srednji i visoki unos proteina. Dugotrajno uzimanje visoko-proteinske dijeta nije dovelo do povećanja markera oksidacijskog stresa (Ptzke i sur., 2000.).

Utjecaj izolata proteina sirutke na povećanje metabolizma energije u mozgu miša istraživali su Shertzer i suradnici. Kod miševa koji su hranjeni izolatom proteina sirutke markeri oksidacijskog stresa MDA i 4-hidroksialkeni su bili 40% niži u homogenatima mozga, a proizvodnja vodikovog peroksida i superoksida bila je 25-35% manja u mitohondrijima mozga. Ovi rezultati ukazuju na to da se primjenom izolata proteina sirutke povećao broj ili poboljšale funkcije mitohondrija mozga. Autori zaključuju da primjena izolata proteina sirutke smanjuje oksidacijski stres i povećava mitohondrijsku aktivnost u mozgu miša. Izolati proteina sirutke kao dodaci prehrani mogu biti korisni u liječenju stanja povezanog sa oksidacijskim stresom ili smanjene mitohondrijske aktivnosti u mozgu (Shertzer i sur., 2013.).

Nardi i suradnici istraživali su i uspoređivali protuupalno i antioksidacijsko djelovanje goji bobica, borovnice i brusnice na miševima. Miševi su tretirani 10 dana s 50 i 200 mg kg<sup>-1</sup> ekstrakta. Antioksidacijsku aktivnost odredili su ispitivanjem koncentracije GSH i katalaze. U sve tri biljke zabilježena je veća količina fenolnih spojeva (uključujući i rutin). Količina GSH i CAT bila je najveća u skupini koja je dobivala goji bobice, a najniže u skupini koja je dobivala borovnice. Autori su donijeli dva zaključka: bobičasto voće ima protuupalno i antioksidacijsko djelovanje, te da goji bobice, borovnica i brusnica moduliraju upalne procese na različite načine (Nardi i sur; 2016.). Gu i suradnici su proveli studiju kako bi se procijenili učinci visoko-proteinske dijeta na ravnotežu proizvodnje slobodnih radikala i antioksidacijskog statusa u probavnim organima C57BL6 miša. Miševi su podijeljeni u dvije skupine: skupina koja je imala normalni unos proteina (20%) te druga skupina s visokim unosom proteina (60%), uz dodatak 0,06g/kg cisteina. Nakon dva

tjedna, miševima su izmjereni oksidacijski i antioksidacijski parametri u dvanaesniku, jetri i gušterači. Rezultati pokazuju kako se konzumacijom visoko-proteinske prehrane značajno povećala koncentracija MDA i superoksidnog aniona, smanjila aktivnost SOD, glutation peroksidaze i katalaze te smanjio sadržaj reduciranog glutationa (GSH). U skupini hranjenoj visoko-proteinskom dijetom uz dodatak cisteina je pojava oksidacijskog stresa ublažena. Rezultati studije pokazuju da konzumacija visoko-proteinske dijete može dovesti do promjene oksidacijsko/antioksidacijske ravnoteže i tako izazvati oksidacijski stres u probavnim organima miševa (Gu i sur., 2008).

Proteini sirutke sporedni su proizvod pri proizvodnji sira i za sada su nedovoljno iskorišteni u ljudskoj prehrani. Usljed svoje iznimne nutritivne vrijednosti (velikog udjela esencijalnih aminokiselina, aminokiselina koje sadrže sumpor te aminokiselina razgranatog lanca) i poželjnih funkcionalnih svojstava, proteini sirutke se sve više koriste u proizvodnji različitih, tradicionalno pripremljenih proizvoda, ali i novostvorenih prehrambenih proizvoda. Kako imaju aminokiselinski sastav blizu biološkog optimuma, smatraju se nutritivno najvrjednijim proteinima stoga ne iznenađuje porast interesa i provedenih istraživanja o djelovanju proteina sirutke.

U ovom istraživanju promatrao se učinak polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine i visoko-proteinske dijete u homogenatu tkiva bubrega i jetre. Trnina je biljka s visokim antioksidacijskim kapacitetom zbog visokog sadržaja feonlnih spojeva. Whey protein (WP) korišten u ovom istraživanju je koncentrat proteina sirutke koji sadrži 82% proteina u suhoj tvari. Proteini sirutke imaju visok udio aminokiselina razgranatog lanca. Prednost Whey proteina u odnosu na druge proteine je u tome što se brzo apsorbira u crijevima. Antioksidacijsko djelovanje WP bazirano je na visokom sadržaju i bioiskoristljivosti aminokiseline cistein koja pomaže u sintezi glutationa (GSH), moćnog unutarstaničnog antioksidansa. Koncentracije GSH izražene preko aktivnosti reduciranog glutationa (GSH) u bubregu i jetri statistički su značajno povećane u svim grupama u odnosu na kontrolnu grupu životinja (slike 3 i 4), što kazuje na antioksidacijski učinak ne samo ekstrakta cvijeta trnine nego i Whey proteina.

