

# Biološki učinci oleuropeina

---

Matelić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:032276>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Ivana Matelić**

**Biološki učinci oleuropeina**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Biokemija prehrane Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za kemiju prehrane pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Dubravke Vitali Čepo.

*Zahvaljujem svojoj mentorici doc. Dubravki Vitali Čepo na susretljivosti i strpljivosti tijekom izrade ovog diplomskog rada. Zahvaljujem i višoj asistentici Lovorki Vujić na brzim ispravicima, korisnim savjetima i pomoći pruženoj tijekom završne faze izrade ovog rada. Također, hvala mojim prijateljima koji su mi studentske dane učinili posebnima i na čiju sam pomoć, podršku, obzirnost i susretljivost uvijek mogla računati.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj užoj i široj obitelji, koja je uvijek vjerovala u mene, pomagala mi, podupirala me i ohrabrivala u svim studentskim i životnim izazovima.*

*I na kraju, zahvaljujem dragome Bogu što me je vodio i nosio tijekom svih ovih godina jer bez Njega danas ne bih bila ono što jesam.*

# POPIS KRATICA KORIŠTENIH U RADU

$\mu$ -OR -  $\mu$ -opioidnih receptora

3,4-DHPEA - 3',4'-dihidroksifeniletanol, odnosno hidroksitirosol

3,4-DHPEA-EA (HT-EA) - (3,4-dihidroksifeniletanol)-elenolna kiselina, odnosno monoaldehidni izomer aglikona oleuropeina (Slika 3)

3,4-DHPEA-EDA (HT-EDA) - (3,4-dihidroksifeniletanol)-elenolna kiselina dialdehidnog oblika; dialdehidni oblik aglikona dekarboksimetiloleuropeina; oleacein (Slika 3)

AMPK - protein kinaza aktivirana 5' AMP-om (*eng.* 5' AMP-activated protein kinase)

CAT - katalaza

COX - ciklooksigenaza (COX-1 - konstitutivna izoforma; COX-2 - inducibilna izoforma)

CVD - kardiovaskularne bolesti (*eng.* Cardiovascular Diseases)

DM - diabetes mellitus, odnosno šećerna bolest

DMT1/2 - diabetes mellitus tipa 1/2

EPC - endotelne prekursorske stanice (*eng.* Endothelial Progenitor Cells)

ERK-1/2 - kinaza regulirana ekstracelularnim signalom (*eng.* Extracellular-signal-regulated kinases)

EVOO - ekstra djevičansko maslinovo ulje (*eng.* Extra Virgin Olive Oil)

FFA - slobodne masne kiseline (*eng.* Free Fatty Acid)

GIT - gastrointestinalni trakt

GLUT - transporteri glukoze

GPx - glutation peroksidaza

GRx - glutation reduktaza

GSH - glutation

GUK - koncentracija glukoze u krvi

HbA1c - glikozilirani hemoglobin

HDL - lipoprotein visoke gustoće (*eng.* High-density lipoprotein)

HO-1 - hem-oksidaza 1

HOCl - hipoklorasta kiselina

HSA - humani serumski albumin

HSC - stanice jetre uključene u fibrinogenezu (*eng.* Hepatic Stellate Cell)

HT - hidroksitirosol, odnosno 3,4-DHPEA

I<sub>Ca,L</sub> - kalcijevi ionski kanali L-tipa

IL - interleukin

LDL - lipoprotein niske gustoće (*eng.* Low-density lipoprotein)

LPS - bakterijski lipopolisaharid

LT - leukotrien

MAPK - protein-kinaze aktivirane mitogenom (*eng.* Mitogen-Activated Protein Kinase)

MMP - matriksna metaloproteinaza

MPO - mijeloperoksidaza

MSC stanice - mezenhimalne matične stanice (*eng.* Mesenchymal Stem Cells)

MUFA - mononezasićena masna kiselina (*eng.* Monounsaturated Fatty Acid)

NF- $\kappa$ B - nuklearni čimbenik  $\kappa$ B (*eng.* Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NO - dušikov (II) oksid

NOS - dušik (II) oksida sintaza (*e*NOS - endotelna izoforma, *i*NOS - inducibilna izoforma)

OLE - ekstrakt maslinovog lista (*eng.* Olive Leaf Extract)

ONOO<sup>-</sup> - peroksinitrit

PBMC - humane periferne krvne mononuklearne stanice

PG - prostaglandin

PMN neutrofili - polimorfonuklearni neutrofili

PMN neutrofili - polimorfonuklearni neutrofili

PUFA - polinezasićena masna kiselina (*eng.* Polyunsaturated Fatty Acid)

RONS - kemijski reaktivni spojevi kisika i dušika (*eng.* Reactive Oxygen and Nitrogen Species)

ROS - kemijski reaktivni spojevi kisika (*eng.* Reactive Oxygen Species)

SMC - stanice glatkih mišića (*eng.* Smooth Muscle Cell)

SOD - superoksid dismutaza

TG - trigliceridi

TNF- $\alpha$  - faktor nekroze tumora (*eng.* Tumor necrosis factor -  $\alpha$ )

TX - tromboksan

UCP-1 - termogenin (*eng.* Uncoupling Protein-1)

VOO - djevičansko maslinovo ulje (*eng.* Virgin Olive Oil)

# SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. MASLINOVO ULJE	3
1.1.1. Sastav maslinovog ulja	4
1.1.2. Fenolni spojevi u maslinovom ulju	4
1.2. OLEUROPEIN (KEMIJSKA STRUKTURA I SVOJSTVA)	5
1.3. UDIO OLEUROPEINA I OSTALIH FENOLNIH SPOJEVA	8
1.3.1. Prirodni tijek promjene količine oleuropeina	8
1.3.2. Utjecaj postupaka prerade plodova masline i skladištenja dobivenog ulja na udio oleuropeina (i drugih fenolnih spojeva)	9
1.3.3. Koncentracije oleuropeina i ostalih fenolnih spojeva u maslinovom ulju	8
1.3.3.1. Procjena unosa fenolnih spojeva iz maslinovog ulja	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	14
3. MATERIJALI I METODE	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1. BIORASPOLOŽIVOST I METABOLIZAM OLEUROPEINA I NJEGOVIH DERIVATA	16
4.1.1. Stabilnost oleuropeina i njegovih derivata u uvjetima probavnog trakta	16
4.1.2. Apsorpcija i distribucija	19
4.1.2.1. Mehanizam apsorpcije	21
4.1.3. Metabolizam i eliminacija	21
4.2. BIOLOŠKI UČINCI OLEUROPEINA	23
4.2.1. Antioksidativni učinci	24
4.2.1.1. Mehanizmi antioksidativnog djelovanja oleuropeina	25
4.2.1.2. Inhibicija lipidne peroksidacije i oksidacije proteina	29
4.2.2. Protuupalni učinci	31
4.2.2.1. Inhibicija signalnih putova, medijatora upale i enzima odgovornih za njihovo nastajanje	33
4.2.2.2. Ostali mehanizmi protuupalnog djelovanja oleuropeina	35
4.2.3. Kardioprotektivni učinci	36
4.2.3.1. Antihipertenzivni učinci	37
4.2.3.2. Učinci oleuropeina na lipidni sustav	38

4.2.3.3. Antiaterogeni učinci _____	40
4.2.3.4. Ostali kardioprotektivni učinci _____	43
4.2.4. Antidijabetički i protektivni učinci na metabolizam _____	44
4.2.5. Antikancerogeni učinci _____	46
4.2.6. Neuroprotektivni učinci _____	48
4.2.7. Antiinfektivni učinci _____	50
4.2.7.1. Antibakterijski učinci _____	51
4.2.7.2. Antiviralni učinci _____	50
4.2.7.3. Ostali antiinfektivni učinci _____	53
4.2.8. Gastroprotektivni i hepatoprotektivni učinci _____	54
4.2.9. Osteoprotektivni učinci _____	55
4.2.10. Učinci na kožu _____	55
4.3. TERMIČKA OBRADA _____	56
5. ZAKLJUČAK _____	57
6. LITERATURA _____	58
7. SAŽETAK/SUMMARY _____	67
7.1. SAŽETAK _____	67
7.2. SUMMARY _____	676

# 1. UVOD

Epidemiološke studije pokazale su nižu učestalost kardiovaskularnih bolesti, ponajprije ateroskleroze, upalnih bolesti te određenih tipova karcinoma (poput karcinoma dojke i kolona) u području Mediterana. Navedeno se u velikoj mjeri pripisuje mediteranskoj prehrani koja se od ostalih u Europi razlikuje po maslinovom ulju kao glavnom izvoru masnoća (Visioli i sur., 2002a). Do nedavno su se ljekovita svojstva, ponajprije kardioprotektivna, (ekstra) djevičanskog maslinovog ulja pripisivala visokoj zastupljenosti mononezasićenih masnih kiselina (*eng.* Monounsaturated Fatty Acids; MUFA). Međutim, u posljednje vrijeme se sve više istražuju neke druge sastavnice maslinovog ulja, poput polifenolnih spojeva, s obzirom da neka druga ulja bogata MUFA-ma nemaju ljekovita svojstva koja ima djevičansko maslinovo ulje (Bulotta i sur., 2013).

## 1.1. MASLINOVO ULJE

Ekstra djevičansko maslinovo ulje (*eng.* Extra Virgin Olive Oil; EVOO) povezuje se sa smanjenom učestalošću pojavljivanja koronarnih bolesti u populaciji Mediterana; djelomično zbog visoke zastupljenosti MUFA, a djelomično i zbog prisutnosti fenolnih spojeva koji imaju obrambeno djelovanje na organizam (Masella i sur, 2001).

Maslinovo ulje (Slika 2) dobiva se iz plodova masline (*Olea europaea* L., *Oleaceae*; Slika 1) različitim fizikalnim (i kemijskim) postupcima, a ovisno o uvjetima i načinu proizvodnje uvelike ovisi njegov sastav i kvaliteta. Najkvalitetnije je EVOO koje se dobiva iz sirovih plodova masline mehaničkim postupcima u termičkim uvjetima koji ne uzrokuju kemijske promjene sastavnica ulja, odnosno ne utječu na kvalitetu i stabilnost dobivenog ulja. Na taj se način većina lipofilnih spojeva prenese iz plodova masline u ulje zbog čega ulje zadržava organoleptička svojstva maslina. Još važnije, takvim postupkom je minimalizirana aktivacija staničnih peroksidaza i degradacija triglicerida te je očuvan visoki udio fenolnih spojeva. Dalje po kvaliteti slijede djevičansko maslinovo ulje (VOO), obično maslinovo ulje i rafinirano maslinovo ulje koji imaju jednaki udio ukupnih masnih kiselina kao i EVOO, ali svaki od njih ima manji udio fenolnih spojeva od prethodno navedenog (Quiles i sur., 2006).





Slika 1. Stablo i plod masline  
(*Olea europaea* L., *Oleaceae*)



Slika 2. Maslinovo ulje

### 1.1.1. Sastav maslinovog ulja

Maslinovo ulje se sastoji od osapunjive frakcije (trigliceridi i slobodne masne kiseline), koja čini više od 98%, i neosapunjive frakcije, koja čini do 2% ukupne težine maslinovog ulja. Neosapunjivu frakciju čini više od 230 kemijskih spojeva poput neglicerolnih estera masnih kiselina, alifatskih i triterpenskih alkohola, sterola, skvalena, tokoferola, karotenoida i pigmenata (odgovornih za prepoznatljivu boju maslinovog ulja) te fenolnih spojeva, odgovornih za karakterističan opor okus maslinovog ulja (ovo svojstvo pripisuje se prvenstveno oleuropeinu). Zbog svojih karakteristika ti su spojevi gotovo isključivo prisutni samo u djevičanskom maslinovom ulju jer se njihova količina drastično smanjuje daljnjim procesuiranjem ulja, pogotovo rafiniranjem (Quiles i sur., 2006). Za veću stabilnost (E)VOO-a u odnosu na druga biljna masna ulja odgovorni su: (1) visoki udio MUFA, otpornijih na lipidnu peroksidaciju, i (2) fenolni spojevi poput karotenoida, tokoferola i sekoiridoida zbog svojih antioksidativnih svojstava (Owen i sur., 2000; Tripoli i sur., 2005).

### 1.1.2. Fenolni spojevi u maslinovom ulju

Fenoli su spojevi koji u svojoj strukturi sadrže aromatski prsten s jednom ili više hidroksilnih skupina (Bulotta i sur., 2013). Maslinovo ulje je izvor najmanje 30 fenolnih spojeva s jednom ili dvije hidroksilne skupine koji mogu biti lipofilnog ili hidrofilnog karaktera (Quiles i sur., 2006). Najvažniji fenolni spojevi lipidnog karaktera u maslinovom ulju su tokoferoli koji su poznati po svojoj antioksidativnoj učinkovitosti i sinergističkoj ulozi s fenolima u sprječavanju autooksidacije maslinovog ulja (Corona i sur., 2006). Hidrofilne

fenolne spojeve, od kojih su mnogi svojstveni isključivo maslinovom ulju, možemo klasificirati prema kemijskoj strukturi na jednostavne (fenolni alkoholi i kiseline te flavonoidi) i kompleksne hidrofilne fenolne spojeve (sekoiridoidi i lignani) (Quiles i sur., 2006). Najvažniji jednostavni hidrofilni fenolni spojevi prisutni u maslinovom ulju su hidroksitirosol (HT) i tirosol (fenolni alkoholi), dok su najvažniji kompleksni hidrofilni fenolni spojevi sekoiridoidne strukture poput glikozida oleuropeina i ligstrozida, njihovih aglikonskih oblika i dialdehidnih oblika tih aglikona (Corona i sur., 2006). Od svih spomenutim sastavnicama oleuropein i njegovi derivati smatraju se molekulama najvažnijeg biološkog i farmakološkog značenja, zbog čega su najviše istraživane antioksidativne komponente maslinovog ulja (Bulotta i sur., 2013).

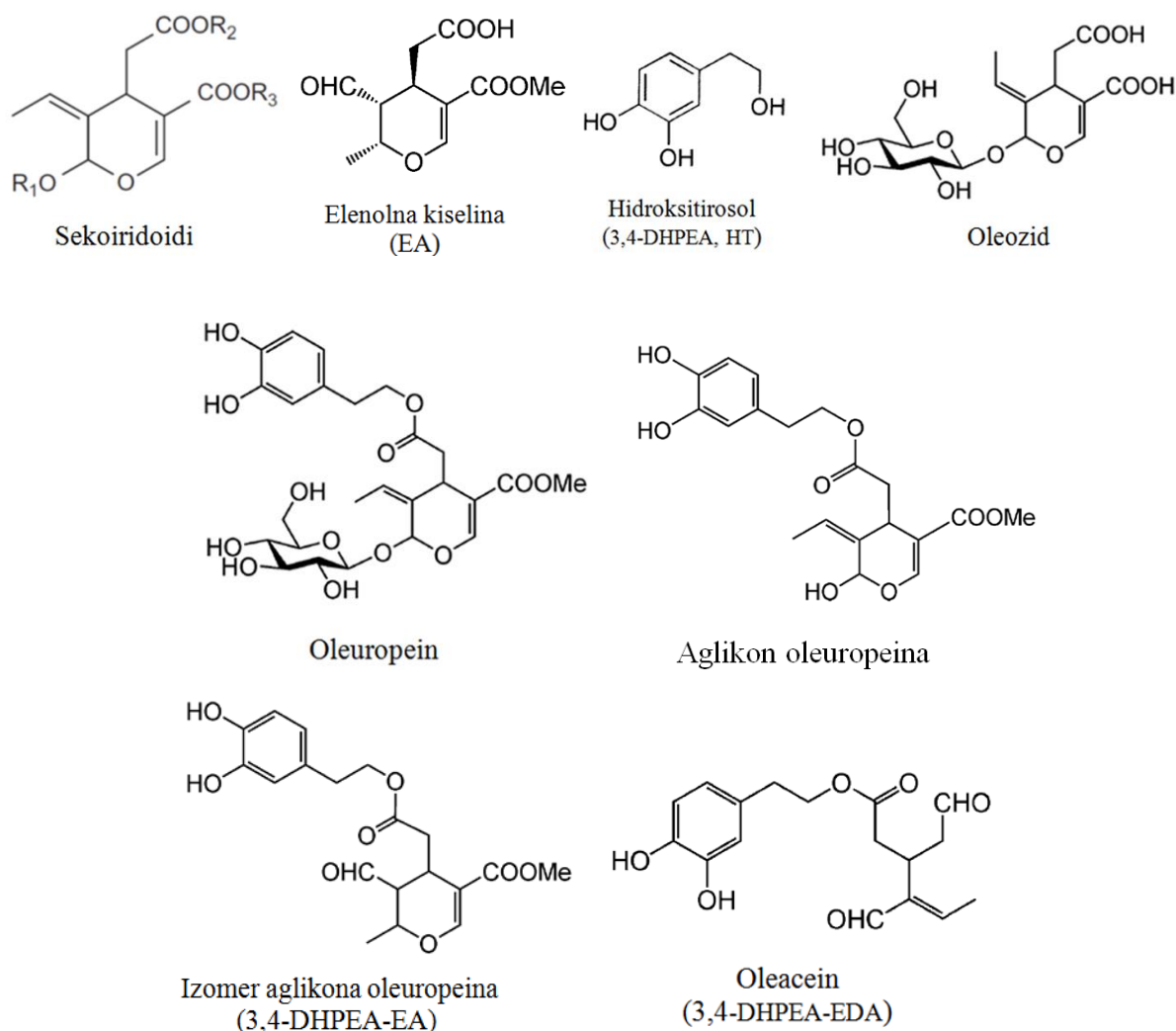
## 1.2. OLEUROPEIN (KEMIJSKA STRUKTURA I SVOJSTVA)

Oleuropein je kompleksni hidrofilni fenolni spoj sekoiridoidne strukture odgovoran za zaštitu masline od štetocina i za karakterističan opor okus EVOO-a (Quiles i sur., 2006). Sekoiridoidi su glikozidni spojevi slični kumarinima koji nastaju kao produkti sekundarnog metabolizma terpena, a karakterizirani su prisutnošću elenolne kiseline u aglikonskom dijelu molekule (Tripoli i sur., 2005). Za razliku od tokoferola, fenolnih alkohola i kiselina te flavonoida koji su prisutni u mnogim biljkama, sekoiridoidi su prisutni samo u porodicama *Oleaceae*, *Gentianaceae* i *Cornaceae* dok je oleuropein karakterističan isključivo za porodicu *Oleaceae* kojoj pripada i maslina (Bulotta i sur., 2013).

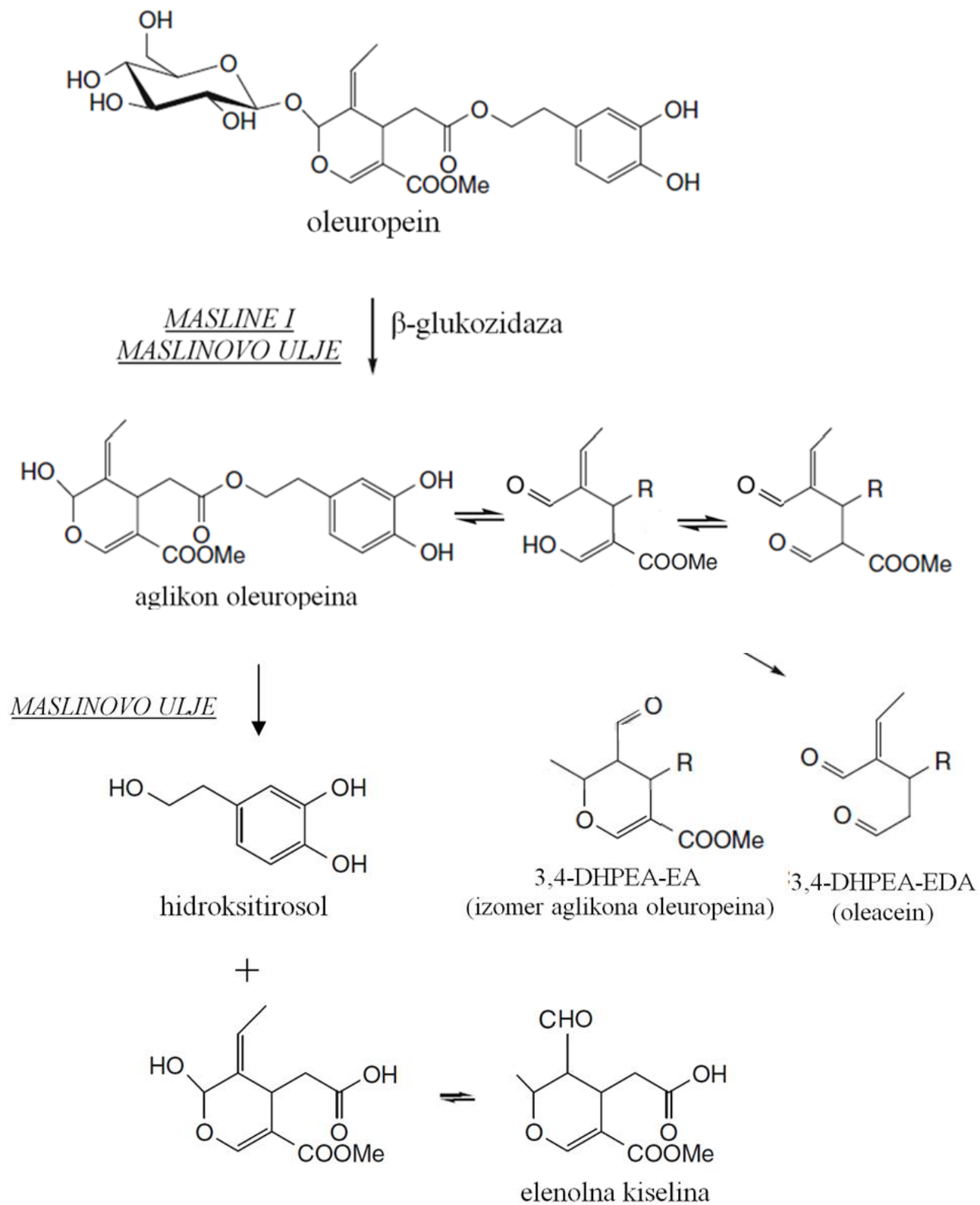
Oleuropein je hidrofilni ( $\log P \sim 0.2$ ), polarni spoj ( $\log D = 0.196$ ) relativno velike molekulske mase (540.5 Da) (Edgecombe i sur., 2000). Po kemijskoj strukturi oleuropein je ester oleozidnog kostura i hidroksitirosola (Tripoli i sur., 2005). Oleozidni kostur, odnosno glukozid elenolne kiseline ( $\beta$ -D-glukoza povezana s elenolnom kiselinom preko hidroksilne skupine na C1 atomu; Slika 3), karakterističan je za porodicu *Oleaceae* (Tripoli i sur., 2005). Oleuropein se u plodovima masline i djevičanskom maslinovom ulju može nalaziti i u glukozidnom i u aglikonskom obliku (Tripoli i sur., 2005).

Tijekom rasta i sazrijevanja plodova masline oleuropein podliježe reakcijama kemijske i enzimatske hidrolize endogenim esterazama i  $\beta$ -glukozidama što se nastavlja i tijekom procesa prerade zbog čega je mnogo zastupljeniji u plodovima i listovima masline nego u maslinovom ulju (Bulotta i sur., 2013). Hidrolizom oleuropeina nastaju molekula glukoze i aglikon oleuropeina (neugljikohidratni dio molekule) ili njegovi derivati koji se većinom razlikuju u strukturi prstena. Prsten može biti zatvorenog tipa u fenolnom ili monoaldehidnom

obliku ili otvorenog tipa u dialdehidnom obliku, a svi spomenuti derivati nastaju keto-enolnom tautomerijom prvobitno nastalog aglikona oleuropeina (Slika 3) (Visioli i sur., 2002a). HT je krajnji produkt hidrolize (aglikona) oleuropeina u maslinama i u maslinovom ulju (Vissers i sur., 2004). Derivati oleuropeina i njegovog aglikona [HT, monoaldehidni izomer aglikona oleuropeina (3,4-DHPEA-EA) i dialdehidni oblik aglikona dekarboksimetiloleuropeina, nazvan još i oleacein (3,4-DHPEA-EDA)] u maslinovom ulju se nalaze u višim koncentracijama u odnosu na oleuropein te također imaju protektivne učinke na organizam čovjeka (Bulotta i sur., 2013). Smatra se da se koncentracija sekoiridoida snižava tijekom pohrane djevičanskog maslinovog ulja zbog njihove hidrolize na HT (čija koncentracija istovremeno raste) (Romani i sur., 2007).



Slika 3. Kemijske strukture i nazivi fenolnih spojeva (i derivata oleuropeina) u maslinovom ulju (prilagođeno iz reference Obied i sur., 2008)



Slika 4. Pretpostavljeni put razgradnje oleuropeina (prilagođeno iz referenci Bulotta i sur., 2013; Vissers i sur., 2004)

### 1.3. UDIO OLEUROPEINA I OSTALIH FENOLNIH SPOJEVA U MASLINOVOM ULJU

Udio fenolnih spojeva u maslinovom ulju, pogotovo sekoiridoida, uvelike ovisi o agronomskim faktorima uzgoja poput sorte masline, mjestu uzgoja, klimi, navodnjavanju tj. dostupnosti vode, štetočinama koje napadaju plodove masline (muha masline *Bactrocera oleae*) i stupnju zrelosti masline u trenutku berbe. Također ovisi i o uvjetima pohrane ubranih plodova, postupcima i uvjetima tijekom te uvjetima pohrane gotovog maslinovog ulja (Quiles i sur., 2006).

#### 1.3.1. Prirodni tijek promjene količine oleuropeina

U razvoju ploda masline, razlikuju se tri faze: (1) faza rasta, tijekom koje se javlja obilna pohrana oleuropeina; (2) faza zelenog sazrijevanja u kojoj dolazi do smanjenja klorofila i oleuropeina te (3) faza crnog sazrijevanja koja je karakterizirana pojavom antocijana i nastavkom pada udjela oleuropeina (Bulotta i sur., 2013). Količina oleuropeina u mladim, nezrelim maslinama može dosegnuti i do 14% (140 mg/g) suhe tvari (Bulotta i sur., 2013). Međutim, sazrijevanjem plodova masline smanjuje se količina oleuropeina zbog reakcije hidrolize kojom nastaju fenolne spojevi manje molekularne mase, ali se smanjuje i ukupna količina fenolnih spojeva i  $\alpha$ -tokoferola (Tripoli i sur., 2005). Unatoč spomenutom smanjenju, količina preostalog oleuropeina je i dalje značajna u zelenim sortama maslina. U crnim sortama je količina oleuropeina znatno manja nego u zelenim sortama dok u nekim varijetetima crnih maslina može u potpunosti nestati. Demetileuropein, derivat oleuropeina koji nastaje hidrolizom druge esterske veze oleuropeina, zastupljen je u gotovo ekvivalentnoj količini u plodovima crnih sorata (Bulotta i sur., 2013).

Jedan od razloga smanjenja udjela oleuropeina u plodovima maslina tijekom sazrijevanja jest i njegova glavna, zaštitna uloga od štetočina. Posjeduje karakteristična antioksidativna i antimikrobna svojstva te se aktivira kao obrambeni sustav od biljojeda i insekata koji napadaju plod. S obzirom da su  $\beta$ -glukozidaze i oleuropein smješteni u različitim staničnim odjeljcima, jedino mehaničko oštećenje koje uzrokuju štetočine ili prerada plodova, mogu uzrokovati reakcije modifikacije oleuropeina. Njihovim izravnim stupanjem u kontakt dolazi do reakcija hidrolize oleuropeina i posljedičnih oksidativnih promjena dobivenih produkata hidrolize kojima nastaju visoko reaktivne, za štetočine toksične molekule (npr. derivati poput aldehidnih molekula i hidroksitirozol; Slika 4) smještene u intracelularnim kapljicama ulja koje djeluju kao fitoaleksini (tzv. biljni antibiotici). Postoji hipoteza da nastali

derivati oleuropeina inhibiraju razvoj i širenje larvi insekata umrežavanjem proteina te na taj način smanjuju nutritivnu kvalitetu tkiva masline i uzrokuju smrt larvi (Spadafora i sur., 2008). S obzirom da su spomenuti derivati nastali upravo iz oleuropeina, ovaj učinak se može smatrati neizravnim učinkom oleuropeina, iako i on sam djeluje kao fitoaleksin.

### **1.3.2. Utjecaj postupaka prerade plodova masline i skladištenja dobivenog ulja na udio oleuropeina (i drugih fenolnih spojeva)**

Oksidacija je proces koji se spontano događa u dodiru sa zrakom tijekom prerade maslina i pohrane dobivenog ulja. Lipidi se oksidiraju u hidroperokside koji se potom raspadaju homolitičkim cijepanjem hidroperoksidne grupe čime nastaju nestabilni oksidirani produkti odgovorni za tipične neugodne senzorne karakteristike (Bulotta i sur., 2013).

Procesi prerade maslina zahtijevaju njihovo mehaničko oštećivanje čime se pokreću reakcije hidrolize oleuropeina i posljedične oksidacije dobivenih produkata što dovodi do brzog i velikog smanjenja količine oleuropeina (Spadafora i sur., 2008). Bitno je spomenuti da je brzina smanjivanja količine oleuropeina najveća odmah nakon oštećenja tkiva masline, a nakon nekog vremena ta brzina se smanjuje i/ili postiže plato. Ako se ovo opažanje primijeni na proces proizvodnje VOO-a, vidimo da udio oleuropeina u maslinovom ulju ovisi i o vremenu trajanja postupka dobivanja maslinovog ulja. Smanjenje količine oleuropeina dodatno potenciraju dodir sa zrakom i temperaturni uvjeti tijekom procesa prerade. Što je smjesa zdrobljenih maslina u dužem kontaktu sa zrakom i što su temperature tijekom procesa prerade više, to je progresivnost opadanja koncentracije fenolnih spojeva, pogotovo onih kompleksnije građe (npr. oleuropeina), veća. S obzirom da su fenolni spojevi hidrofilnog karaktera, njihov gubitak uvelike ovisi i o količini vode korištenoj pri procesima prerade. Tako veći dio molekula oleuropeina ostaje u vodenim otpadnim produktima koji nastaju tijekom procesa prerade maslina nego što ih se ekstrahira u ulje (Spadafora i sur., 2008).

Tijekom pohrane dobivenog ulja nastavlja se mijenjanje fenolnog sastava ulja. Glavna promjena pronađena u sastavu i količini fenolnih spojeva EVOO-a tijekom njegove pohrane na 30 °C je hidroliza sekoiridoidnih aglikona pod utjecajem endogenih enzima što uzrokuje povećanje količine slobodnog hidroksitirosola i elenolne kiseline te njihovih oksidiranih formi zbog čega dolazi do smanjenja intenziteta oporosti i gorčine, karakterističnih za svježe dobiveno EVOO (Piscopo i Poiana, 2012). U slučaju neispravne pohrane maslinovog ulja može doći i do reakcija oksidacije pod utjecajem temperature i svjetlosti (UV zračenja). Oksidacija je jedan od glavnih faktora koji uzrokuju pogoršanje kvalitete i okusa maslinovog

ulja. Stupanj oksidacije ovisi o dostupnosti kisika, utjecaju svjetlosti (UV zračenja) i temperature (Piscopo i Poiana, 2012). Tzv. oksidativna užeglost ili autooksidacija je reakcija kojom, zbog prisutnosti kisika, nastaju slobodni radikali iz nezasićenih masnih kiselina, bilo slobodnih bilo esterificiranih. Osim svjetlošću, reakcije nastajanja oksidativne užeglosti su potpomognute i toplinom i tragovima metala. Hidrolitička užeglost je promjena do koje dolazi zbog prisutnosti vode u koštunicama i katalitičkih enzima poput lipaza, peroksidaza i lipooksigenaza koji su odgovorni za više-manje selektivnu proizvodnju hidroperoksida. U svakom slučaju nastaju slobodni radikali tj. nestabilni hidroperoksidi koji se dalje raspadaju stvarajući složenu mješavinu nestabilnih spojeva poput aldehida, ketona, alkohola i estera odgovornih za pogoršanje okusa i kvalitete maslinovog ulja te smanjenje količine oleuropeina i njegovih derivata zbog antioksidativnog trošenja (Piscopo i Poiana, 2012).

Antioksidansi i fenolnog i nefenolnog karaktera (npr. tokoferol) uvelike utječu na stabilnost EVOO-a svojim sinergističkim djelovanjem što je još jedan razlog smanjenja njihove količine u maslinovom ulju tijekom vremena (Piscopo i Poiana, 2012). Osim fenola i tokoferola, omjer oleinske (MUFA) i linolne masne kiseline (polinezasićena masna kiselina; PUFA) je također povezan s oksidativnom stabilnošću EVOO-a jer su MUFA-e mnogo otpornije na proces oksidacije zbog manjeg broja nezasićenih veza. Utvrđeno je da fenolni antioksidansi doprinose stabilnosti EVOO-a oko 51% (21% *o*-difenoli i 30% ostali fenoli), a omjer oleinske i linolne kiseline doprinosi oko 27% (Bendini i sur., 2007). S obzirom na opaženi sinergistički učinak ovih dviju kemijskih varijabli može se zaključiti da njihov kombinirani učinak doprinosi otprilike oko 78% stabilnosti EVOO-a. Osim toga, Bendini i suradnici pretpostavljaju da tokoferoli doprinose oko 9% dok se preostalih 13% doprinosi odnosi na klorofile i karotenoide. Najučinkovitiji antioksidativni fenolni spojevi su HT i njegovi oleozidni oblici, odnosno oleuropein i njegovi derivati (Piscopo i Poiana, 2012).

### **1.3.3. Koncentracije oleuropeina i ostalih fenolnih spojeva u maslinovom ulju**

Količina fenolnih spojeva u ulju je važan faktor kod procjene kvalitete ulja zbog njihovih utjecaja na oksidativnu stabilnost ulja i oporost okusa (Cioffi i sur., 2010). Univerzalni (standardni) podaci o koncentraciji ukupnih i pojedinačnih fenola u (E)VOO-u još uvijek ne postoje, između ostalog, i zbog nedostatka prikladnih i univerzalnih analitičkih metoda za određivanje količine fenola (Tripoli i sur., 2005).

Koncentracija ukupnih fenola u maslinovom ulju je veoma varijabilna i kreće se u rasponu od 50 do 800 mg/kg ulja, iako se najčešće vrijednosti utvrđenih koncentracija kreću u intervalu 100 - 350 mg/kg (prosječno oko 180 mg/kg za komercijalna maslinova ulja).

Jednako tako variraju i koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva (Vissers i sur., 2004). Primjerice, koncentracije ukupnih fenolnih frakcija (E)VOO-a analiziranih u nekim ispitivanjima spomenutima u ovome radu iznosile su 250-300 mg/kg i 238 mg/L, koncentracije oleuropeina iznosile su 120-140 mg/kg i 2 mg/L, aglikona oleuropeina 19-25 mg/kg ulja i 18 mg/L, a hidroksitirosola 37-410 mg/kg ulja i 1,62 mg/L (Cioffi i sur., 2010; Coni i sur., 2000). Nadalje, Owen i suradnici su analizirali 18 različitih uzoraka djevičanskog maslinovog ulja i 5 različitih uzoraka rafiniranog maslinovog ulja dostupnih na talijanskom tržištu te utvrdili prosječni udio ukupnih fenolnih spojeva koji je iznosio 196±19 mg/kg, s tim da je udio ukupnih fenolnih spojeva bio veći u EVOO-u (232±15 mg/kg) od onog u rafiniranom maslinovom ulju (62±12 mg/kg). Prosječni udio sekoiridoida iznosio je 27 mg/kg ulja, a hidroksitirosola 14.4 mg/kg (Owen i sur., 2000). Koliko udio pojedinih fenolnih spojeva može varirati između ulja različitih sorti, vidljivo je u tablici (Tablica 1.) gdje su navedeni udjeli pojedinih fenolnih spojeva u 5 različitih VOO-a dobivenih od najčešće zastupljenih mediteranskih varijeteta maslina (Romero i sur., 2007). Iz rezultata ispitivanja vidljivo je da su različiti oblici sekoiridoidnih aglikona najzastupljeniji spojevi u ispitivanim uljima. S druge pak strane, postoje istraživanja koja su utvrdila potpunu odsutnost oleuropeina u ispitivanim uzorcima maslinovih ulja (Czerwińska i sur., 2011). Czerwińska i suradnici tvrde da je oleacin, derivat aglikona oleuropeina, dominantan polifenol u maslinovom ulju, navodeći da se prosječne vrijednosti njegove zastupljenosti kreću od 111-285 mg/kg ulja, negdje čak i do 780 mg/kg (Czerwińska i sur., 2011).

Iako udio hidrofilnih polifenola u maslinovom ulju veoma varira, sekoiridoidi i lignani su najzastupljeniji fenoli u VOO-u te mogu činiti 50-70% udjela ukupnih fenola (Cioffi i sur., 2010; Quiles i sur., 2006). Dapače, smatra se da aglikonski oblici oleuropeina čine i do 55% ukupne fenolne frakcije EVOO-a (Pinto i sur., 2011).

<i>Polifenol</i>	<b>Varijeteti maslinovog ulja</b>				
	<i>Manzanilla</i>	<i>Picual</i>	<i>Arbequina</i>	<i>Hojiblanca</i>	<i>Cornicabra</i>
Hidroksitirosol (HT)	479.6	176.8	179.6	159.2	164.1
3,4-DHPEA-EA (HT-EA), izomer aglikona oleuropeina	535.8	622.7	85.0	454.2	778.6
3,4-DHPEA-EDA (HT-EDA), derivat aglikona oleuropeina	740.5	923.4	559.4	296.2	1332.7

Tablica 1. Udio ( $\mu\text{mol/kg}$ ) pojedinih fenola u različitim varijetetima maslinovog ulja (prilagođeno iz reference (Romero i sur., 2007)).



S obzirom da se konzumacija ulja u prosjeku događa unutar jedne godine od trenutka proizvodnje (preporuča se unutar 18 mjeseci), vrijednosti izmjenjenih koncentracija ukupnih i pojedinačnih fenolnih spojeva nisu jednake odmah nakon proizvodnje EVOO-a i nakon 18 mjeseci pohrane. U jednom istraživanju ispitivana su dva uzorka EVOO-a iste sorte maslina pod uvjetima koji, koliko je to moguće, minimaliziraju gubitke tijekom prerade (Romani i sur., 2007). Ulja različite kvalitete (ispitivani uzorci dobiveni su miješanjem ulja dobivenih iz maslina ubranih i procesuiranih u različitim vremenima zbog čega su se ispitivani uzorci razlikovali u organoleptičkim svojstvima), u bocama nepropusnima za UV zračenje, bila su pohranjena na temperaturi od 18 °C. Analizirana su odmah na početku, tijekom istraživanja i na kraju (18 mjeseci od trenutka proizvodnje). Nakon 18 mjeseci gubitak ukupnih fenolnih spojeva iznosio je 22%-48% u odnosu na početnu količinu. Što se tiče količine pojedinačnih fenolnih sastavnica, najviše se smanjila količina aglikona oleuropeina i njegovih derivata. Njihovi udjeli su nakon 18 mjeseci bili dvostruko niži od početnih, dok je količina hidroksitirosola porasla 5-6 puta. Utvrđeno je da je količina hidroksitirosola tijekom prvih 12 mjeseci bila gotovo konstantna, a veliki skok u porastu zamijećen je u vremenskom periodu između 12 i 18 mjeseci (Romani i sur., 2007).

Iako nije moguće odrediti standardne količine ukupnih i pojedinačnih fenolnih spojeva u maslinovom ulju zbog njihove prirodne varijabilnosti, uvjeta tijekom proizvodnje, velike ovisnosti o starosti maslinovog ulja i uvjetima pohrane, utvrđeno je da jednostavniji fenoli čine veći dio fenolne frakcije u pohranjenim uljima dok svježija ulja sadrže u većem dijelu složenije oblike, poput sekoiridoindnih aglikona (Quiles i sur., 2006).

### ***1.3.3.1. Procjena unosa fenolnih spojeva iz maslinovog ulja***

Unos maslinovog ulja u zemljama Mediterana procjenjen je na 30-50 g/dan, temeljeno na potrošnji 10-20 kg maslinovog ulja po osobi u godini dana u Grčkoj, Italiji i Španjolskoj. Dnevni unos od 50 g maslinovog ulja s procjenjenim udjelom ukupnih fenolnih spojeva od 180 mg/kg rezultirao bi s prosječnim unosom oko 9 mg fenolnih spojeva maslinovog ulja po danu (Vissers i sur., 2004).