## **Zaključci**

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je tretman s ECT statistički značajno (ANOVA,  $p < 0,05$ ) smanjio aktivnosti MDA u jetri i bubregu miša u odnosu na kontrolnu skupinu životinja što se može pripisati polifenolima prisutnim u ekstraktu cvijeta trnine, dok su ostale grupe ostale na razini kontrolne skupine. Koncentracija GSH u ispitivanim uzorcima jetre i bubrega statistički su značajno (ANOVA,  $p < 0,05$ ) povećane u svim grupama miševa u odnosu na kontrolnu grupu, što kazuje na antioksidacijski učinak bioaktivnim spojevima u ekstraktu cvijeta trnine kao i whey proteina i smanjenje oksidacijskog stresa. Promatrani promjenjivi učinci eksperimentalnih dijeta na aktivnosti enzima pokazuju da antioksidansi uključeni u obranu od ROS-a u bubregu i jetri uvelike ovise o enzimima, porijeklu oksidacijskog stresa i izvoru antioksidansa. Da bi se u potpunosti razumjele fiziološke implikacije kao odgovor na oksidacijski stres, potrebna su dublja znanja o mehanizmima koji reguliraju aktivnosti ovih enzima.

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

## Literatura

- Bukan N., Sancak B., Yavuz O., Koca C., Tutken F., Ozcelikay A.T., Altan N. (2003): Lipid peroxidation and scavening enzyme levels in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats, *Indian. J. Biochem. Biophys.* 40, 447-450.
- Burd N.A., Yang Y., Moore D.R., Tang J.E., Tarnopolsky M.A., Phillips S.M. (2012): Greater stimulation of myofibrillar protein synthesis with ingestion of whey protein isolate v. micellar casein at rest and after resistance exercise in elderly men, *Br. J. Nutr.* 108, 958–962.
- Diamanti, J., Mezzetti, B., Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J.M., Quiles, J.L., Gonzalez-Alonso, A., Ramirez-Tortosa, M.C., Grandos-Principal, S., Gonzales, A.M., Santos-Buelga, C., Battino, M. (2014): Doxorubicin-induced oxidative stress in rats is efficiently counteracted by dietary anthocyanin differently enriched strawberry, *J. Agric. Food. Chem.* 62, 3935-3943.
- Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A. (2003): Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment, *Anal. Biochem.* 312, 224–227.
- Gago-Dominguez M., Castela J.E. (2006): Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: further supportive evidence and new mechanistic insights, *Free. Radic. Biol. Med.* 40, 721-733.
- Grabacka M., Reiss K. (2008): Anticancer Properties of PPAR alpha-Effects on Cellular Metabolism and Inflammation, *PPAR Res.* 28, 1-9.
- Gu, C., Shi, Y., Le, G. (2008): Effect of dietary protein level and origin on the redox status in the digestive tract of mice, *Int. J. Mol. Sci.* 9, 464-475.
- Hesham, A.E., Ezzedin, S.E., Somaia, A.N., Mohamed, F.E., Enayat, A.O., Naglaa, A. (2014): Evaluation of the therapeutic effect of whey proteins on the hepatotoxicity induced by paracetamol and alcohol co-administration in rats, *IJPRBS.* 3, 295-314.
- Ho, V.W., Leung, K., Hsu, A., Luk, B., Lai, J., Shen, S.Y., Minchinton, A.I., Waterhouse, D., Bally, M.B., Lin, W., Nelson, B.H., Sly, L.M., Krystal, G. (2011): A low carbohydrate, high protein diet slows tumor growth and prevents cancer initiation, *Cancer. Res.* 71(13), 4484-4493.
- Jayakumar, T., Sakthivel, M., Thomas, P.A., Geraldine, P. (2008): Pleurotus ostreatus, an oyster mushroom, decreases the oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rat kidneys, heart and brain, *Chem. Biol. Interact.* 176, 108-120.
- Journel, M., Chaumontet, C., Darcel, N., Fromentin, G., Daniel Tomé, D. (2012): Brain Responses to High-Protein Diets, *Adv. Nutr.* 3, 322–329.
- Kinsey-Jones, J.S., Alamshah, A., McGavigan, A.K., Spreckley, E., Banks, K., Monteoliva, N.C., Norton, M., Bewick G.A., Murphy, K.G. (2015): GPRC6A is not Required for the Effects of a High-Protein Diet on Body Weight in Mice, *Obesity.* 23, 1194–1200.
- Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr A.L. (1951) Protein measurement with the Folin– phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Mansour, D.F.S., Eldenshary, E.S., Nada, S.A., Omara, E.A., Ibrahim, M.I.M. (2013): Therapeutic effectiveness of certain whey proteins on lipopolysaccharide-induced oxidative stress and histopathological changes in rat liver, *J. Appl. Sci. Res.* 9, 4983-4992.
- Marshall K. (2004) Therapeutic applications of whey protein, *Altern. Med. Rev.* 9, 136–156.