Jedan od načina kako bismo mogli dobiti bolji uvid u potencijal antioksidativnih fenola jest izraziti unos u molovima radije nego u miligramima jer antioksidativna aktivnost ovisi o broju hidroksilnih grupa u kemijskoj strukturi antioksidansa. Na temelju procjene da u prosjeku 10% fenolnih spojeva potječe od hidroksitirosola, a 90% od aglikona sekoiridoinda i njihovih derivata (istraživanje provedeno na 6 uzoraka grčkog maslinovog ulja), procjenjuje

se da 1 mg (6 mmol) fenolnih spojeva potječe od hidroksitirosola, a 8 mg (23 mmol) od aglikona sekoiridoida i njihovih derivata. Tada bi dnevni unos ukupnih fenolnih spojeva iz maslinovog ulja iznosio oko 29 mmol. Međutim, ove procjene ne predstavljaju unos ukupne količine učinkovitih fenola iz maslinovog ulja jer se dio fenola u maslinovom ulju se odnosi na aglikon ligstrozida i tirosol koji su monofenoli bez antioksidativne aktivnosti. U ispitanim uzorcima grčkog maslinovog ulja postotak difenola iznosio je 44 mol%. Dakle, dnevni unos fenola s antioksidativnim učinkom iznosi otprilike  $0.44 \cdot 29 = 13 \mu\text{mol}$  što je ekvivalentno 2 mg hidroksitirosola dnevno. Ako uzmemo ispitano grčko maslinovo ulje kao reprezentativan uzorak maslinovog ulja za mediteransko područje, tada se dnevni unos fenolnih antioksidansa iz maslinovog ulja može procijeniti na 2 mg ekvivalenata hidroksitirosola po danu (Vissers i sur., 2004), od čega oleuropein čini otprilike 0.45 - 0.75 mg (Abe i sur., 2011).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Mediterranska prehrana se povezuje s dugovječnošću i niskom pojavnošću kroničnih i degenerativnih bolesti u populaciji Mediterana u odnosu na ostatak Europe. Smatra se da (ekstra) djevičansko maslinovo ulje, kao glavni izvor masnoća u mediteranskoj prehrani, najviše doprinosi spomenutim opažanjima. Donedavno su se ljekoviti učinci maslinovog ulja pripisivali isključivo visokoj zastupljenosti mononezasićenih masnih kiselina, ponajviše oleinskoj masnoj kiselini koja čini 70-80% masnih kiselina u ulju. Međutim, s obzirom da neka druga biljna ulja bogata mononezasićenim masnim kiselinama (npr. sojino ulje, suncokretovo ulje i ulje uljane repice) nisu dokazala učinke slične maslinovom ulju, pažnja se posljednjih godina usmjerila na manje zastupljene sastojke, poput polifenola, čiji su protektivni učinci na zdravlje čovjeka, pogotovo na kardiovaskularne i metaboličke poremećaje, utvrđeni/potvrđeni brojnim predkliničkim ispitivanjima.

Oleuropein je jedna od najispitivanijih polifenolnih spojeva iz maslinovog ulja zbog njegovog snažnog antioksidativnog djelovanja i uloge glavnog antioksidansa u obrani biljke od napada raznih štetoina. Stoga je svrha ovoga rada dati pregled najnovijih saznanja o sudbini oleuropeina u organizmu čovjeka, njegovim potencijalnim terapijskim i preventivnim učincima te mehanizmima na kojima se oni temelje.

### **3. MATERIJALI I METODE**

U izradi ovog teorijskog diplomskog rada korišteni su različiti preglednici znanstvene literature kao što su baze podataka (PubMed, PubFacts, Science Direct), društvena mreža Research Gate, znanstvene i stručne knjige te mrežne stranice sa srodnom tematikom. Više od 90% ovog diplomskog rada temeljeno je na radovima objavljenima u znanstvenim časopisima. Metode rada bile su uglavnom pretraživanje uz pomoć ključnih riječi vezanih za određeno potpoglavlje ovog diplomskog rada.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. BIORASPOLOŽIVOST I METABOLIZAM OLEUROPEINA I NJEGOVIH DERIVATA

#### 4.1.1. Stabilnost oleuropeina i njegovih derivata u uvjetima probavnog trakta

Podaci o stabilnosti oleuropeina i njegovih derivata u uvjetima želučanog i intestinalnog okoliša nisu u potpunosti dosljedni.

U najnovijem ispitivanju stabilnosti oleuropeina ispitivale su se karakteristike oleuropeina *ex vivo* (u želučanim i intestinalnim sadržajima u stanjima sitosti i gladi prikupljenima iz čovjeka) i *in vitro* (u simuliranim želučanim i intestinalnim uvjetima u stanjima sitosti i gladi) nakon njegove peroralne primjene (Markopoulos i sur., 2009). Rezultati *ex vivo* ispitivanja pokazali su da se oleuropein razgradio i u želučanim ( $2.0 < \text{pH} < 2.3$ ) i intestinalnim ( $\text{pH} 7.1$ ) aspiratima u stanju gladi. U intestinalnim aspiratima u stanju sitosti ( $5.1 < \text{pH} < 6.3$ ) oleuropein se razgradio u mnogo manjoj mjeri, dok se u želučanim aspiratima u stanju sitosti oleuropein pokazao stabilnim ( $3.0 < \text{pH} < 6.5$ ). Prema dobivenim rezultatima, čini se da je jedino u želučanim uvjetima u stanju gladi pH vrijednost medija jedan od važnih faktora koji doprinosi razgradnji oleuropeina. U intestinalnim uvjetima u stanjima gladi i sitosti pH vrijednost se pokazala manje važna za razgradnju oleuropeina. Osim pH vrijednosti, čini se da u intestinalnim uvjetima na razgradnju oleuropeina ne utječu ni prisutne žučne soli ni fosfolipidi. Zanimljivo je da je u *in vitro* simuliranim intestinalnim uvjetima u stanju sitosti oleuropein podlegao razgradnji, dok je u mediju istog sastava, samo uz dodatak citrata kao puferskog sustava, oleuropein ostao stabilan. Autori smatraju da je najvjerojatniji razlog tome interakcija citrata (antioksidans) i oleuropeina čime se poboljšala njegova stabilnost. Na temelju navedenog, autori smatraju da bi važan faktor koji utječe na stabilnost oleuropeina, osim pH vrijednosti medija, mogla biti i prisutnost drugih spojeva u mediju, pogotovo antioksidansa. Bilo bi poželjno provesti istraživanja ovog tipa u fiziološkom puferskom sustavu, ali se u tankom crijevu u stanju sitosti dominantni puferski sustavi razlikuju ovisno o tipu i količini unesene hrane (drugim riječima, nije moguće definirati univerzalni puferski sastav u spomenutim uvjetima). Dakle, prema autorima bi razgradnja oleuropeina tijekom boravka u želucu bi trebala biti minimalna jer je su stanju gladi gastrično pražnjenje brzo (što znači da oleuropein ne bi trebao mnogo vremena provesti u želučanim uvjetima), a u stanju sitosti (u „punom želucu“) se oleuropein pokazao stabilnim, odnosno otpornim na spomenute želučane uvjete. Međutim, s obzirom da vrijeme prolaska kroz tanko

crijevo iznosi otprilike 3h (neovisno o doziranju) te da je oleuropein supstanca slabe permeabilnosti, otprilike polovica oralno unesene doze oleuropeina će se razgraditi tijekom boravka u tankom crijevu u stanju gladi. Suprotno tome, procijenjeno poluvrijeme razgradnje u prikupljenim aspiratima iz tankog crijeva u stanju sitosti ne pokazuje veliku osjetljivost na intraluminalnu stabilnost. Stoga, dosad objavljeni suprotni podaci o sposobnosti iskazivanja bioloških djelovanja oleuropeina u ljudskom organizmu nakon peroralne primjene u stanju sitosti (tj. nakon primjene maslinovog ulja) bi se primarno trebali pripisati maloj zastupljenosti istog u maslinovom ulju, a sekundarno njegovom problematičnom pristizanju u intestinalnu mukozu (Markopoulos i sur., 2009).

Spomenuta opažena razgradnja oleuropeina u želučanim uvjetima u stanju gladi je u skladu s rezultatima ranije provedenog ispitivanja stabilnosti oleuropeina u *in vitro* uvjetima gdje se oleuropein, nakon četverosatne inkubacije u vodenoj otopini HCl-a pri pH 2, djelomično hidrolizirao na HT i tirozol (njihova količina je porasla 7.41, odnosno 5.15 puta) (Corona i sur., 2006).

Međutim, opažena razgradnja oleuropeina u želučanim uvjetima u stanju gladi (Markopoulos i sur., 2009) i pri niskim pH vrijednostima (Corona i sur., 2006) u suprotnosti su s rezultatima drugih ispitivanja (Vissers i sur., 2002; Gikas i sur., 2006). Vissers i suradnici su ispitivali stabilnost glukozida oleuropeina *ex vivo* u humanim želučanim i duodenalnim aspiratima prikupljenima u stanju gladi iz dvoje zdravih dobrovoljaca (oleuropein primjenjen kao dio polifenolne frakcije) te u probavnim sadržajima prikupljenima iz dvoje ileostomnih ispitanika (oleuropein primjenjen kao ekstrakt). Ileostomija je postupak kojim se kreira otvor na vanjskom dijelu tijela na koji se privremeno ili trajno spaja krajnji dio tankog crijeva (ileum) kod pacijenata koji imaju oboljenja kolona, rektuma ili anusa (<http://www.nlm.nih.gov>). Na taj otvor se pričvršćuje vrećica u koju izlazi probavni sadržaj (koji je korišten kao jedan od medija za inkubiranje). U ovom ispitivanju oleuropein se pokazao stabilnim i u želučanim i u intestinalnim aspiratima u stanju gladi, kao i u ileostomnom sadržaju. Nadalje, analizirana ileostomna tekućina sadržavala je malu količinu spoja koja odgovara oleuropeinu, ali je količina bila premala da bi se mogla pouzdano identificirati i kvantificirati. Autori pretpostavljaju da je maksimalno 25% inicijalno unesene doze oleuropeina bilo prisutno u ileostomnoj tekućini što pokazuje da je određena količina oleuropeina dospjela u intestinalni lumen nepromijenjena, tj. u svom glukozidnom obliku iz čega bi se moglo zaključiti da je oleuropein barem djelomično otporan na želučane uvjete (Vissers i sur., 2002). Markopoulos i suradnici ova neslaganja s njihovim rezultatima pripisuju neodgovarajućim postupcima prikupljanja i pripremanja ispitivanih otopina

(nedovoljan broj uzoraka, jednokratno aspiriranje, dodatna obrada uzoraka (npr. razrjeđivanje) (Markopoulos i sur., 2009).

Gikas i suradnici su ispitivali *in vitro* stabilnost oleuropeina inkubirajući oleuropein u otopinama čiste klorovodične kiseline pH vrijednosti 1 - 2 na različitim temperaturama (Gikas i sur., 2006). Njihovi rezultati su pokazali da oleuropein ne podliježe kiseloj hidrolizi u navedenom pH rasponu na tjelesnoj temperaturi (37 °C). Također su pokazali da se povećanjem kiselosti (pH ~ 0) stabilnost oleuropeina znatno smanjuje, čak i na nižim temperaturama od tjelesne. Autori su zaključili da je bi glavni put potencijalne razgradnje oleuropeina u želucu mogla biti enzimatska hidroliza, a ne kisel. Međutim, pepsin, kao glavni enzim prisutan u želučanim sokovima, nije pokazao utjecaj na stabilnost oleuropeina (Markopoulos i sur., 2009; Romero i sur., 2007). Rezultati koje su dobili Gikas i suradnici, iako su u suprotnosti s hipotezom da se oleuropein razgrađuje u želučanim uvjetima u stanju gladi (pH vrijednost otprilike 1 – 3) koju su utvrdili Markopoulos i suradnici, djelomično idu u prilog rezultatima tog istog istraživanja u onom segmentu dobivenih rezultata koji je pokazao da na razgradnju oleuropeina u intestinalnim aspiratima u stanju gladi pH vrijednost nema utjecaj (intestinalni pH se kreće u rasponu 6-8).

Dosada navedena istraživanja ispitivala su stabilnost oleuropeina u njegovom glukozidnom obliku, uspoređujući je s porastom količine hidroksitirosola i drugih očekivanih metabolita. U slučajevima gdje se dokazala razgradnja oleuropeina na takav način, može se pretpostaviti da do razgradnje (hidrolize) većinom dolazi na esterskoj vezi između hidroksitirosola i elenolne kiseline. Ono što ostaje upitno, između ostalog, jest što se događa s glukozidnom vezom i molekulom glukoze. U tom slučaju bi trebalo ispitati i stabilnost aglikonskog dijela oleuropeina i njegovih izomera, bilo da su su inicijalno bili prisutni u ulju, bilo da su nastali razgradnjom u probavnom sustavu, jer su za brojne pozitivne učinke koji se pripisuju oleuropeinu odgovorni upravo oni. Postoje dva istraživanja koja su dosada ispitivala stabilnost sekoiridoidnih aglikona (točnije, 3,4-DHPEA-EA i 3,4-DHPEA-EDA) u simuliranim želučanim uvjetima (Romero i sur., 2007; Pinto i sur., 2011). Romero i suradnici su inkubirali VOO u vodenoj otopini HCl-a pri pH 2 tijekom 0.5 i 4 sata te utvrdili kako su sekoiridoidni aglikoni ostali stabilni tijekom cijelog vremena inkubacije temeljem slabog porasta koncentracije produkata njihove hidrolize. Jednake rezultate dobili su i nakon inkubacije uz dodatak pepsina na temelju čega su zaključili da pepsin ne utječe na stabilnost sekoiridoidnih aglikona u kiselim želučanim uvjetima.

Iz svega navedenog vidljivo je da još uvijek nije moguće pouzdano i jednoznačno utvrditi stabilnost oleuropeina u probavnim sokovima čovjeka jer *in vitro* i *in vivo* rezultate

nije moguće jednoznačno uspoređivati s obzirom da se probavni sokovi čovjeka ne sastoje samo od želučane kiseline i da pH vrijednost nije jedini čimbenik koji utječe na razgradnju. Čini se da su aglikoni oleuropeina relativno stabilni u želučanom mediju te su zbog toga i veće vjerojatnosti njihove apsorpcije u krv kao takvih. Međutim, stabilnost oleuropeina u glukozidnom obliku još uvijek je diskutabilna.

#### **4.1.2. Apsorpcija i distribucija**

Izravni dokazi o bioraspoloživosti fenolnih spojeva iz maslinovog ulja dobiveni su mjerenjem koncentracija fenolnih spojeva i njihovih metabolita u biološkim tekućinama (većinom u plazmi i urinu) nakon unosa čistih sastojaka ili maslinovog ulja (izvornog ili obogaćenog pojedinim sastojcima). Na temelju dostupnih podataka utvrđeno je da nakon oralne primjene oleuropeina (ili maslinovog ulja), prije dostizanja sistemske cirkulacije, može doći do razgradnje u lumenu gastrointestinalnog trakta, tijekom transporta kroz gastrointestinalnu mukozu i metabolizma u istoj ili tijekom prvog prolaska kroz jetru (Markopoulos i sur., 2009).

Iako je oleuropein jedan od najispitivanijih fenolnih spojeva iz maslinovog ulja, informacije o njegovoj apsorpciji i metabolizmu su još uvijek ograničene i nedostatne. U istraživanju apsorpcije i metabolizma, između ostalih, i oleuropeina *in vitro* inkubacijom u kulturi stanica Caco-2 (model humanih enterocita) i *in vitro* tehnikom izolirane intestinalne *in situ* perfuzije tankog crijeva štakora (tehnika koja se koristi za ispitivanje apsorpcije i metabolizma spojeva), pokazalo se da se spojevi sekoiridoidne strukture nisu apsorbirali kroz stijenku crijeva (Corona i sur., 2006). Rezultati drugih istraživanja koja su izravno ili neizravno ispitivala apsorpciju oleuropeina u suprotnosti su s rezultatima koje su dobili Corona i suradnici. Edgcombe i suradnici ispitivali su apsorpciju oleuropeina u izosmotskim i hipotoničnim luminalnim uvjetima spomenutom tehnikom izolirane intestinalne *in situ* perfuzije i pokazali da se oleuropein, iako u maloj količini, ipak apsorbira iz lumena crijeva štakora i to konstantnom brzinom neovisnom o vremenu (Edgcombe i sur., 2000). Apsorpcija je bila veća u hipotoničnim uvjetima, ali unatoč tome slaba na temelju čega su autori klasificirali oleuropein kao slabo permeabilnu supstancu. Intestinalna bioraspoloživost oleuropeina u izotoničnim uvjetima procijenjena je na 12.4%, a u hipotoničnim uvjetima na 41.3%. No treba uzeti u obzir da te procjene ne uključuju učinak metabolizma na spojeve koji dopijaju u sistemska cirkulaciju. Drugim riječima, procjene se odnose na udio ukupne količine oleuropeina koji se apsorbirao iz lumena crijeva, ne i na oblik u kojem su apsorbirane molekule dospjele u sistemska cirkulaciju. Ovim rezultatima idu u



prilog i rezultati ispitivanja koje je pokazalo prisutnost nemodificiranog oleuropeina u niskoj koncentraciji u plazmi štakora nakon jednokratne ingestije oleuropeina u uljnom matriksu (Del Boccio i sur., 2003).

U istraživanju na ileostomnim ispitanicima, autori su pretpostavili da je maksimalno 25% inicijalno unesene doze glukozidnog oblika oleuropeina bilo prisutno u ileostomnoj tekućini ispitanika na temelju čega su autori zaključili da se ostatak unesene doze apsorbirao i/ili razgradio na produkte koji su se potencijalno apsorbirali (Vissers i sur., 2002). Osim toga, rezultati nekih istraživanja koja nisu izravno ispitivala apsorpciju oleuropeina također su pokazali da se oleuropein ipak apsorbira iz lumena gastrointestinalnog trakta (GIT). García-Villalba i suradnici zaključak o apsorpciji oleuropeina iz lumena GIT-a temelje na njegovim metabolitima pronađenima u urinu čovjeka (García-Villalba i sur., 2010). Masella i suradnici su identificirali glukozidni oblik oleuropeina i izmjerili njegovu koncentraciju u krvnoj plazmi hiperlipidemičnih pacijenata koji su bili na prehrani obogaćenom EVOO-om, a Coni i suradnici u krvnoj plazmi zečeva koji su bili na prehrani obogaćenom oleuropeinom (Masella i sur., 2001; Coni i sur., 2000). Kendall i suradnici su otkrili metabolite oleuropeina, ali ne i produkte njegove razgradnje u urinima ljudi koji su konzumirali pripravak ekstrakta lista masline (*eng.* Olive Leaf Extract; OLE) bogat oleuropeinom (>80% polifenolne frakcije čini oleuropein) na temelju čega su zaključili da postoji velika vjerojatnost da nemodificirani oleuropein dospjeva u tanko crijevo čovjeka gdje se kao takav apsorbira (Kendall i sur., 2012).

S obzirom na sve navedeno, može se zaključiti da se oleuropein apsorbira iz probavnog trakta čovjeka. Međutim, potrebno je provesti dodatna istraživanja radi detaljnijeg utvrđivanja biorasploživosti i kvantifikacije apsorpcije. Naime, ne bi bilo ispravno ekstrapolirati rezultate koje su dobili Edgecombe i suradnici (Edgecombe i sur., 2000) o slaboj permeabilnosti i biorasploživosti oleuropeina na čovjeka jer se animalni modeli štakora i čovjeka razlikuju. U jednom istraživanju ispitivana je prikladnost animalnog modela štakora i čovjeka mjerenjem izlučenog hidroksitirosola u urinu štakora i čovjeka nakon ingestije istog djevičanskog maslinovog ulja u odgovarajućim količinama (Visioli i sur., 2002a). Rezultati su pokazali da se u urinu čovjeka izlučilo 31% inicijalno unesene doze hidroksitirosola, dok se u urinu štakora izlučilo svega 5%. Ekstrapolacija rezultata dobivenih ispitivanjima na animalnom modelu štakora na čovjeka može dovesti do pogrešnih rezultata, stoga se ne smije podcijeniti vrijednost kliničkih ispitivanja na ljudima (Visioli i sur., 2002a).

Podaci o distribuciji oleuropeina su veoma oskudni. U prethodno spomenutim istraživanjima koja su identificirala oleuropein u krvnoj plazmi animalnih modela ili ljudi, nije naglašeno je li oleuropein (i u kojoj količini) bio vezan za proteine plazme ili slobodan.

#### **4.1.2.1. *Mehanizam apsorpcije***

Mehanizam apsorpcije oleuropeina još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Postoji nekoliko hipoteza. Jedna od njih je da se oleuropein u izotoničnim uvjetima apsorbira pretežito transcelularnim putem jer je promjer oleuropeina u vodenoj otopini veći od paracelularnih prolaza između enterocita što onemogućuje paracelularni transport (Edgecombe i sur., 2000). Zbog polarosti i veličine oleuropeina smatra se da se transcelularna apsorpcija oleuropeina odvija posredovanjem transportera, najvjerojatnije glukoznih s obzirom da je oleuropein glukozid. Međutim, hipoteza o glukoznim transporterima nije potvrđena ispitivanjima transporta glukoze uz dodatak inhibitora glukoznih transportera. Jedno od mogućih objašnjenja autora jest da se oleuropein u izoosmotskim uvjetima ipak apsorbira paracelularno, unatoč svojoj veličini, ako je odgovarajuće orijentiran. Drugo objašnjenje jest da je afinitet oleuropeina prema glukoznim transporterima veći od afiniteta inhibitora istih s obzirom na njihovu strukturnu sličnost. Treće objašnjenje se temelji na hipotezi da možda postoji mala subpopulacija paracelularnih prolaza koji su veći od normalnih i da bi oni mogli biti dovoljno veliki za prolaz oleuropeina.

Za apsorpciju oleuropeina u hipotoničnim uvjetima se smatra da se ovija paracelularnim putem (Edgecombe i sur., 2000). Utjecaj difuzije vode na apsorpciju hidrofилnih molekula velikih molekulskih masa temelj je ove pretpostavke. U tankom crijevu vladaju hipotonični uvjeti tijekom probavljanja hrane pa tekućina (voda) ima tendenciju difundiranja kroz epitel crijeva čime može izravno utjecati na apsorpciju. Smatra se da zbog difuzije vode stanice stijenke crijeva bubre i vertikalno se izdužuju zbog čega dolazi do malo jačeg otvaranja lateralnih pora što je možda dovoljno za prolaz glukozidnog oblika oleuropeina (podaci pokazuju da se paracelularne pore u hipotoničnim uvjetima mogu toliko otvoriti da molekule i do 60% veće od veličine normalnih paracelularnih pora mogu proći kroz njih u značajnim količinama).

U svakom slučaju, točan mehanizam apsorpcije oleuropeina treba tek utvrditi.

#### **4.1.3. *Metabolizam i eliminacija***

Razgradnja peroralno unesenih spojeva može se dogoditi prije apsorpcije iz gastrointestinalnog trakta (npr., kisela ili enzimatska hidroliza u želucu) ili u enterocitima, krvi i/ili hepatocitima nakon apsorpcije reakcijama biotransformacije I i II faze. Reakcijama biotransformacije I faze pripadaju oksidacija, hidrogenacija, hidratacija, dekarboksilacija i hidroksilacija. Reakcijama biotransformacije II faze pripadaju metilacija, glukuronidacija,

sulfokonjugacija, acetilacija i glutaminacija. Poznato je da su biofenoli podložni jakom metabolizmu I i II faze u kojem su najčešće hidrolizirani i kasnije konjugirani u glukuronidirane, metilirane i sulfatirane oblike prije dostizanja sistemske cirkulacije (García-Villalba i sur., 2010).

Podaci o metabolizmu i eliminaciji oleuropeina su još uvijek oskudni. Donedavno se smatralo da su metaboliti oleuropeina u urinu isključivo HT i tirosol, njihovi glukuronidi te elenolna kiselina pa su istraživanja, koja su ispitivala metabolizam oleuropeina (i/ili sekoiridoidnih spojeva iz maslinovog ulja), najčešće bila usmjerena na identifikaciju i kvantifikaciju spomenutih metabolita što je otežalo/onemogućilo detekciju ostalih potencijalnih metabolita. Međutim, novija istraživanja su pokazala kako produkti metabolizma oleuropeina nisu samo HT i njegovi glukuronidi nego i metaboliti sekoiridoidne strukture koji su nedavno otkriveni u urinima ispitanika nakon peroralne primjene OLE (Kendall i sur., 2012). Autori su otkrili da se maksimalno 1% doze renalno izlučio nepromijenjen, odnosno u obliku konjugata glukuronidacije. Točnije, identificirano je 5 glukuronidiranih metabolita aglikona oleuropeina, ali konačna identifikacija i kvantifikacija nije mogla biti potvrđena zbog niskih koncentracija pronađenih metabolita i ograničene kromatografske rezolucije. Pinto i suradnici su otkrili i glukuronide reduciranih oblika aglikona kao metabolite oleuropeina i/ili aglikona oleuropeina inicijalno prisutnih u maslinovom ulju (Pinto i sur., 2011).

Prema dosadašnjim rezultatima, čini se da su najzastupljenije reakcije biotransformacije sekoiridoidnih fenola reakcije I faze (hidrogenacija, hidroksilacija i hidratacija, a moguće i redukcija), a najzastupljenija reakcija II faze je glukuronidacija (García-Villalba i sur., 2010). Također su pronađeni su i metaboliti metilacije aglikona oleuropeina kojoj mogu prethoditi ili koju mogu sljedovati hidroksilacija i hidratacija dok sulfokonjugati sekoiridoidnih spojeva nisu pronađeni (u ovom istraživanju) (García-Villalba i sur., 2010).

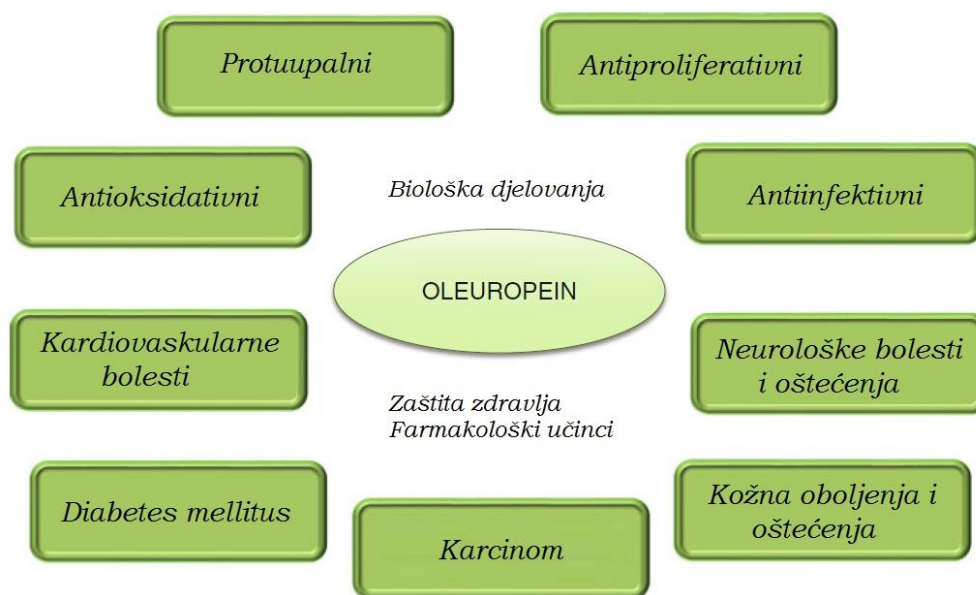
Razlozi neotkrivanja spomenutih metabolita sekoiridoidne strukture u većini dosadašnjih istraživanja su nedostatak komercijalno dostupnih standarda za usporedbu, prisutnost metabolita (i izvornih spojeva) sekoiridoidne strukture u vrlo malim količinama u ispitivanim medijima, korištenje analitičkih metoda koje mogu potvrditi identitet spojeva, ali ne i identificirati nove te usmjerenost mnogih ispitivanja na isključivu identifikaciju i kvantifikaciju pretpostavljenih metabolita, ne tražeći pri tome ostale. Ovi razlozi također mogu djelomično biti uzrokom nesuglasica u spomenutim ispitivanjima apsorpcije oleuropeina koje su rezultate temeljile na metabolitima pronađenima u urinu.

Osim metabolizma u tankom crijevu, ispitivao se i potencijalan metabolizam oleuropeina u kolonu, pod pretpostavkom da se oleuropein ne apsorbira (ili razgradi) te kao takav dospije u kolon gdje bi, u tom slučaju, bio podložan djelovanju crijevne mikroflore. Rezultati *in vitro* ispitivanja na kulturi stanica pokazali su da se oleuropein razgradio brzo i u velikoj mjeri, rezultirajući trima produktima razgradnje od kojih je jedan identificiran kao HT dok druga dva nisu mogla biti identificirana zbog nedostatka standarda (Corona i sur., 2006). Nadalje, *in vitro* se pokazalo da *Lactobacillus plantarum* metaboliziraju oleuropein svojim  $\beta$ -glikozidazama i esterazama proizvodeći različite aglikonske strukture prije konačnog metabolita - hidroksitirosola. Također je utvrđeno da bakterije uzgojene bez stanica domaćina nisu mogle metabolizirati oleuropein (Landete i sur., 2008). Međutim, rezultati ispitivanja razgradnje oleuropeina crijevnom mikroflorom *in vivo*, aplicirajući oleuropein rektalno u obliku supozitorija, nisu pokazali produkte razgradnje oleuropeina crijevnom mikroflorom tijekom 24 h (Kendall i sur., 2012).

## 4.2. BIOLOŠKI UČINCI

Oleuropein je pokazao antioksidativna, protuupalna, antiproliferativna i antinfektivna djelovanja zbog kojih ima djelotvorni učinak na kardiovaskularne, neurološke i maligne bolesti, kožna oboljenja i diabetes mellitus (DM; u daljnjem tekstu 'dijabetes'; šećerna bolest) (Slika 5). Na staničnoj razini, mehanizmi djelovanja oleuropeina mogu se podijeliti na nespecifične i na specifične (Obied i sur., 2012). Nespecifični mehanizmi djelovanja podrazumijevaju izravne antioksidativne mehanizme dok specifični mehanizmi djelovanja podrazumijevaju modulaciju genske ekspresije, signalne transdukcije i reakcije s receptorima te modulaciju enzima, epigenetičku regulaciju i interferiranje s diobom stanice.

S obzirom da se brojni blagotvorni učinci pripisuju i derivatima oleuropeina poput aglikona oleuropeina i njegovih derivata (3,4-DHPEA-EDA i 3,4-DHPEA-EA) te HT-a, moglo bi se reći da oleuropein može djelovati neposredno (djelujući sam) i posredno (djelujući preko svojih derivata). S obzirom na količinu podataka o spomenutim spojevima, ovaj rad obuhvaća samo oleuropein i njegov aglikon, dok učinci ostalih derivata nisu obrađeni.



Slika 5. Biološki učinci oleuropein (prilagođeno iz reference Bulotta i sur., 2013)

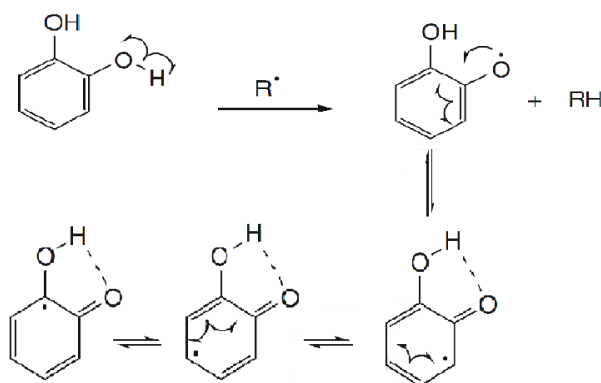
#### 4.2.1. Antioksidativni učinci

Osim oksidacije koja se događa u dodiru djevičanskog maslinovog ulja sa zrakom (odjeljak 1.3.1.), njegova oksidacija se javlja i u stanicama čovjeka. Tijekom normalnog staničnog funkcioniranja stvaraju se značajne koncentracije kemijski reaktivnih spojeva i slobodnih radikala koji se zajedničkim imenom nazivaju RONS (*eng.* Reactive Oxygen and Nitrogen Species), odnosno „Reaktivni spojevi kisika i dušika“. Reaktivni spojevi kisika (ROS) obuhvaćaju radikale kisika poput superoksida ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroksilnog ( $HO^{\cdot}$ ) i peroksilnog ( $ROO^{\cdot}$ ) radikala, ali i molekule koje nisu radikali, poput vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ), hipokloraste kiseline ( $HOCl$ ), ozona ( $O_3$ ) i peroksinitrita ( $ONOO^{\cdot}$ ). Reaktivni spojevi dušika (RNS) obuhvaćaju radikale dušikovog oksida ( $NO^{\cdot}$ ) i dušikovog dioksida ( $NO^{\cdot 2}$ ) te molekule koje nisu radikali, poput peroksinitrita ( $ONOO^{\cdot}$ ) i nekih dušikovih oksida (Obied i sur., 2012). U normalnim fiziološkim uvjetima reaktivni spojevi kisika i dušika učinkovito se uklanjaju endogenim obrambenim mehanizmom koji obuhvaća aktivnost enzimatskih antioksidansa, poput katalaze (CAT), superoksid dismutaze (SOD), glutation peroksidaze (GPx) i glutation reduktaze (GRx), te neenzimatskih antioksidansa, poput  $\alpha$ -tokoferola (vitamin E),  $\beta$ -karotena (prekursor vitamina A), askorbinske kiseline (vitamin C) i glutationa (GSH) (Al-Azzawie i sur., 2006). Međutim, kada je taj mehanizam onesposobljen iz određenih razloga ili je proizvodnja reaktivnih spojeva toliko velika da premašuje njegov kapacitet (npr. u uvjetima prekomjernog stresa i/ili fiziološkim poremećajima), nastaje tzv. „oksidativni stres“ koji može poremetiti strukturu i/ili funkciju bioloških makromolekula poput lipida, proteina i

nukleinskih kiselina. Navedeno može, između ostalog, dovesti i do oštećenja stanične membrane i citosolnih organela te u konačnici i do nekroze stanica. Oksidacija staničnih makromolekula smatra se ključnim korakom u patofiziologiji mnogih degenerativnih bolesti i bolesti povezanih sa starenjem poput kardiovaskularnih bolesti (npr. ateroskleroza), dijabetesa, metaboličkog sindroma, neurodegenerativnih bolesti te kožnih i malignih oboljenja. Biofenolni spojevi mogu djelovati kao prirodni antioksidansi na različite načine što ih čini značajnima, kako za stabilnost prehrambenih namirnica, tako i za zdravlje čovjeka (Bulotta i sur., 2013).

#### 4.2.1.1. *Mehanizmi antioksidativnog djelovanja oleuropeina*

Nespecifični mehanizmi djelovanja oleuropeina podrazumijevaju njegovo izravno antioksidativno djelovanje nespecifičnim (kemijskim) mehanizmima koji obuhvaćaju: (1) inaktivaciju (neutralizaciju) radikala vezanjem tj. „hvatanjem“ RONS-a, (2) njegovo redukcijsko djelovanje i (3) kelaciju metalnih iona koji mogu uzrokovati lančanu reakciju stvaranja radikala (Obied i sur., 2012). Oleuropein posjeduje antioksidativno djelovanje zahvaljujući svojoj katekolnoj strukturi i mogućnosti „donacije“ vodikovog atoma, odnosno mogućnosti povećanja stabilnosti radikala stvaranjem intramolekulske vodikove veze između slobodnog vodika svojih hidroksilnih skupina i svojih fenoksilnih radikala (Slika 6) (Quiles i sur., 2006). Antioksidativna sposobnost oleuropeina raste s porastom broja hidroksilnih skupina na aromatskom dijelu molekule (katekolnom) (Bulotta i sur., 2013; Manna i sur., 2002). Vezanjem RONS-a sprječava se njihovo daljnje djelovanje i zaustavljaju se njima potaknute lanchne reakcije stvaranja drugih radikala, a kelacijom metalnih iona smanjuje se indukcija daljnje oksidacije uzrokovana spomenutim metalima.



Slika 6. Mehanizam „hvatanja“ radikala katekolnog dijela molekule oleuropeina (Bulotta i sur., 2013)

Oleuropein i aglikon oleuropeina pokazali su *in vitro* snažno antioksidativno djelovanje inaktivacijom stabilnog slobodnog radikala DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) (Obied i sur., 2009; Quiles i sur., 2006). Također je utvrđeno i vezanje superoksid aniona, jednog od najagresivnijih reaktivnih oblika kisika koji nastaje u ljudskom organizmu staničnim (kemijski izazvanim prsnućem polimorfonuklearnih stanica) ili nestaničnim mehanizmima (sustavom ksantin/ksantin oksidaza) u vrlo niskim (mikromolarnim) koncentracijama (Czerwińska i sur., 2011; Cioffi i sur., 2010; Obied i sur., 2009). Usporedbe radi,  $\alpha$ -tokoferol (prirodni antioksidans) i BHT (butil-hidroksitoluen, često korišteni antioksidans u industriji) su se pokazali nedjelotvornima u inaktivaciji superoksid aniona (Quiles i sur., 2006). Nadalje, oleuropein se pokazao učinkovitim i u *in vitro* inaktivaciji  $\text{NO}\cdot$  i, nešto slabije,  $\text{ONOO}^-$  (Czerwińska i sur., 2011). Učinak na smanjenje stvaranja RNS radikala, kao i sposobnost inaktivacije istih mogu smanjiti rizik od kroničnih upalnih bolesti, uključujući i aterosklerozu. Osim toga, u *in vitro* ispitivanju na kulturi Caco-2 stanica, oleuropein i aglikon oleuropeina su u velikoj mjeri smanjili citotoksični učinak ROS-a i to aglikon oleuropeina s gotovo 100%-tnom učinkovitošću u koncentraciji od 250  $\mu\text{mol/L}$ , a oleuropein s gotovo 90%-tnom učinkovitošću u koncentraciji od 500  $\mu\text{mol/L}$  (Cioffi i sur., 2010). Spomenuto ispitivanje je također pokazalo i potencijalan utjecaj glukozidacije na antioksidativnu aktivnost oleuropeina. Točnije, glukozidni oblik oleuropeina pokazao je slabiju antioksidativnu aktivnost *in vitro* u odnosu na svoj aglikonski oblik. Nadalje, oleuropein je *in vitro* smanjio oksidaciju spoja TNB (5-tio-2-nitrobenzojeva kiselina) u DTNB [5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina)] uzrokovanu hipoklorastom kiselinom (HOCl), ali je taj antioksidativni učinak u odnosu na učinak askorbinsku kiselinu (Czerwińska i sur., 2011). HOCl je snažan oksidans koji *in vivo* nastaje na mjestu upale djelovanjem neutrofilne mijeloperoksidaze (MPO) te može, između ostalog, uzrokovati oštećenja proteina (konkretno, antioksidativnih enzima kao što je katalaza). *In vitro* ispitivanje pokazalo je da oleuropein veže HOCl sprječavajući njome uzrokovanu potencijalnu inhibiciju određenih enzima te svojim antioksidativnim djelovanjem ima zaštitno djelovanje na tkivo u procesu upale. Oleuropein posjeduje i antiaterogeno djelovanje jer HOCl može uzrokovati i oksidaciju, odnosno kloraciju apoproteinskog dijela LDL-a *in vivo*. Osim toga, HOCl je glavni sastojak klornih izbjeljivača koji često dolaze u doticaj s hranom tijekom njezine proizvodnje zbog čega bi oleuropein mogao imati i zaštitne učinke pri proizvodnji hrane (Quiles i sur., 2006). Antioksidativno djelovanje oleuropeina dokazano je i *ex vivo* na eritrocitima čovjeka s oksidativnim oštećenjima uzrokovanim ROS-om (Paiva-Martins i sur., 2009). Eritrociti, zbog nedostatka jezgre i citoplazmatskih organela, imaju slabe obrambene mehanizme te su

izrazito podložni oksidativnim oštećenjima, pogotovo zbog svoje uloge prenosioca kisika. Oksidativni stres najčešće uzrokuje oštećenja membrana i hemoglobina što u konačnici može dovesti do hemolize. Oleuropein je u niskoj koncentraciji pokazao značajno očuvanje eritrocita od oksidativnih oštećenja što indicira da bi spomenuti učinci mogli biti postignuti i *in vivo* s visokim postotkom vjerojatnosti s obzirom na sastav VOO-a. Nadalje, smatra se da bi neapsorbirani oleuropein mogao djelovati i lokalno na tkiva GIT-a, tj. inaktivirati slobodne radikale proizvedene u fekalnom matriksu i epitelnim stanicama tankog crijeva (Owen i sur., 2000). Antioksidativna sposobnost oleuropeina da veže i inaktivira hidroksilni radikal pokazala se učinkovitom i u *in vitro* sprječavanju oksidativnog oštećenja DNA hidroksilnim radikalom što ima potencijalno antikancerogeno djelovanje.

Mehanizmi neizravnog antioksidativnog djelovanja oleuropeina obuhvaćaju regeneraciju endogenog obrambenog antioksidativnog sustava i/ili modulaciju genske ekspresije i djelovanja određenih antioksidativnih enzima. Što se neenzimatskih antioksidansa tiče, smatra se da oleuropein može smanjiti razgradnju egzogenih antioksidansa (askorbinske kiseline i  $\alpha$ -tokoferola) iz hrane tijekom probave što povećava količinu spomenutih spojeva dostupnu za apsorpciju i na taj način povisuje njihovu koncentraciju u plazmi, odnosno pojačava antioksidativni status organizma (Al-Azzawie i sur., 2006). Nadalje, pokazalo se da oleuropein može regenerirati oksidirane neenzimatske antioksidanse poput  $\alpha$ -tokoferola, askorbinske kiseline i glutationa (Al-Azzawie i sur., 2006; Paiva-Martins i sur., 2003). Spomenuti učinak naziva se „*sparing effect*“ što bi se moglo prevesti kao „štedeći učinak“ jer regeneracija iskorištenih endogenih antioksidansa produljuje vrijeme njihove aktivnosti i povisuje njihovu plazmatsku i unutarstaničnu koncentraciju bez povećanja potrebe za unosom novih molekula u organizam ili *de novo* sintezom. Oksidirani  $\alpha$ -tokoferol i askorbinsku kiselinu oleuropein najvjerojatnije izravno reducira, dok se regeneracija glutationa odvija snižavanjem ekspresije gena, odnosno smanjenjem količine mRNA za enzime koji sudjeluju u njegovom stvaranju (Quiles i sur., 2006).