- Mateos R., Goya L., Bravo L. (2005): Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits, *J. Chrom. B.* 827, 76–82.
- Nada, S., El-Denshary, E.S., Omara, E.A., Asaad, G.F., Abdel-Rahman, R.F. (2015): Milk whey proteins modulate endotoxemia-induced hepatotoxicity in rats, *Int. J. Pharm. Pharmac.Sci.* 7, 64-71.
- Nardi, G.M., Farias- Januario, A.G., Freire, C.G., Megiolaro, F., Schneider, K., Perazzoli, M.R., Do-Nascimento, S.R., Gon, A.C., Mariano, L.N., Wagner, G., Niero, R., Locatelli, C. (2016): Anti-inflammatory Activity of Berry Fruits in Mice Model of Inflammation is Based on Oxidative Stress Modulation, *Pharmacognosy Res.* 8, 42-49.
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2, 270-278.
- Petlevski, R., Juretić, D., Hadžija, M., Slijepčević, M., Lukač-Bajalo, J. (2006): Koncentracija malondialdehida u NOD miševa tretiranih akarbozom, *Biochem. Med.* 16, 43-49.
- Pilaczynska-Szczesniak, L., Skarpanska-Steinborn, A., Deskur, E., Basta, P., HoroszkiewiczHassan, M. (2005): The influence of chokeberry juice supplementation on the reduction of oxidative stress resulting from an incremental rowing ergometer exercise, *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 15, 48-58.
- Petzke, K.J., Elsner, A., Proll, J., Thielecke, F., Metges, C.C. (2000): Long-term high protein intake does not increase oxidative stress in rats, *J. Nutr.* 130; 2889–2896
- Santesso, N., Aki, E.A., Bianchi, M., (2012): Effects of higher- versus lower- protein diets on health outcomes: a systematic review and meta-analysis, *Eur. J. Clin. Nutr.* 66,780-788.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2005): Dietary polyphenols and the prevention of diseases, *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 45, 287–306.
- Shertzer, H.G., Krishan, M., Genter, M.B. (2013): Dietary whey protein stimulates mitochondrial activity and decreases oxidative stress in mouse female brain, *Neurosci. Lett.* 548, 159–164.
- Slatter D.A., Bolton C.H., Bailey A.J. (2000): The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus, *Diabetologia.* 43, 550-557.
- Sousa, G.T.D., Lira, F.S., Rosa, J.C., Oliveira, E.P., Oyama, L.M., Santos, R.V., Pimentel, G.D. (2012): Dietary whey protein lessens several risk factors for metabolic diseases: a review, *Lipids. Health. Dis.* 11, 1-9.
- Tiku M.L., Allison G.T., Naik K., Karry S.K. (2003): Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes, *Osteoarthritis. Cart.* 11, 159-166.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40.

*Original research paper*

## **Effect of Flavonoids from flowers of *Prunus spinosa* L. and Whey protein to oxidation/ antioxidant status in the C57BL/6 mouse**

Irena Landeka Jurčević<sup>1\*</sup>, Domagoj Đikić<sup>2</sup>, Vedran Bolta<sup>2</sup>, Ivona Paradžik<sup>1</sup>, Lea Sabljic<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology Zagreb,  
Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb, Croatia*

<sup>2</sup>*University of Zagreb, Faculty of Science Zagreb, Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia*

\*Corresponding author: [ilandeka@pbf.hr](mailto:ilandeka@pbf.hr)

### **Summary**

This study was conducted to evaluate the effects of high-protein diets and flavonoids isolated from the flowers of *Prunus spinosa* L. on various markers of oxidative stress in the liver and kidney of a mouse. Under normal physiological conditions the cell system is able to neutralize free radicals through catalytic removal of reactive oxygen species (ROS) with antioxidant enzymes. Antioxidant activity of the whey protein (WP) is based on the high content and bioavailability of the amino acid cysteine, which helps in the synthesis of glutathione (GSH), a potent intracellular antioxidant. The effect of WP and flavonoids isolated from the flower trnina (ECT) has been investigated in laboratory animals (C57BL/6 mouse) through 30 days of treatment. The animals were divided into 4 groups: group I - control group (KO); group II – flower extract trnina (ECT); group III – Whey protein (WP) and group IV - WP + ECT. The investigated biomarkers of oxidative stress in the organs were malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH). The results show that a treatment with ECT significantly reduced the activity of MDA in the organs of mice compared to the control group, while the other group remained at the level of the control group. The concentrations of reduced glutathione (GSH) in the examined organs were statistically significantly increased in all groups compared to the control group. These results indicate that the extract of a flower trnina and whey proteins may act as a nutritional ingredient to increase endogenous antioxidant enzymes and reduce oxidative stress.

*Keywords:* *Prunus spinosa* L., Whey protein, lipid peroxidation, reduced glutathione