Oleuropein ima učinak i na enzimatske endogene antioksidanse kao što su CAT, SOD, GPx i GRx. Vezanjem slobodnih radikala može spriječiti glikozilaciju i peroksidaciju proteina (enzima) uzrokovanu oksidativnim stresom, a smatra se i da može inducirati sintezu spomenutih enzima s obzirom da je utvrđena njihova povećana aktivnost u jetrama dijabetičkih štakora i zečeva nakon tretmana oleuropeinom (Jemai i sur., 2009; Al-Azzawie i sur., 2006; Quiles i sur., 2006). Ovome u prilog ide i opažanje da oleuropein *in vitro* znatno povisuje ekspresiju SOD-a i enzima vezanih za glutation sustav (Al-Azzawie i sur., 2006; Masella i sur., 2004). *In vivo* se pokazalo kako je predtretman ispitivanih zečeva



oleuropeinom održao antioksidativnu aktivnost eritrocitne SOD stabilnom te je za vrijeme ishemije i naknadne reperfuzije miokarda subjekata, koje uzrokuju znatno smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima, zaštita miokarda od oštećenja oksidativnim stresom bila potpuna u odnosu na netretirane skupine (Andreadou i sur., 2006). Nadalje, oleuropein inducira ekspresiju antioksidativnog enzima hem-oksidaza 1 (HO-1) u kulturama perifernih krvnih mononuklearnih stanica i jetri miša (Parzonko i sur., 2013.; Domitrović i sur., 2012). Smatra se da se indukcija spomenutih enzima oleuropeinom odvija na razini transkripcije, aktivacijom određenih elemenata promotorske regije i inhibicijom ekspresije transkripcijskih faktora (Domitrović i sur., 2012; Jemai i sur., 2009; Masella i sur., 2004). Dapače, u *in vitro* ispitivanju na kulturi mišjih stanica sličnih humanim makrofagima, pokazalo se da je oleuropein izravno povisio ekspresiju i aktivnost GPx i GRx u značajnoj mjeri i prije indukcije oksidativnih promjena u stanici čime je podigao antioksidativni status stanica neovisno o prisutnosti oksidativnog stresa (tzv. „*boost effect*“) (Masella i sur., 2004).

Osim indukcije enzima, oleuropein je pokazao i umjerenu inhibiciju enzima ksantin oksidaza koji sudjeluje u nastajanju superoksidnih aniona u fiziološkim uvjetima. U patološkim stanjima poput hiperuricemije i gihta aktivnost ksantin oksidaze je povišena pa bi oleuropein potencijalno mogao imati blagotvoran učinak i na giht (Flemmig i sur., 2011; Cioffi i sur., 2010; Owen i sur., 2000). U jednom *in vivo* ispitivanju pokazalo se da je kod štakora, koji su prije akutnog izlaganja arsenu ( $As^V$ ) bili tretirani oleuropeinom, primijećena smanjena aktivnost hepatskih enzima GRx i CAT, dok je aktivnost GPx-e ostala nepromijenjena (Kotyzová i sur., 2011). Autori smatraju da bi oleuropein mogao biti koristan u prevenciji oksidativnog stresa u početnim stadijima intoksikacije arsenom. Oleuropein se pokazao učinkovitim antioksidansom i u slučaju etanolom induciranog oksidativnog stresa u testisima štakora utvrđenog povećanom aktivnošću enzima GPx i SOD te povećanom količinom GSH (Alirezaei i sur., 2012). Kod štakora koji su prethodno bili tretirani oleuropeinom, aktivnost GPx i SOD, kao i količina GSH, su bili znatno smanjeni u odnosu na netretirane štakore. Autori smatraju da je sposobnost oleuropeina da veže i reducira slobodne radikale glavni mehanizam koji je doveo do smanjenja količine, odnosno sinteze spomenutih enzima čija aktivnost i brojnost raste kao odgovor na povećanu prisutnost ROS-a (Alirezaei i sur., 2012).

#### 4.2.1.2. *Inhibicija lipidne peroksidacije i oksidacije proteina*

Biološke membrane su općenito veoma osjetljive na oksidativni stres zbog prisutnosti brojnih nezasićenih veza između atoma ugljika u lipidnim dijelovima fosfolipidnih molekula. Oksidativna oštećenja lipidnih membrana dovode do promjene njihove strukture (nastaju citotoksični lipidni peroksidi) i fluidnosti te, u konačnici, do promjene u njihovoj funkciji. Oksidativna oštećenja mogu biti uzrokovana izravno, ROS-om, ili neizravno, produktima lipidne peroksidacije (Quiles i sur., 2006).

Oleuropein je *in vitro* pokazao snažnu antioksidativnu aktivnost na oksidaciju lipida u fosfolipidnom dvosloju liposoma induciranu radikalima iz vodene faze (Paiva-Martins i sur., 2003). Naime, fosfolipidni dvosloji (unutar)staničnih membrana podložni su oksidativnom razaranju iniciranom reaktivnim spojevima iz međustanične tekućine koje pokreću lančanu reakciju stvaranja radikala u membrani. Rezultati su pokazali da oleuropein nije penetrirao u membranu liposoma, vjerojatno zbog svoje hidrofilnosti i neplanarne strukture, nego je ostao u vodenoj fazi. Zbog toga može vezati samo (hidro)peroksilne radikale u blizini površine membrane, ali ne i unutar membrane. S obzirom da se oksidativni napad na membranu stanice iz izvanstanične tekućine smatra važnim korakom u inicijaciji peroksidacije membranskih lipida *in vivo*, smatra se da bi oleuropein mogao doprinijeti inhibiciji razvoja bolesti čovjeka posredovanih slobodnim radikalima (Paiva-Martins i sur., 2003). Spomenuti antioksidativni učinak oleuropeina je jači sinergičnim djelovanjem s endogenim antioksidansima poput  $\alpha$ -tokoferola i askorbinske kiseline. Askorbinska kiselina je hidofilni spoj koji djeluje u vodenom okolišu, dok je  $\alpha$ -tokoferol hidrofobni spoj koji može djelovati unutar fosfolipidnih dvosloja. Osim izravnog antioksidativnog djelovanja, oleuropein je pokazao tzv. „*sparing effect*“ (učinak štednje) na  $\alpha$ -tokoferol čime je značajno produžio njegovo vrijeme djelovanja. Osim regeneracije oksidiranog  $\alpha$ -tokoferola, smatra se da oleuropein istovremenim prisustvom u krvnoj plazmi povisuje plazmatsku koncentraciju  $\alpha$ -tokoferola (Coni i sur., 2000). Treba imati na umu da su korišteni liposomi u ovom ispitivanju dobiveni umjetnim putem te ne mogu u potpunosti predstavljati fosfolipidne membrane *in vivo* jer ne sadrže transmembranske transportere koji bi potencijalno utjecali na apsorpciju oleuropeina, a time i na njegov učinak (Paiva-Martins i sur., 2003). U drugom istraživanju oleuropein je spriječio *in vitro* peroksidaciju lipida jetrenih mikrosoma štakora inkubiranih s ionom željeza (Ruiz Gutierrez i sur., 2001). Slične rezultate autori su dobili i *in vitro* ispitivanjem na kulturi hepatocita sa željezom kao toksičnim sredstvom. Rezultati ispitivanja su pokazali da je oleuropein zaštitio ne samo fosfolipide nego i membranske PUFA-e od lipidne peroksidacije.

Antioksidativnu učinkovitost *in vivo* oleuropein je pokazao inhibirajući lipidnu peroksidaciju u testisima štakora uzrokovanu etanolom (Alirezai i sur, 2012). Plazmatske membrane spermatozoida sadrže veliku količinu PUFA i zbog toga su veoma podložne peroksidnim oštećenjima s posljedičnim gubitkom integriteta membrane, narušenom staničnom funkcijom i smanjenom pokretljivošću spermatozoida što često rezultira smanjenom plodnošću muškaraca ili stanjima koja doprinose smanjenoj plodnosti. Osim povećanja aktivnosti endogenih antioksidativnih enzima, oleuropein je značajno snizio markere lipidne peroksidacije te, u konačnici, povećao integritet plazmatskih membrana spermatozoida i njihovu ukupnu pokretljivost (Alirezai i sur, 2012). Nadalje, antioksidativno djelovanje oleuropeina očitovalo se i značajnim *in vivo* smanjenjem količine produkata oksidacije plazmatskih lipida i proteina nastalih ishemijskom miokarda zečeva (Poyudal i sur, 2010; Andreadou i sur., 2006).

Posebna pažnja posvetila se antioksidativnom učinku oleuropeina na proces oksidacije plazmatskih aterogenih lipoproteina jer inhibicija tog procesa predstavlja glavni mehanizam prevencije ateroskleroze. Oksidativnost lipoproteina ovisi o lipidnom sastavu samog lipoproteina, odnosno količini PUFA, i o obrambenom antioksidativnom statusu organizma (Ruiz Gutierrez i sur., 2001). Osim ROS-a, oksidativno oštećenje lipoproteina može uzrokovati i peroksinitritni anion koji nastaje reakcijom dušikovog (II) oksida (NO), glavnog medijatora upale koji se u procesu upale pojačano proizvodi, i superoksidnog aniona. S obzirom da je *in vitro* dokazan snažan antioksidativni učinak oleuropeina i prema NO i prema superoksidnom anionu, može se pretpostaviti da oleuropein ima i antioksidativni učinak na proces oksidacije LDL-a peroksinitritom (Czerwińska i sur., 2011). Snažan *in vitro* inhibirajući učinak u niskim koncentracijama oleuropein je pokazao inhibirajući oksidaciju LDL-a uzrokovanu bakrovim sulfatom (Paiva-Martins i sur., 2003). Ranije spomenuto antioksidativno *in vitro* djelovanje oleuropeina na HOCl, koja može uzrokovati oksidaciju i lipidnog i proteinskog dijela LDL-a *in vivo*, također je jedan od mehanizama antioksidativnog djelovanja oleuropeina na oksidaciju lipoproteina (Czerwińska i sur., 2011). Nadalje, u *in vitro* istraživanju u kojem se ispitivao učinak oleuropeina na oksidaciju LDL-a posredovanu mišjim stanicama sličnima humanim makrofagima, oleuropein je u potpunosti spriječio peroksidaciju LDL-a izravnim vezanjem nastalih radikala i sprječavanjem lančane reakcije daljnje proizvodnje lipidnih peroksida (Masella i sur., 2004). Rezultati jednog *ex vivo* istraživanja u kojem se ispitivao učinak oleuropeina na oksidativnost LDL-a iz zečeva, koji su bili hranjeni maslinovim uljem obogaćenim oleuropeinom, pokazali su da se djelovanje oleuropeina na peroksidativne procese ne sastoji samo od usporavanja kinetike oksidacije,

nego i od povećanja rezistencije LDL-a na oksidaciju, odnosno smanjenja njegove oksidativnosti (Coni i sur., 2000). Smanjenje osjetljivosti humanih LDL čestica na oksidaciju bakrovim ionom kao posljedicu djelovanja oleuropeina potvrdilo je i *in vivo* istraživanje na pacijentima s kombiniranom hiperlipidemijom koji su kao glavni izvor masnoće koristili isključivo EVOO (Masella i sur., 2001). Autori smatraju da bi za taj učinak, osim izravnih antioksidativnih svojstava oleuropeina, mogli biti zaslužni i njegovi učinci na redistribuciju lipidnih sastavnica LDL čestica i/ili promjenu antioksidativnog sastava plazme. Osim izravnog antioksidativnog djelovanja na lipidnu peroksidaciju lipoproteina, oleuropein je pokazao i neizravno djelovanje na istu redukcijom signalizacijskih putova aktiviranih izvanstaničnim slobodnim masnim kiselinama (*eng.* Free Fatty Acid; FFA) koji su odgovorni za lipotoksičnost u adipocitima, mišićima, hepatocitima i stanicama gušterače poticanjem oksidativnog stresa i lipidne peroksidacije. Time je oleuropein pokazao potencijalni preventivni učinak na hepatičku steatozu uzrokovanu FFA-ma (Hur i sur., 2012).

Svojim antioksidativnim djelovanjem oleuropein sprječava i oksidaciju proteina. U jednom *in vitro* istraživanju je utvrđeno kako se oleuropein slabo veže na humani serumski albumin (HSA), inhibira lipidnu peroksidaciju linolenske kiseline vezane na HSA i oksidativnu razgradnju butirilkolin esteraze (BChE) također vezane na HSA (Roche i sur., 2009). HSA je najzastupljeniji serumski protein i snažan plazmatski antioksidans koji ima veliku ulogu u transportu endogenih i egzogenih liganada (pogotovo masnih kiselina), ksenobiotika (pogotovo lijekova) i prehrambenih antioksidansa (uključujući polifenole) dok je BChE uključena u metabolizam lipoproteina. PUFA, koje su posebno osjetljive na oksidativni stres, mogu putem svojih oksidiranih intermedijera posredovati oksidativne modifikacije HSA, BChA i drugih proteina te na taj način modificirati njihovu funkciju. Inhibicija oksidacije proteina oleuropeinom dokazana je i u *in vivo* istraživanju u kojem su zečevi, koji su prije ishemije i naknadne reperfuzije miokarda bili tretirani oleuropeinom, pokazali nepromijenjenu koncentraciju biomarkera oksidacije proteina (Andreadou i sur., 2006).

Ljudski organizam posjeduje učinkovit endogeni sustav zaštite od oksidativnog stresa koji nastaje u normalnim fiziološkim uvjetima (Coni i sur., 2000). Međutim, u patološkim stanjima, kada je taj sustav neučinkovit, antioksidativni spojevi iz prehrambenih namirnica poput oleuropeina, dobrodošla su pomoć organizmu u borbi s oksidativnim stresom.

#### **4.2.2. Protuupalni učinci**

Upala je obrambeni odgovor organizma na različite stimulanse koji obuhvaća primarna tkivna oštećenja i sekundarne promjene u okolnom neoštećenom tkivu (Khalatbary i

Zarrinjoei, 2012). Karakterizirana je vazodilatacijom lokalnih krvnih žila s posljedičnim povećanim protokom krvi (što uzrokuje povišenu temperaturu i crvenilo na mjestu upale), povećanom permeabilnošću kapilara i posljedičnim edemom tkiva, migracijom velikog broja granulocita i monocita u tkivo na mjestu upale i osjećajem boli na istom. Osim spomenutih staničnih čimbenika, u upalnom procesu sudjeluju i nestanični čimbenici poput medijatora upale, citokina i drugih (Barbaro i sur., 2014). Od staničnih čimbenika, najzastupljeniji su polimorfonuklearni neutrofilni (PMN neutrofilni) i monociti, odnosno makrofagi, koji fagocitiraju oštećeno tkivo i prisutne patogene. Od nestaničnih čimbenika najvažniji medijatori upale su derivati arahidonske kiseline, odnosno eikozanoidi (prostaglandini (PG), leukotrieni (LT) i tromboksani (TX)) te NO. PG-i i LT-i nastaju djelovanjem enzima ciklooksigenaze (COX; za proces upale važna je inducibilna izoforma COX-2 koja se aktivira na mjestu upale) i lipooksigenaze (LOX) te su odgovorni za bol, edem, crvenilo i ostale simptome upale (Khalatbary i Zarrinjoei, 2012; Obied i sur., 2012). NO koji je uključen u upalni proces nastaje djelovanjem makrofagne inducibilne sintaze dušikovog (II) oksida (*i*NOS) te je odgovoran za antibakterijsko djelovanje makrofaga s obzirom na baktericidna i citostatička svojstva (Barbaro i sur., 2014). Najvažniji upalni citokini su TNF- $\alpha$  i interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), proizvode ih većinom makrofagi u upaljenom tkivu te su uključeni u vaskularnu permeabilnost, regrutaciju upalnih stanica, indukciju inducibilnih proupalnih enzima (*i*NOS i COX-2) na mjestu upale, itd. (Barbaro i sur., 2014; Khalatbary i Zarrinjoei, 2012).

U nekim patološkim stanjima koji uključuju i upalne procese, poput ateroskleroze i kancerogenih oboljenja, dolazi do razgradnje izvanstaničnog matriksa (Dell' Agli i sur., 2010). Jedan od značajnih enzima uključenih u spomenuti proces remodelacije tkiva je i monocitna matriksna metaloproteinaza-9 (MMP-9) koja, osim djelovanja na izvanstanični matriks, djeluje i na supstrate poput prekursora upalnih citokina, doprinoseći time amplifikaciji upalnog odgovora (Giner i sur., 2013). Posebno je značajna u patološkim procesima u kojima dolazi do razgradnje izvanstaničnog matriksa kao što su maligna oboljenja i ateroskleroza (Dell' Agli i sur., 2010).

Od signalnih putova koji su aktivirani stresom i upalom, važno je spomenuti MAPK (*eng.* Mitogen-Activated Protein Kinase) i transkripcijski faktor NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B ima centralnu ulogu u upalnom odgovoru i odgovoru organizma na oksidativni stres kontrolirajući ekspresiju mreže induktora i efektor, poput TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, *i*NOS, COX-2 i MMP-a, a uključen je i u regulaciju gena procesa stanične proliferacije i apoptoze (Giner i sur., 2013).

Tijekom upale, aktivirani PMN neutrofilni proizvode prekomjerne količine unutarstaničnih i izvanstaničnih reaktivnih kisikovih spojeva (*eng.* „*oxidative burst*“) koji

moгу reagirati s makromolekulama, modificirati njihovu strukturu i funkciju te na taj način utjecati na signalne putove i susjedne stanice, potencirajući oštećenja upalnog tkiva (Czerwińska i sur., 2011). Previsoka koncentracija ROS-a na mjestu upale uzrokuje aktivaciju i akumulaciju leukocita čime se proces upale pojačava i stvara se potencijal za razvoj kronične upale. Dapače, dokazano je da prekomjerna aktivacija/stimulacija neutrofila okidač brojnih kroničnih upalnih bolesti, uključujući aterosklerozu i autoimune bolesti. Osim toga, oksidativni stres potencira aktivaciju određenih transkripcijskih faktora, ponajprije NF- $\kappa$ B (Giner i sur., 2013).

Postoji korelacija između upalnih procesa i mnogih kroničnih bolesti, poput kroničnih kardiovaskularnih i neuroloških oboljenja (Alzheimerova bolest npr.), dijabetesa, malignih bolesti, plućnih oboljenja i autoimunih bolesti (npr. artritis, giht). Prekomjerno nastajanje i akumulacija RONS-a te metaboliti arahidonske kiseline imaju ključnu ulogu u patogenezi kroničnih kardiovaskularnih bolesti i karcinogenih oboljenja (Obied i sur., 2012).

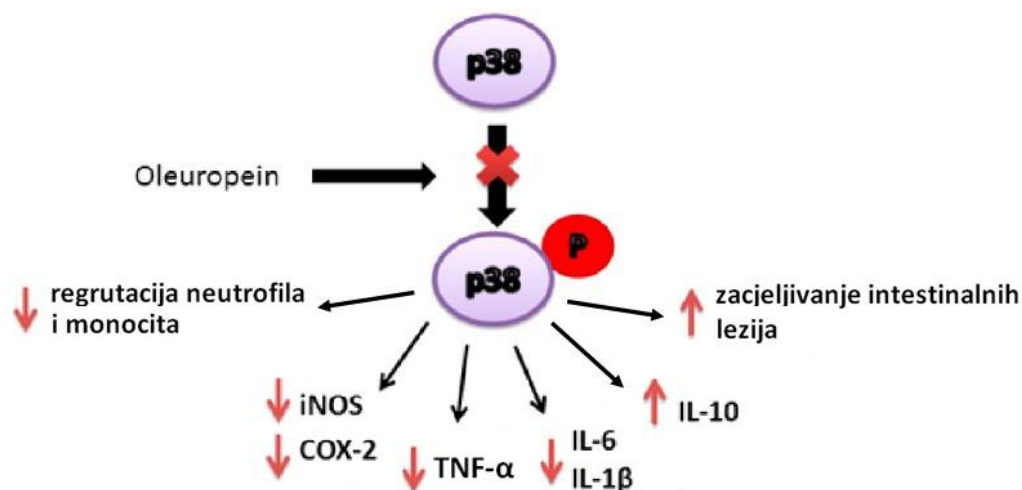
Oleuropein je pokazao učinak na gotovo sve nabrojane čimbenike upale: od inhibicije ekspresije enzima odgovornih za sintezu medijatora upale, preko inhibicije signalnih putova i ekspresije upalnih citokina do inhibicije drugih enzima poput PARP, MPO i MMP-9, aktivacije  $\mu$ -opioidnih receptora ( $\mu$ -OR) i modulacije drugih parametara upale. S obzirom da su svi ovdje spomenuti čimbenici upale međusobno povezani, inhibicija jednog (npr. MAPK ili NF- $\kappa$ B) čimbenika može dovesti do posljedične inhibicije drugog tako da je teško podijeliti učinke po nekom svojstvu.

#### ***4.2.2.1. Inhibicija signalnih putova, medijatora upale i enzima odgovornih za njihovo nastajanje***

U *ex vivo* ispitivanju oleuropein je inhibirao leukocitnu 5-LOX u koncentraciji od 80  $\mu$ M na umjetno stimuliranim peritonealnim leukocitima štakora čime je reducirao proizvodnju proupalnog LTB<sub>4</sub>, ne utječući pri tome na proizvodnju PGE<sub>2</sub> i TXA<sub>2</sub> kataliziranu enzimom COX-1 (De la Puerta i sur., 1999). Inhibirao je i *i*NOS, odnosno njegovu ekspresiju i time značajno smanjio proizvodnju NO u *in vitro* ispitivanju na humanim perifernim krvnim mononuklearnim stanicama (PBMC) stimuliranim bakterijskim lipopolisaharidom (LPS) što se može smatrati i neizravnim antioksidativnim učinkom jer iz NO nastaje NO $\cdot$  (Czerwińska i sur., 2011). S obzirom da se smatra da je reakcija NO $\cdot$  i O<sub>2</sub> $\cdot^-$  glavna biološka reakcija kojom nastaje ONOO $\cdot^-$ , visokoreaktivna molekula koja amplificira upalni odgovor i čija se citotoksičnost smatra uzrokom brojnih bolesti, antioksidativno djelovanje oleuropeina (inhibicijom ekspresije *i*NOS i izravnom neutralizacijom peroksinitrita) doprinosi i njegovom

protuupalnom djelovanju (Czerwińska i sur., 2011). Nadalje, u *ex vivo* ispitivanju na neutrofilima i monocitima stimuliranim bakterijskim LPS-om i dvama sojevima bakterije *Pseudomonas aeruginosa* (jedan multirezistentan, drugi osjetljiv) oleuropein je značajno snizio razine proupalnih TNF- $\alpha$  i IL-6 (Giamarellos-Bourboulis i sur., 2006). U istom, ali *in vivo* istraživanju na zečevima kojima su inokulirani spomenuti sojevi *P. aeruginosa* i time izazvane sepsa i pijelonefritis, oleuropein je značajno snizio razinu TNF- $\alpha$ . Autori smatraju da su spomenuti učinci rezultat modulacije sekrecije proupalnih citokina te da oleuropein posjeduje i potencijalni učinak imunomodulatora (Giamarellos-Bourboulis i sur., 2006). U *in vivo* istraživanju na štakorima s ozlijeđenom leđnom moždinom oleuropein je inhibirao ekspresiju TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , a time i ekspresiju *i*NOS i COX-2 (Khalatbary i Zarrinjoei, 2012). Na istom modelu je i aglikon oleuropeina pokazao slične učinke, smanjivši histološka oštećenja, ekspresiju NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i *i*NOS-a, infiltraciju neutrofila, lipidnu peroksidaciju i apoptozu. Inhibicija TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$ , a posljedično i enzima *i*NOS i COX-2 koji imaju ključnu ulogu u razvoju sekundarnog upalnog odgovora, ima neuroprotektivni učinak i poboljšava funkcionalni oporavak eksperimentalne ozljede leđne moždine (Impellizzeri i sur., 2011). U *in vivo* istraživanju na miševima s kroničnim kolitisom, oralna primjena oleuropeina značajno je smanjila simptome kronične upale (gubitak tjelesne težine, dijareju, rektalno krvarenje). Također su smanjene histološke promjene karakteristične za kroničnu upalu i to oštećenje kriпти, edem tkiva kolona i stanična infiltracija (za 36-46%), kao i otpuštanje proupalnih IL-1 $\beta$  (25%) i IL-6 (37%) te ekspresiju enzima COX-2 (68%) i *i*NOS (58%) u kolonu oboljelih miševa (Giner i sur., 2013). Osim toga, oleuropein je povisio razinu IL-10 (34%), ključnog citokina u slabljenju upalnog procesa intestinalne mukoze, u tkivu kolona i *in vitro* poboljšao proces zacjeljivanja lezija u sloju intestinalnih epitelnih stanica (50-60%). Autori smatraju da je jedan od mehanizama protuupalnog djelovanja oleuropeina povezan sa supresijom fosforilacije p38 MAPK koja je, zajedno sa NF- $\kappa$ B, višestruko aktiviranija tijekom razvoja kolitisa (Giner i sur., 2013).

Iz svega navedenog može se zaključiti (iako su potrebna dodatna *in vivo* istraživanja radi konačnog utvrđivanja) kako je u podlozi svih dosada spomenutih učinaka, djelovanje oleuropeina i njegovog aglikona na razini ekspresije gena, a ne izravna inhibicija spomenutih spojeva (Slika 7).



Slika 7. Sistematizacija protuupalnih mehanizama djelovanja oleuropeina na molekularnoj razini (prilagođeno iz reference Giner i sur., 2013)

#### 4.2.2.2. Ostali mehanizmi protuupalnog djelovanja oleuropeina

Čini se da oleuropein može djelovati i na apoptozu oštećenog upaljenog tkiva. Naime, u ranije spomenutom *in vivo* istraživanju na štakorima s ozlijeđenom leđnom moždinom, oleuropein je inhibirao i ekspresiju (poli(ADP-riboza)) polimeraze (PARP), enzima koji je uključen u stanični mehanizam popravka oštećene DNA i mehanizam apoptoze (Khalatbary i Zarrinjoei, 2012). Peroksinitritni anion koji nastaje u oštećenom tkivu leđne moždine doprinosi posttraumatskoj upalnoj reakciji, između ostalog, i oštećenjem DNA što aktivira PARP. Prekomjerno aktivirani PARP rezultira u konačnici staničnom smrću. Stoga inhibicija PARP-a tijekom ozljede leđne moždine značajno reducira razvoj upale i apoptoze traumatiziranog tkiva (Khalatbary i Zarrinjoei, 2012).

Nadalje, oleuropein smanjuje otpuštanje mijeloperoksidaze (MPO) iz PMN neutrofila čime potencijalno smanjuje oksidativna oštećenja okolnog tkiva (Giner i sur., 2011). MPO je najzastupljeniji enzim PMN neutrofila koji katalizira reakciju nastanka HOCl iz vodikovog peroksida i klorida koja je citotoksična za patogene, ali i za stanice domaćina (Visioli i sur., 2002). Tijekom upale, aktivirani PMN neutrofilni proizvode velike količine ROS-a, a njihovom pojačanom produkcijom neizravno (cirkularno) raste i aktivnost MPO-e te time i citotoksičnost njezinih produkata. U *in vitro* ispitivanju inkubacija aktiviranih humanih neutrofila i oleuropeina pokazala je značajno smanjenje otpuštanja MPO (Czerwińska i sur., 2011). U *in vivo* istraživanju je topikalna primjena oleuropeina na miševima s upalom uha smanjila edem tkiva (30 %) redukcijom infiltracije neutrofila na mjestu upale što se očitivalo



smanjenjem otpuštanja MPO-e (De la Puerta i sur., 2000). Smanjenje otpuštanja MPO-e služi kao općeniti marker infiltracije aktiviranih neutrofila u tkivu na mjestu upale (Giner i sur., 2011). Osim toga, MPO ima ključnu ulogu u aterogenezi jer je odgovorna za oksidaciju fagocitiranih lipoproteina (Czerwińska i sur., 2011)

Postoje indikacije i da oleuropein može svoje protuupalno djelovanje iskazati i putem opioidnog sustava. U nedavnoj, već spomenutom *in vivo* istraživanju na štakorima s ulceroznim kolitisom, korišteni antagonisti opioidnih receptora (L-NAME i naltrekson) „obrnuli“ su protektivan protuupalni učinak OLE (udio oleuropeina > 70%) i povećali infiltraciju upalnih stanica i ulceraciju mukoze (Fakhraei i sur., 2014). Naime, postoje dokazi da endogeni opioidni peptidi imaju ulogu u razvoju upalnog odgovora modulirajući ekspresiju velikog broja citokina i njihovih receptora. Točnije, opioidi selektivno promoviraju proupalne ili protuupalne učinke, ovisno o uključenosti  $\mu$ -OR-a u proces. Pokazalo se da su miševi kojima je inhibiran gen za sintezu  $\mu$ -OR-a mnogo osjetljiviji na kolitis. Također je utvrđeno da egzogeni opioidi pokazuju protuupalne učinke kod miševa koji pate od upalne bolesti crijeva. S obzirom da je ekspresija intestinalnih  $\mu$ -OR-a djelomično regulirana i upalnim citokinima, u stanjima upalnih bolesti crijeva ekspresija  $\mu$ -OR-a je povećana te bi oleuropein mogao svoja protuupalna svojstva ostvariti aktivacijom  $\mu$ -OR-a. Autori su ovu hipotezu potkrijepili prethodno spomenutim rezultatima koje su dobili naknadnim dodavanjem spomenutih antagonista  $\mu$ -OR-a (Fakhraei i sur., 2014).

Aglikon oleuropeina pokazao je učinak i na upalu u reumatoidnom artritisu (RA). U *in vivo* istraživanju na miševima s RA, tretman aglikonom oleuropeina ublažio je kliničke simptome i razvoj RA te poboljšao histološki status zglobova i šapica oboljelih miševa. RA je autoimuna bolest karakterizirana nakupljanjem leukocita unutar razvijenog panusa i sinovijalnog prostora što rezultira višestrukim upalama zglobova s posljedičnim uništenjem zglobne hrskavice i erozijom kosti. Aglikon oleuropeina je smanjio stupanj oksidativnih i nitrozativnih oštećenja i snizio plazmatske razine proupalnih citokina i prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) što se pripisuje redukciji ekspresije *i*NOS i COX-2 (Bulotta i sur., 2013).

### **4.2.3. Kardioprotektivni učinci**

Uzroci kardiovaskularnih bolesti (*eng.* CVD) su različiti, ali najčešći su hipertenzija, ateroskleroza i tromboza. Starenjem nastaju brojne fiziološke i morfološke promjene koje mogu utjecati na kardiovaskularne funkcije i povećati rizik od kardiovaskularnih oboljenja, čak i kod zdravih, asimptomatskih osoba (Quiles i sur., 2006).

Oleuropein ima multifunkcionalni učinak na čimbenike kardiovaskularnih bolesti. Prekomjerno nastajanje i akumulacija RONS-a, te metaboliti arahidonske kiseline i upalni procesi imaju ključnu ulogu u patogenezi kroničnih kardiovaskularnih bolesti, primjerice ateroskleroze, pa su antioksidativni i protuupalni mehanizmi djelovanja oleuropeina dio njegovog kardioprotektivnog učinka (Obied i sur., 2012). Osim njih, kardioprotektivnom učinku oleuropeina doprinose i njegova antihipertenzivna, hipolipidemijska, hipoglikemijska, vazodilatatorna i antitrombotska svojstva te sposobnost zaštite miokarda od oksidativnih oštećenja tijekom i nakon ishemije.

#### ***4.2.3.1. Antihipertenzivni učinci***

Trenutno nema istraživanja (ili nisu dostupna) u kojima se antihipertenzivno djelovanje oleuropeina ispitalo njegovom primjenom kao zasebnog spoja nego samo kao dijela OLE. No, obzirom da se navedeni učinci OLE pripisuju većinom oleuropeinu, uvršteni su u ovaj rad.

OLE, u kojem je oleuropein najzastupljeniji polifenol (18-26%), pokazao je profilaktičko svojstvo u *in vivo* ispitivanju na štakorima gdje je istovremenom primjenom (u dozi od 100 mg/kg) sa uzročnom supstancom hipertenzije u potpunosti spriječio porast krvnog tlaka (Khalatbary i sur., 2002). Primjena OLE na štakorima s već uzrokovanom hipertenzijom značajno je snizila povišeni krvni tlak pokazavši time i potencijalni terapijski učinak. Autori smatraju da je za postignuti učinak odgovorno antioksidativno djelovanje oleuropeina jer je hipertenzija uzrokovana oksidativnim stresom zbog potrošnje glutaciona koja je povezana sa smanjenom proizvodnjom NO uzrokovanom primjenjenom supstancom (Khalatbary i sur., 2002). Nadalje, OLE je pokazao antihipertenzivni učinak i u studiji na 146 ljudskih ispitanika s hipertenzijom prvog stupnja gdje je osmotjedna primjena OLE (500 mg 2x dnevno) snizila sistolički tlak za 13 mmHg, a dijastolički za 6 mmHg što je jednako učinku koji je pokazao i Captopril (antihipertenziv) u svojoj terapijskoj dozi (Susalit i sur., 2011). Iako mehanizam opaženog antihipertenzivnog učinka OLE nije u potpunosti utvrđen, autori smatraju da bi mogao biti povezan sa sinergističkom inhibitornim djelovanjem oleuropeina i njegovih derivata na angiotenzin II-konvertirajući enzim (ACE; enzim koji aktivira angiotenzin II, peptid odgovoran za povišenje krvnog tlaka) (Susalit i sur., 2011). Treba uzeti u obzir da su doze OLE (i oleuropeina) u ovim istraživanjima mnogo veće od preporučenog dnevnog unosa oleuropeina što bi bilo teško ostvarljivo konzumacijom maslinovog ulja u preporučenim količinama zbog niske zastupljenosti oleuropeina u istom.

Važne čimbenike u patofiziologiji hipertenzije čine endotelna disfunkcija i smanjena bioraspoloživost NO. Učinci oleuropeina na spomenute parametre opisani su u odjeljcima 4.2.2.1. i 4.2.3.3. što potencijalno može imati učinak i na hipertenziju. Osim toga, primjećen je i *in vitro* vazodilatatorski učinak oleuropeina koji također može doprinijeti njegovom antihipertenzivnom učinku (Barbaro i sur., 2014). S obzirom da se primijećena vazodilatacija pokazala neovisnom o interakciji oleuropeina s endotelom i njegovim medijatorima, smatra se da bi za istu mogao biti odgovoran mehanizam inhibicije kalcijevih ionskih kanala L-tipa ( $I_{Ca,L}$ ) (detaljnije u odjeljku 4.2.3.4.) (Barbaro i sur., 2014).

#### **4.2.3.2. Učinak oleuropeina na lipidni sustav**

Učinci oleuropeina mogu se otprilike podijeliti na (1) utjecaj oleuropeina na lipidni profil i metabolizam lipida i na (2) utjecaj oleuropeina na oksidaciju lipoproteina. Dislipidemija, poremećaji u adipogenezi i oksidacija lipoproteina (i lipida općenito) su vrlo važni faktori za razvoj mnogih bolesti, pogotovo kardiovaskularnih bolesti.

Plazmatski lipoproteini, kao prenosioci lipida u organizmu, imaju važnu ulogu u patogenezi ateroskleroze. Lipoproteini sintetizirani u jetri („*aterogeni*“ lipoproteini; LDL, IDL, VLDL) prenose lipide iz jetre prema perifernim arterijskim stijenkama. Lipoprotein sintetiziran izvan jetre (tzv. „*antiaterogeni*“ lipoprotein; HDL) prenosi lipide iz perifernih arterijskih stijenki u jetru gdje se razgrađuju. HDL ima sposobnost smanjenja *in vivo* oksidacije aterogenih lipoproteina jer se lipidi HDL-a preferirano oksidiraju u odnosu na lipide LDL-a, a može i inhibirati unos LDL-a u tkivo natječući se za LDL receptore na stanicama arterijske glatke muskulature (Jemai i sur., 2008). Osim toga, povišenje koncentracije HDL-a i sniženje koncentracije LDL-a u plazmi mogu ubrzati mobilizaciju kolesterola iz perifernih tkiva u jetru radi njegovog katabolizma i sekrecije (Jemai i sur., 2008). Oleuropein je pokazao sposobnost sniženja povišenih razina aterogenih lipoproteina, triglicerida (TG) i kolesterola i povišenje sniženih razina HDL-a, zbog čega ima antiaterogeni učinak. Iako mehanizam djelovanja na lipidni profil nije u potpunosti razjašnjen, smatra se da potencijalni hipolipemični mehanizmi djelovanja oleuropeina obuhvaćaju inhibiciju intestinalne apsorpcije lipida, proizvodnju lipida u jetri ili stimulaciju bilijarne sekrecije kolesterola i sekrecije kolesterola fecesom (Ahmadvand i sur., 2014). U istraživanju na dijabetičkim štakorima oleuropein je povisio sniženu koncentraciju HDL-a za 34%, a snizio povišene plazmatske razine TG-a za 23%, ukupnog kolesterola za 25%, LDL-a za 55% i VLDL-a za 23% kao i indeks aterogeneze (42%) i omjer srčanog rizika (52%) pokazavši time potencijalne preventivne učinke na aterosklerozu (Ahmadvand i sur., 2014). Slični rezultati

pokazali su se i na zečevima koji bili hranjeni maslinovim uljem obogaćenim oleuropeinom (Coni i sur., 2000).

Osim učinaka na lipidni profil, oleuropein je pokazao učinke i na metabolizam lipida, odnosno njihovu distribuciju u organizmu. U *in vivo* istraživanju na hiperlipidemičnim štakorima, težine jetara hiperlipidemičnih štakora tretiranih i netretiranih oleuropeinom su se značajno razlikovale što autori objašnjavaju redukcijom akumulacije lipida u jetri tretiranih štakora (Jemai i sur., 2008). Sličan učinak je pokazao i OLE na štakorima s metaboličkim, kardiovaskularnim i hepatičkim strukturnim i funkcionalnim promjenama koji je, između ostalog, značajno reducirao odlaganje masnoća u jetri (Poyudal i sur, 2010). Osim navedenog smanjenja akumulacije lipida u jetri, oleuropein je pokazao i kratkotrajni *in vitro* učinak na sintezu lipida u staničnoj kulturi hepatocita štakora inhibirajući i *de novo* sintezu masnih kiselina (48%) i *de novo* sintezu kolesterola (25%) smanjenjem aktivnosti ključnih enzima u spomenutim procesima, ne utječući pri tome na održivost stanica (Priore i sur., 2014). Autori smatraju da se mehanizam odvija na razini unutarstanične signalizacije. S obzirom da je postprandijalna lipemija poznati faktor rizika ateroskleroze, potencijalan učinak oleuropeina na biosintezu lipida mogao bi biti prigodan za prevenciju dislipidemija, kardiovaskularnih bolesti i pretilosti (Bulotta i sur., 2013). Nadalje, osim pozitivnog mijenjanja lipidnog profila plazme u štakorima, oleuropein je reducirao njihovu tjelesnu težinu, postotak perirealnog adipoznog tkiva i postotak pasjemenih masnih jastučića te je povisio urinarne koncentracije adrenalina i noradrenalina. Osim navedenog, oleuropein je i povećao proces termogeneze, odnosno metabolizam TG-a u smeđem masnom tkivu štakora povećanjem količine UCP-1 proteina (*eng.* Uncoupling Protein-1) odgovornog za spomenuti proces (Oi-Kano i sur., 2008). Osim toga, oleuropein je, u koncentraciji višoj od 100  $\mu\text{M}$ , pokazao *in vitro* inhibitorski učinak na diferencijaciju preadipocita i akumulaciju lipida, odnosno utjecao je na regulaciju veličine masnih stanica na razini transkripcije, inhibirajući ekspresiju gena za adipocitni PPAR $\gamma$  receptor (nuklearni receptor koji djeluje kao senzor lipida te, kada je aktiviran, može značajno preusmjeravati metaboličke reakcije) (Svobodova i sur., 2014). Ovi rezultati indiciraju da potencijalna djelovanja oleuropeina na smanjenje akumulacije lipida, povećanje katabolizma TG-a i općenito na distribuciju lipida mogu imati protektivno, ako ne i terapijski učinak na pretilost (regulacijom ekspresije gena uključenih u adipogenezu i termogenezu visceralnog adipoznog tkiva) i kardiovaskularne bolesti (Oi-Kano i sur., 2008).

Oksidacija lipoproteina je jedan od ključnih koraka u inicijaciji aterosklerotičnih lezija jer povećava njihovu citotoksičnost prema endotelnim stanicama što dovodi do formacije aterosklerotičnog plaka (Coni i sur., 2000). Dapače, kloracija apoproteina HOCl-om jedan je

od prvih uvjeta za razvoj ateroskleroze jer makrofagi prepoznaju lipoproteine upravo po oksidiranom apoproteinu (Bulotta i sur., 2013). Nadalje, oksidirani LDL (oxLDL) važan je induktor ekspresije proupalnih citokina poput NF- $\kappa$ B (koji ima posrednu i neposrednu ulogu u patogenezi ateroskleroze i upalnih procesa) i IL-1 (koji može potaknuti transkripciju površinskih LDL receptora i dodatno pojačati aterosklerotične procese) te kemotaktičnih molekula koje dodatno privlače (ox)LDL na endotelne stanice (Bulotta i sur., 2013). Oksidacija HDL-a reducira njegovu funkcionalnost, odnosno onemogućuje transport akumuliranog kolesterola iz makrofaga na HDL (kompenzatorni mehanizam koji aktiviraju makrofagi kao odgovor na prekomjerni unos lipida) što doprinosi patogenezi ateroskleroze. Oleuropein je pokazao sposobnost *in vivo* regeneracije spomenutog transporta promjenama u regulaciji gena za sintezu proteina uključenih u efluks kolesterola (Farràs i sur., 2013). Osim oksidiranih lipoproteina, oštećenju endotela (i aterosklerozi) doprinose i citotoksični oksisteroli koji nastaju oksidacijom (ne)esterificiranog kolesterola, a potenciraju i kalcifikaciju ateroma (Visioli i sur., 2002a).

Učinci oleuropeina na lipidnu peroksidaciju opisani su u odjeljku 4.2.1.2., a obuhvaćaju vezanje slobodnih radikala i sprječavanje posljedične lančane reakcije nastajanja novih, inhibiciju MPO, potencijalno smanjenje oksidativnosti lipoproteina, regeneraciju oksidiranog  $\alpha$ -tokoferola i povišenje plazmatskih koncentracija istog te poboljšanje općenitog endogenog antioksidativnog obrambenog sustava organizma.

Smatra se da se nakon unosa maslinovog ulja (ili drugih izvora), oleuropein i fenoli općenito otapaju u lipoproteinskim česticama ili se pričvrste za njih u krvnoj plazmi. Hipoteza jeda se fenolni spojevi vežu na lipoproteine ionskom interakcijom s nabijenim aminokiselinskim ostacima na njihovoj površini i na taj način sprječavaju njihovu oksidaciju (Vissers i sur., 2004).

#### **4.2.3.3. *Antiaterogeni učinci***

U podlozi većine CVD nalazi se ateroskleroza. Ateroskleroza je kompleksno stanje koje obuhvaća poremećeni transport lipida i metabolički poremećaj s kroničnom upalom i trombozom. Osnova ateroskleroze je stvaranje aterosklerotičnog plaka (ateroma) postupnim taloženjem lipoproteina i ostalih lipida u unutarnji endotelni sloj stijenki arterija što dovodi do stvaranja masnih pruga, otvrdnjavanja plakova i trombotičnih procesa unutar endotela. Glavni faktori rizika za njezin razvoj su povišene razine LDL-a i VLDL-a, snižene razine HDL-a, hipertenzija, pušenje, prekomjerna tjelesna težina i/ili pretilost, dijabetes i sjedilački način

života (Quiles i sur., 2006). Povećani oksidativni stres, uzrok početnog oštećenja endotela i oksidacije lipida i proteina u stijenkama arterija, smatra se glavnim uzročnikom nastanka ateroskleroze.

Antiaterogeni učinci oleuropeina uključuju modifikaciju plazmatskog lipidnog profila, indukciju zaštite od lipidne peroksidacije, modulaciju tromboze i fibrinolize te protuupalne učinke (Quiles i sur., 2006). Antioksidativni učinci (npr. vezanje slobodnih radikala, inhibicija lipidne peroksidacije i ekspresije MPO), kao i protuupalni i hipolipemični učinci oleuropeina opisani su u prethodnim poglavljima tako da će u ovom poglavlju biti opisani učinci oleuropeina na endotel krvnih žila, agregaciju trombocita i ishemiju miokarda (kao potencijalnu posljedicu ateroskleroze).

Endotel je jednoslojni unutarnji pokrov krvnih žila čija je zadaća, između ostalog, osigurati antiagregativnu površinu za koagulanse i trombocite u normalnim fiziološkim uvjetima te održavanje vaskularne hemodinamike i regulacije krvnog tlaka izlučivanjem raznih medijatora, ponajprije NO. Aktivacija endotela, odnosno njegovo oštećenje i poremećena normalna fiziološka funkcija obilježja su kardiovaskularnih bolesti. Predstavljaju inicijalne čimbenike ateroskleroze i tromboze, a važnu ulogu imaju i u patologiji hipertenzije. Endotelna disfunkcija je karakterizirana mikrooštećenjima endotelnog sloja (uzrokovanog oksidacijskim stresom), aktivacijom adhezijskih molekula, regrutacijom i infiltracijom leukocita i lipida u stijenke arterijskih žila, agregacijom trombocita, proliferacijom stanica glatkih mišića (*eng.* Smooth Muscle Cell; SMC), poremećenom vazomotornom kontrolom, smanjenom bioraspoloživošću NO (što dovodi i do hipertenzije) i povišenim razinama ROS-a (Quiles i sur., 2006). Od spomenutih karakteristika endotelne disfunkcije, oleuropein može utjecati na gotovo svaki navedeni segment. Oleuropein je pokazao sposobnost inhibicije iNOS-a na transkripcijskoj razini i smanjenja posljedične proizvodnje upalnog NO (odjeljak 4.2.2.1.), dok na proizvodnju „vazodilatatornog“ NO (enzimom eNOS) nije pokazao učinak. Nadalje, prekomjerna proliferacija SMC stanica je također karakteristika endotelne disfunkcije na koju je oleuropein pokazao učinak. U *in vitro* ispitivanju na kulturi SMC stanica oleuropein je gotovo u potpunosti (92%) reverzibilno inhibirao proliferaciju stanica u G1-S fazi staničnog ciklusa inhibirajući aktivaciju ERK-1/2 kinaza, jednog od najvažnijih regulatora staničnog ciklusa (Abe i sur., 2011). Nadalje, oleuropein i njegov aglikon su *in vitro* pokazali i učinak inhibicije ekspresije adhezijskih molekula VCAM-1, ICAM-1 i E-selektina inhibicijom transkripcijskih faktora NF- $\kappa$ B i AP-1 što za posljedicu ima izostanak/smanjenje adhezije monocita na humane endotelne stanice (Carluccio i sur., 2003). Osim toga, oleuropein je *in vitro* pokazao protektivni učinak na cirkulirajuće prekursorske

endotelne stanice (*eng.* Endothelial Progenitor Cells; EPC) koje imaju ključnu ulogu u regeneraciji oštećenog vaskularnog endotela i funkcionalnosti kardiovaskularnog sustava, usporivši njihovo starenje i povećavši njihovu sposobnost regeneracije narušene oksidativnim stresom (Parzonko i sur., 2013).

Agregacija trombocita često prati i pogoršava aterosklerozu jer oštećenja vaskularnog endotela stimuliraju aktivnost trombocita i njihovu agregaciju (Bulotta i sur., 2013). Oleuropein je pokazao inhibitorski učinak na agregaciju trombocita, ali točan mehanizam djelovanja je još uvijek nejasan. U *ex vivo* ispitivanju na uzorcima krvi iz zdravih donora OLE je reducirao agregaciju trombocita snažnom inhibicijom enzima cAMP-fosfodiesteraze (cAMP-PDE) (Dell' Agli i sur., 2008). cAMP je glavni inhibitor mobilizacije kalcijevih iona u stanici što je važno s obzirom da je komunikacija kalcijem osnovni faktor u regrutaciji i/ili translokaciji trombocita prilikom stvaranja trombocitnih agregata (Zbidi i sur., 2009). Stoga, povišenjem staničnih koncentracija cAMP-a oleuropein potencijalno može inhibirati/reducirati agregaciju trombocita (Scheffler i sur., 2008). U drugom *ex vivo* istraživanju na humanim trombocitima od zdravih donora i donora oboljelih od dijabetesa oleuropein je u oba uzorka reducirao agregaciju trombocita stimuliranu trombinom, reducirajući unutarstaničnu signalizaciju kalcijem, s tim da je jači učinak pokazao na uzorcima donora oboljelih od dijabetesa (Zbidi i sur., 2009). S obzirom da se čini da je mehanizam inhibitornog djelovanja oleuropeina uvelike povezan s njegovim djelovanjem na signalne putovime posredovane ionima kalcija, inhibiciji agregacije trombocita bi onda možda mogla doprinijeti i potencijalna sposobnost oleuropeina da blokira  $I_{Ca,L}$ .

Ishemija je stanje ograničene ili potpuno spriječene opskrbe nekog tkiva krvlju koja se javlja zbog okluzija krvnih žila (primjerice, zbog ateroma, masnih naslaga ili tromboze) te uzrokuje nedostatak kisika (hipoksija) i glukoze u zahvaćenom tkivu. Spomenuto uzrokuje patološku angiogenezu proliferacijom i migracijom SMC stanica te prekomjernom proizvodnjom oksidativnih molekula, između ostalih i NO, a sve zajedno rezultira oštećenjem i/ili poremećajem funkcije zahvaćenog tkiva (Andreadou i sur., 2006). Osim toga, posljedično nastali peroksinitrit koji razara proteine vezivnog tkiva izravnim oksidativnim oštećenjem i patološkom aktivacijom MMP-a, potencira ekspresiju proupalnih citokina i potiče sve već spomenute učinke oksidativnog stresa (Czerwińska i sur., 2011; Andreadou i sur., 2006; Quiles i sur., 2006). Oleuropein je pokazao protektivni učinak na oštećenja koja nastaju postishemičnom reperfuzijom temeljen na njegovim antioksidativnim mehanizmima djelovanja. *In vivo* istraživanje na hiperkolesterolemičnim zečevima pokazalo je nakon postishemične reperfuzije srca sniženi postotak infarkta miokarda (> 50%), nepromijenjene

produkte oksidacije plazmatskih lipida i proteina, reducirane razine nitrata i nitrita te značajno snižene plazmatske koncentracije ukupnog kolesterola i TG-a kao posljedicu djelovanja oleuropeina (Andreadou i sur., 2006). Srce je, zbog velike zastupljenosti mitohondrija i slabijeg općeg antioksidativnog sustava podložnije oksidativnim oštećenjima u odnosu na druge organe. Prolongirana ishemija i naknadna reperfuzija miokarda, osim naglog povećanja proizvodnje oksidativnih spojeva, uzrokuju i smanjenje aktivnosti antioksidativnih enzima u srcu zbog čega ono postaje veoma podložno postishemičnim oksidativnim ozljedama. Oleuropein omogućava kardioprotektivnu zaštitu čak i prije pojave ishemije djelovanjem na stabilnost eritrocitne SOD koja održava miokard u „antioksidativnom“ stanju tijekom ishemije i reperfuzije. Andreadou i suradnici smatraju da su za navedeni protektivni učinak oleuropeina na reperfudirani miokard, osim antioksidativnih mehanizama, zaslužni i hipolipemični mehanizmi djelovanja. U drugom *in vivo* istraživanju su štakori, tretirani oleuropeinom prije ishemije i naknadne reperfuzije, pokazali znatno smanjene razine oksidiranog GSH (marker izloženosti miokarda oksidativnom stresu) i kreatinin kinaze (marker staničnih oštećenja miokarda) u perfuzatu (Barbaro i sur., 2014)

Iz svega navedenog može se zaključiti da su mehanizmi kardioprotektivnog i antiaterogenog djelovanja oleuropeina isprepleteni i još uvijek nedovoljno istraženi, ali bi se generalno moglo reći da se temelje na antioksidativnim, hipolipemičnim i protuupalnim djelovanjima.

#### **4.2.3.4. Ostali kardioprotektivni učinci**

Oleuropein je pokazao i potencijalnu kardioprotektivnu aktivnost u slučaju kardiomiopatije inducirane doksorubicinom (DXR). Doksorubicin je trenutno najučinkovitiji antineoplastik u kliničkoj praksi, ali mu je primjena ograničena zbog akutne i kronične kardiotsičnosti kao nuspojave povezane s njegovim korištenjem (Andreadou i sur., 2014). Osim inhibitornog učinka na topoizomerazu II (enzim koji odmotava lance DNA u procesu njezine replikacije), doksorubicin potiče i stvaranje slobodnih radikala što djeluje citotoksično na kancerogene stanice, ali i na stanice domaćina, pogotovo na kardiomiocite koji su iznimno osjetljivi na oksidativni stres (Quiles i sur., 2006). Oleuropein je uzrokovao značajno smanjenje oštećenja miokarda štakora koji su bili istovremeno tretirani oleuropeinom i DXR-om (Andreadou i sur., 2014). Skupine tretirane oleuropeinom pokazale su znatno smanjenje poremećaja srčanog metabolizma poput narušene kontraktilnosti lijevog ventrikula te upalnih i degenerativnih patoloških lezija miokarda. Osim toga, utvrđeno je i uravnoteženje poremećenih metaboličkih procesa (npr. pojačana razgradnja proteina,...), regeneracija



poremećenih signalnih putova (npr. AMPK), značajno smanjenje nitro-oksidativnog stresa i smanjenje ekspresije proupalnih i proapoptotičkih medijatora. Autori smatraju da glavni mehanizam djelovanja oleuropeina nije, kako se donedavno mislilo, izravan antioksidativni učinak nego aktivacija AMPK i drugih signalnih putova te inhibicija iNOS-a (Andreadou i sur., 2014).

Nadalje, čini se da oleuropein posjeduje i antiaritmička svojstva. U *in vivo* istraživanju na štakorima s aritmijom induciranom akotininom, oleuropein je produžio vremenski period početka aritmije i ventrikularne tahikardije, povećao broj reverzibilnih ventrikularnih fibrilacija (indikator povećane rezistencije srčanog mišića prema potpunom srčanom arestu) i vremenski period prije nastupa smrti. Mehanizam djelovanja nije utvrđen, ali se zna da ne ovisi o hemodinamskim parametrima (Esmailidehaja i sur., 2012). Osim toga, oleuropein je pokazao antiaritmički učinak i u *ex vivo* ispitivanju na zečjim izoliranim miokardima i *in vitro* kultiviranim kardiomiocitima reverzibilno inhibirajući  $I_{Ca,L}$ , ali ne utječući na ionske kanale natrija i kalija (Scheffler i sur., 2008). Autori su zabilježili i određene proaritmičke aktivnosti (konkretno, bradikardiju), ali izmjereni parametri nisu bili izvan dozvoljenih normalnih granica. Mehanizam inhibicije  $I_{Ca,L}$  pripisuje se i *in vitro* opaženom vazodilatatorskom učinku oleuropeina jer se pokazalo da je isti neovisan o interakciji s endotelom i njegovim medijatorima (Barbaro i sur., 2014).

#### **4.2.4. Antidijabetički i protektivni učinci na metabolizam**

Posljedice hiperglikemije, hiperinzulinemije i rezistencije na inzulin, poput glikacije (inaktivacije) enzima, oksidativnog stresa i smanjenja cjelokupnog antioksidativnog statusa organizma te modifikacije lipidnog profila, procesa fibrinolize i brojnih drugih procesa doprinose patogenezi različitih komplikacija dijabetesa, uključujući i vaskularne bolesti, ponajviše aterosklerozi (Quiles i sur., 2006).

Potencijalni mehanizmi hipoglikemijskog djelovanja oleuropeina obuhvaćaju: (1) izravne mehanizme (antioksidativne mehanizme smanjenja oksidativnog stresa što posljedično štiti  $\beta$ -stanice gušterače od oštećenja) i (2) neizravne mehanizme (stimulacija glukozom inducirane sekrecije inzulina (sekretogogna aktivnost), povećanje osjetljivosti stanica na aktivnost inzulina (što rezultira povećanim perifernim unosom glukoze), inhibicija glikacije lipoproteina, enzima i proteina uključenih u metabolizam lipida i lipoproteina i dr. ) (Ahmadvand i sur., 2014; Al-Azzawie i sur., 2006).

U animalnim eksperimentalnim modelima s dijabetesom uzrokovanim aloksanom, oleuropein je, osim utjecaja na modificirani lipidni profil (odjeljak 4.2.3.2.), značajno smanjio povišene razine glikoziliranog hemoglobina (HbA1c; mjera količine glukoze u eritrocitima), koncentracije glukoze u krvi (GUK) natašte (29%) i druge poremećene parametre (Ahmadvand i sur., 2014; Al-Azzawie i sur., 2006). Autori smatraju da su ovi rezultati posljedica kombinacije nekoliko mehanizama djelovanja oleuropeina, od antioksidativnih do mehanizama djelovanja izravno na čimbenike metabolizma glukoze (Ahmadvand i sur., 2014). Nadalje, oleuropein je *in vitro* pokazao potencijalni protektivni učinak na sekretorne  $\beta$ -stanice gušterače smanjenjem oksidativnih oštećenja, smanjenjem nekroze i apoptoze uzrokovanih vodikovim peroksidom (metaboličkim signalom za glukozom stimuliranu sekreciju inzulina koji u prisutnosti oksidativnog stresa negativno utječe na integritet i funkciju  $\beta$ -stanica) te je u potpunosti povratio njihovu sposobnost sekrecije inzulina iz stanica (Cumaoglu i sur., 2011). Osim toga, čini se da aglikon oleuropeina posjeduje i sposobnost usporavanja progresije DMT2 (diabetes mellitus tip 2) dokazanu *in vitro* inhibicijom citotoksičnog nakupljanja amilina (obilježje DMT2), peptidnog hormona koji se izlučuje zajedno s inzulinom, a ima ulogu u regulaciji postprandijalne glikemije (sprječava postprandijalne pikove GUK-a). Spomenuta inhibicija nakupljanja amilina je, čini se, posljedica interferencije oleuropeina sa staničnim procesima stvaranja vlaknastih nakupina amilina (Rigacci i sur., 2010).

Spomenuti učinci oleuropeina primjećeni su i u kliničkim studijama na ljudima. U studiji na muškarcima srednje dobi s prekomjernom tjelesnom težinom, DMT2 i povećanim rizikom za razvoj metaboličkog sindroma, svakodnevna primjena OLE (51.1 mg oleuropeina), značajno je poboljšala sekretorni kapacitet  $\beta$ -stanica (28%) i osjetljivost stanica na inzulin (15%) (De Bock i sur., 2013). Autori smatraju da ovi rezultati imaju klinički značaj jer su usporedivi s uobičajenim terapijskim tretmanima dijabetesa, točnije, s učincima metformina (smatraju da su primjećeni učinci jači nego što bi bili da su ispitanici koristili metformin). U drugoj studiji je svakodnevna primjena OLE tijekom 14 tjedana također poboljšala homeostazu glukoze, odnosno primijećena su značajna sniženja serumskih razina HbA1c, inzulina natašte i postprandijalnog GUK-a (Wainstein i sur., 2012). Autori smatraju da OLE predstavlja potencijalno učinkovitu dodatnu terapiju koja normalizira homeostazu glukoze kod osoba oboljelih od dijabetesa. Također su zaključili na temelju rezultata ispitivanja na animalnom modelu, da OLE djeluje poput inhibitora  $\alpha$ -glukozidaze, reducirajući apsorpciju ugljikohidrata u GIT-u štakora. Osim toga, OLE je pokazao da ubrzava periferni stanični unos glukoze što posljedično dovodi do smanjenja GUK-a, a čini se i da inhibira aktivnost

pankreasne amilaze (Wainstein i sur., 2012). Međutim, u navedenim istraživanjima treba imati na umu da su korištene doze OLE, a time i oleuropeina, mnogo više u odnosu na količinu oleuropeina u maslinovom ulju.

Pretilost i dijabetes koji su karakterizirani rezistencijom na inzulin i posljedičnom hiperglikemijom, te hipertenzija i aterogena dislipidemija koje su često povezane s pretilošću, glavni su faktori rizika za razvoj metaboličkog sindroma koji povećava rizik od nastanka kardiovaskularnih bolesti. Glavne karakteristike metaboličkog sindroma su abdominalna pretilost, hipertenzija, dislipidemija i hiperglikemija. Smatra se da su temelj patogeneze metaboličkog sindroma primarni poremećaji u metabolizmu adipocita i dislipidemija što dovodi do smanjene osjetljivosti stanica na inzulin, vaskularnih disfunkcija te upalnih i trombotičkih sklonosti (Huang i sur., 2010). S obzirom da je oleuropein pokazao preventivne i potencijalno terapijske učinke na brojne čimbenike spomenutih procesa, postoje opravdane indicije da može utjecati i na spomenuto stanje (Huang i sur., 2010; Poyudal i sur, 2010).

#### **4.2.5. Antikancerogeni učinci**

Pokazalo se da prekomjerno nastajanje i akumulacija RONS-a imaju veliku ulogu u nastaku kancerogenih oboljenja (Obied i sur., 2012). Oksidativna oštećenja nukleinskih kiselina najčešće se manifestiraju promjenama na bazama (deaminacije i oksidacije baza) što rezultira povećanim brojem delecija i točkastih mutacija (Quiles i sur., 2006). S obzirom da su modifikacije DNA strukture i signalnih putova, kao i neravnoteža između količine nastalih modifikacija i sposobnosti stanice da iste popravi, izravni inicijalni mehanizmi razvoja kancerogenih oboljenja, antioksidativna svojstva oleuropeina čine važan dio njegovog antikancerogenog djelovanja što uključuje i preventivno djelovanje na mutagenezu i kancerogenezu (Obied i sur., 2012). Osim antioksidativnih i protuupalnih učinaka, oleuropein je pokazao i neke specifične antikancerogene učinke poput interferencije sa signalnim putovima, inhibicije proliferacije tumorskih stanica, indukcije apoptoze tumorskih stanica i inhibicije angiogeneze. Svoju učinkovitost pokazao je na modelima adenokarcinoma dojke i renalnih stanica, kolorektalnog karcinoma te karcinoma bubrežnog mjehura i prostate (Barbaro i sur., 2014).

Izravni antitumorski učinak oleuropein je pokazao *in vitro* inhibirajući proliferaciju i migraciju ljudskih tumorskih stanica naprednog stupnja. Osim toga, uzrokovao je tzv. ireverzibilno „zaokruživanje stanica“, fenomen koji je povezan s oštećenjem aktina citoskeleta živih stanica, čime je spriječio njihovu replikaciju, motilitet i invazivnost. Također je *in vivo* pokazao sposobnost potpune regresije tumora kod miševa koji spontano razvijaju

tumore. Nedostatak kohezivnosti i rahla struktura tumorskog tkiva miša opaženi prije potpune regresije tumora pokazuju izravan učinak oleuropeina na tumor, ne samo njegovo djelovanje kao antioksidansa. Rezultati su pokazali i da aglikon oleuropeina ima slabiji antikancerogeni učinak u odnosu na oleuropein (Hamdi i Castellon, 2005). Navedeno autori objašnjavaju nejednakom ekspresijom GLUT transportera (membranski transporteri glukoze) u svim tumorskim stanicama, zbog čega je i osjetljivost tumorskih stanica različita. Nadalje, oleuropein je pokazao i da je sposoban reducirati/inhibirati proliferaciju i inducirati apoptozu stanica karcinoma dojke *in vitro* i *in vivo* (Sepporta i sur., 2014). Iako oleuropein i estrogene imaju sličan funkcionalni dio strukture (aromatski hidroksilirani prsten), čini se da oleuropein ne djeluje kao agonist estrogena, nego interferira sa signalnim putovima ovisnima o estrogenu, primjerice MAPK što je uskladu s opažanjima spomenutima u odjeljku 4.2.2.1. Nadalje, oleuropein je *in vivo* pokazao kemopreventivni učinak na štakorima s karcinomom skvamoznih stanica jezika inhibirajući pojavnost tumora, njihovu veličinu i proliferaciju (Sepporta i sur., 2014). I aglikon oleuropeina je pokazao antikancerogeni učinak na karcinom dojke inhibirajući *in vitro* rast tumora i djelujući proapoptotično na stanice karcinoma dojke inhibicijom pojačane ekspresije i aktivnosti HER2 onkogen, najvjerojatnije na razini transkripcije (Menendez i sur., 2007). HER2 je *proto*-onkogen koji ima glavnu ulogu u zloćudnim transformacijama, tumorogenezi, metastaziranju i neuspješnim tretmanima karcinoma dojke. Spomenuti učinak sličan je učinku trastuzumaba (monoklonsko protutijelo koje se koristi kao terapija određenih vrsta karcinoma dojke). Tijekom kronične izloženosti stanica karcinoma trastuzumabu može doći do pojave rezistencije koju je aglikon oleuropeina nadjačao u *in vitro* uvjetima suprimirajući iznimno visoke razine HER2 i time neizravno povećao djelotvornost trastuzumaba te pokazao mogućnost njihovog sinergističkog djelovanja. U ovom slučaju pokazalo se da glukozidni oblik ima mnogo slabije djelovanje u odnosu na odgovarajući aglikon (Menendez i sur., 2007). Nadalje, *in vitro* kemopreventivni učinak na stanice kolorektalnog karcinoma, oleuropein je pokazao inhibicijom nekoliko stadija karcinogeneze (inicijacije, proliferacije i metastaziranja) što je rezultat inhibicije signalnih putova p38/CREB, i posljedičnom inhibicijom ekspresije gena za COX-2 čija je pojačana ekspresija karakteristična za stanice kolorektalnog karcinoma (Corona i sur., 2007).

Osim izravnog antitumorskog učinka, djelovanje oleuropeina može biti povezano i s njegovim antiangiogenim svojstvima. Tumorskom tkivu je za rast potrebna dodatna opskrba krvlju zbog čega ono inducira dodatnu aktivaciju i proliferaciju endotela (Barbaro i sur., 2014). Osim opisanih antiangiogenih učinaka (odjeljak 4.2.3.3.), oleuropein je snizio povećani broj krvnih žila i karcinogenezu te spriječio nastanak kroničnih oštećenja na koži

miševa uzrokovanih UVB zračenjem (Grawish i sur., 2011). Naime, smatra se da su spomenuti učinci, osim redukcije oksidativnih oštećenja DNA u epidermisu, posljedica i inhibicije ekspresije vaskularnog faktora rasta (VEGF) i različitih MMP-A putem redukcije unutarstaničnih razina COX-2 (Barbaro i sur., 2014; Obied i sur., 2012). Nadalje, oleuropein je pokazao i antimetastatski učinak (Sepporta i sur., 2014; Hassan i sur., 2012). Tumorske metastazirane stanice pojačano sintetiziraju MMP kako bi olakšale invaziju u tkivo. Prekomjerna proizvodnja MMP u stanicama karcinoma rezultat je suprimiranih gena koji inhibiraju ekspresiju gena za MMP i apoptozu stanice te pojačane ekspresije gena za MMP. Oleuropein je *in vitro* potaknuo ekspresiju gena koji inhibiraju ekspresiju gena za MMP i apoptozu stanice te suprimirao ekspresiju gena za MMP što je rezultiralo apoptozom stanica karcinoma (Hassan i sur., 2012). Oleuropein je inhibirao i metastaziranje tumora u pluća ovariektomiziranih miševa u visokom postotku (80%), ali autori nisu utvrdili kojim mehanizmom djelovanja (Sepporta i sur., 2014).

#### **4.2.6. Neuroprotektivni učinci**

Mnoge neurodegenerativne bolesti, uključujući Parkinsonovu i Alzheimerovu bolest, posljedica su progresivnog gubitka strukture i/ili funkcije neurona čija etiologija još uvijek nije u potpunosti razjašnjena (Barbaro i sur., 2014). Poznato je da oštećenja mitohondrijske DNA i oksidativni stres, osim što su ključni faktori procesa starenja, doprinose razvoju i progresiji neurodegenerativnih bolesti (Omar, 2010). Stoga je antioksidativno djelovanje oleuropeina sastavni dio njegovog neuroprotektivnog učinka.

U *in vivo* istraživanju u kojem je starijim štakorima intraperitonealno apliciran oleuropein jednom dnevno tijekom 6 mjeseci, aktivnost antioksidativnih enzima u srednjem mozgu bila je znatno veća nego kod netretiranih štakora (Barbaro i sur., 2014). Osim toga, tretirani štakori su imali veći broj neurona u dijelu srednjeg mozga zvanog „substantia nigra“, odgovornog za, između ostalog, i motoričke sposobnosti čovjeka što indicira da bi oleuropein mogao imati zaštitne učinke na gubitak dopaminergičkih neurona te potencijalno terapijski učinak u liječenju Parkinsonove bolesti (Barbaro i sur., 2014).

Osim toga, oleuropein posjeduje i potencijalni terapijski učinak na Alzheimerovu bolest (*eng.* Alzheimer disease, AD). Etiologija AD još uvijek nije u potpunosti razjašnjena, ali se zna da je bolest karakterizirana neurotoksičnim izvanstaničnim plakovima A $\beta$  proteina i unutarstaničnim neurofibrilnim čvorovima Tau-proteina ( $\tau$ ) čije stvaranje potiče ponajviše oksidativni stres i slobodni radikali, a sve zajedno u konačnici dovodi do neurodegeneracije, gubitka kognitivnih sposobnosti i prerane smrti (Daccache i sur., 2011; Bazoti i sur., 2006).

A $\beta$  i  $\tau$ -proteini su inače normalni proteini središnjeg živčanog sustava. Uloga A $\beta$  proteina nije u potpunosti jasna dok  $\tau$ -proteini imaju strukturnu ulogu tj. stabiliziraju stanične mikrotubule neurona. Čini se da oleuropein ima preventivne učinke na patološku agregaciju obaju proteina. Nadalje, pokazalo se da se oleuropein veže nekovalentnim vezama na prekursor A $\beta$  i/ili njegove oksidirane oblike, stabilizirajući time njihovu strukturu i potencijalno inhibirajući njihovu agregaciju, odnosno antiamiloidogeno djelovanje (Bazoti i sur., 2006). Osim toga, oleuropein i njegov aglikon *in vitro* su pokazali sposobnost inhibicije agregacije  $\tau$ -proteina u fibrilne čvorove koji doprinose intraneuralnim i glijalnim oštećenjima (Daccache i sur., 2011). Spomenuti učinci bi mogli biti korisni i kod sporadičnog miozitisa inkluzijskih tjelešaca (s-IBM, *eng. sporadic Inclusion Body Myositis*), rijetke degenerativne bolesti mišića nepoznate etiologije koja je također karakterizirana, između ostalog, i agregatima A $\beta$  i  $\tau$ -proteina u mišićnim vlaknima. Dapače, aglikon oleuropeina je pokazao spomenute učinke *in vivo*, na crvićima kao pojednostavljenom modelu AD-a i s-IBM-a, reduciravši nastajanje agregata A $\beta$  i  $\tau$ -proteina, čime se značajno smanjila paraliza i povisio životni vijek crvića (Diomedea i sur., 2013). Iako mehanizam djelovanja nije u potpunosti razjašnjen, autori su utvrdili da opaženi učinci nisu posljedica antioksidativnog djelovanja što ide u prilog hipotezi o izravnom djelovanju aglikona oleuropeina (i glukozidnog oblika) na agregaciju spomenutih proteina. Slične učinke, pogotovo poboljšanje kognitivnih sposobnosti i konzistencije živčanog tkiva, aglikon oleuropeina je pokazao *in vivo* i na miševima reducirajući nakupljanje A $\beta$  plakova aktivacijom mikroglia i poboljšanjem lizosomalnog sustava (Grossi i sur., 2013).

Nadalje, postoji bliska poveznica između ateroskleroze i AD-a. Osim što su to bolesti povezane sa starenjem, povezuje ih i sličan mehanizam patogeneze karakterizan nenormalnom akumulacijom normalnih metabolita (kolesterola, A $\beta$  i  $\tau$ ) koja prethodi kliničkim simptomima i razvoju bolesti (Bulotta i sur., 2013; Omar, 2010). Dapače, postoje indicije da općeniti hipokolesterolemični učinci mogu utjecati i na taloženje A $\beta$  (Omar, 2010). Upalni procesi su također uključeni u kliničku manifestaciju AD, budući da agregati A $\beta$  stimuliraju makrofage i mikroglije A $\beta$  (Bazoti i sur., 2006). Modifikacija nakupljanja spomenutih metabolita predstavlja potencijalnu terapijsku strategiju koja se trenutno istražuje te se smatra da bi oleuropein (u oba oblika) mogao biti učinkovit u zaštiti od neurodegenerativnih bolesti izravnim (prethodno spomenutim) i neizravnim djelovanjem (na temelju svojih antioksidativnih, protuupalnih, hipokolesterolemičnih i kardioprotektivnih učinaka) (Bulotta i sur., 2013).

Osim utjecaja na neurodegenerativne bolesti, oleuropein može pokazati neuroprotektivni učinak i na živčana tkiva oštećena hipoksijom i naknadnom reoksigenacijom, cerebralnom ishemijom i mehaničkim oštećenjima (Barbaro i sur., 2014). Hipoksijom i naknadnom reoksigenacijom tkiva dolazi do naglog oksidativnog stresa u tkivu pa oleuropein svojim antioksidativnim učincima može imati neuroprotektivni učinak. Nadalje, nakon mehaničkog oštećenja tkiva započinju sekundarna oštećenja posredovana brojnim staničnim, molekularnim i biokemijskim kaskadama koje, između ostalog, uzrokuju i apoptozu kao važan faktor sekundarnih oštećenja (Khalatbary i Zarrinjoei, 2012). Inhibicija brojnih signalnih putova koju je oleuropein pokazao doprinosi njegovom neuroprotektivnim učinku i u ovom segmentu (odjeljak 4.2.2.) .

Oleuropein je pokazao i *in vivo* djelovanje na sindrom ustezanja od morfina (tzv. „apstinencijska kriza“) na štakorima ovisnima o morfinu (Esmaeili-Mahani i Zare, 2013). Osim potencijalnog mehanizma djelovanja aktivacijom  $\mu$ -OR, oleuropein je smanjio sindrom ustezanja potencirajući antinociceptivna svojstva morfina blokadom ekspresije morfinom-induciranih  $I_{Ca,L}$  (Esmaeili-Mahani i Zare, 2013).

#### **4.2.7. Antiinfektivni učinci**

Osim svog zaštitnog antiinfektivnog djelovanja na samu biljku, oleuropein i njegovi derivati pokazali su se učinkovitima i protiv infektivnih (mikro)organizama koji napadaju čovjeka. Neke Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, kao i mikoplazme i neki paraziti pokazali su se osjetljivima na antiproliferativno djelovanje oleuropeina što ga čini potencijalno preventivnom i terapijskom supstancom, iako podaci pokazuju da ne posjeduje široki spektar djelovanja (Bulotta i sur., 2013; Sudjana i sur, 2009). Mehanizam baktericidnog i/ili bakteriostatskog djelovanja oleuropeina još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, ali se smatra da su interferencija katekolnog dijela molekule s bakterijskom membranom i posljedični poremećaj membranskih peptidoglikana te njegova interferencija sa sintezom proteina i/ili njihovom denaturacijom, dio tog mehanizma (Furieri i sur., 2002). Osim toga, izravna stimulacija fagocitoze u ljudskom organizmu također može biti odgovorna za antimikrobni učinak oleuropeina (i njegovih derivata) na mikrobe svih vrsta (Bulotta i sur., 2013). Ovoj hipotezi u prilog ide već spomenuto *in vitro* oleuropeinom uzrokovano poboljšanje funkcionalne aktivnosti mišjih makrofaga aktiviranih bakterijskim LPS-om što se očitovalo povećanom proizvodnjom baktericidnog i citostatičkog NO (poglavlje 4.2.2.) (Bulotta i sur., 2013). Osim toga, antiinfektivno djelovanje oleuropeina može biti i posljedica redukcije upalnog odgovora organizma na prisutan infektiv čemu u prilog ide *in vitro*

inhibicija otpuštanja proupalnih citokina TNF- i IL-6 prilikom inkubacije oleuropeina s aktiviranim monocitima i neutrofilima (Giamarellos-Bourboulis i sur., 2006).

#### **4.2.7.1. Antibakterijski učinci**

Smatra se da oleuropein ima jače antibakterijsko djelovanje na G(+) bakterije nego na G(-) bakterije zbog potencijalnih smetnji koje uzrokuje glukozna skupina oleuropeina pri prolasku kroz lipopolisaharidni sloj G(-) bakterija (Furieri i sur., 2002).

Od G(+)-bakterija, oleuropein je *in vitro* pokazao inhibitorne učinke na *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* i na *Lactobacillus spp.* Na *S. aureus* osjetljiv na penciline oleuropein je pokazao relativno slabi inhibitorni učinak ako se uzme u obzir da je minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) oleuropeina bila 130 puta viša od MIC ampicilina, dok je na rezistentnu *S. aureus* (MRSA) pokazao relativno jak inhibitorni učinak ako se uzme u obzir da je MIC oleuropeina varirala od jednake do 30 puta više koncentracije od MIC eritromicina (Sudjana i sur, 2009; Bisignano i sur., 1999). Osim toga, oleuropein je inhibirao, ovisno o dozi, proizvodnju enterotoksina B i nekih egzotoksina kod *S.aureus*. Pokazao je snažan, odnosno potpuni inhibitorni učinak na rast i razvoj bakterija *B. cereus* te na germinaciju i naknadni rast njihovih spora (Bulotta i sur., 2013). Također je pokazao inhibitorni učinak i na *L. monocytogenes* koja se prenosi hranom (Romero i sur., 2007). Iako je pokazao inhibitorni učinak i na *Lactobacillus spp*, učinio je to tek u koncentraciji > 100 mM što je mnogo više od koncentracija u njegovim prirodnim izvorima pa se može smatrati da zapravo nema učinka na njih (Landete i sur., 2008).

Od G(-)-bakterija, oleuropein je *in vitro* pokazao snažan inhibitorni učinak na rast određenih enterobakterija (*Salmonella enteridinis*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) i bakterija koje se prenose hranom (*Salmonella enterica*) te snažan *in vivo* inhibitorni učinak na *Pseudomonas aeruginosa* (Bulotta i sur., 2013; Romero i sur., 2007). Zečevima su intravenozno inokulirana dva soja *P. aeruginosa* (uzročnici sepse); jedan osjetljiv na antibiotike, a drugi multirezistentan (MRPA) (Giamarellos-Bourboulis i sur., 2006). U oba slučaja oleuropein je produžio životni vijek životinja, odnosno snizio smrtnost, i to za 40%, odnosno 20%, a u kombinaciji s amikacinom za 80%, odnosno 50%. Također je značajno snizio i broj bakterija u krvi životinja (i zasebno i u kombinaciji), smanjio upalni odgovor životinja te dodatno stimulirao fagocitozu monocita, odnosno makrofaga. Slab *in vitro* inhibitorni učinak pokazao je na G(-) bakterije *Vibrio spp* i *Salmonella typhi*, dok se na *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis* pokazao potpuno neučinkovitim (Bisignano i



sur., 1999). Nadalje, pokazalo se da je OLE učinkovit u inhibiciji G(-) bakterija *Campylobacter jejuni* i *Helicobacter pylori* (Sudjana i sur, 2009). Autori smatraju da OLE može imati ulogu u regulaciji sastava gastrointestinalne flore selektivno reducirajući količinu *H. Pylori* i *C. Jejuni*, ne utječući pri tome na tzv. „dobre bakterije“ *Lactobacillus spp* (Sudjana i sur, 2009; Landete i sur., 2008). Osim toga, postoji hipoteza da oleuropein, peroralno primjenjen, dospijeva i u kolon gdje ga crijevna mikroflora razgrađuje te da bi mogao imati pozitivna probiotička svojstva ako bi ga „dobre bakterije“ (*Lactobacillus spp*, *Bifidobacteria spp*) mogle iskoristiti kao izvor ugljika, a *Clostridium* i *E.Coli* ne (Landete i sur., 2008). Pokazalo se da sojevi bakterije roda *Lactobacillus* metaboliziraju oleuropein pretvarajući ga većinom u hidroksitirosol što ide u prilog spomenutoj hipotezi. Ono što je bitno spomenuti jest da je u ispitivanjima antibakterijskog inhibitornog učinka nekog spoja potrebno naglasiti o kojem se varijetetu radi jer nisu svi varijeteti jednako osjetljivi/otpotni. Primjerice, Bisignano i suradnici su ispitivali dva različita soja iste sorte bakterije (*S. aureus*), a rezultati su se pokazali značajno drugačijima (Bisignano i sur., 1999). Zbog toga može doći do različitih i suprotnih interpretacija rezultata.

#### **4.2.7.2. Antiviralni učinci**

Oleuropein je *in vitro* pokazao snažni antiviralni učinak na respiratorni sincicijski virus (RSV),  $IC_{50} = 23.4 \mu\text{g/mL}$ , i na virus parainfluence tipa 3 (Para 3),  $IC_{50} = 11.7 \mu\text{g/mL}$  (Ma i sur., 2001). Osim toga, pokazao je visoki terapijski indeks (TI; omjer najviše netoksične doze i minimalne učinkovite doze) kod RSV-a, usporediv s TI-om ribavarina (odobrenog lijeka za tretman RSV infekcija kod ljudi), dok je kod Para 3 pokazao čak i viši TI. Međutim, oleuropein se pokazao neučinkovitim na herpes simplex virus -1 (HSV-1) i na virus influence -tip A (Flu A) (Ma i sur., 2001). Osim toga, autori su zaključili da antioksidativni mehanizmi djelovanja oleuropeina nisu izravno uključeni u spomenute antiviralne učinke. Nadalje, čini se da oleuropein ima snažan antiviralni učinak na virus humane imunodeficijencije - tip 1 (HIV-1). Naime, oleuropein se *in vitro* pokazao, u nanomolarnim koncentracijama, kao snažan inhibitor dviju faza životnog ciklusa HIV-1: stanične transmisije i replikacije. Konkretno, smatra se da se oleuropein izravno veže na: (1) podjedinice gp41 površinskog glikoproteina HIV-1 čime sprječava fuziju i ulazak virusa u nezaražene stanice domaćina, i na (2) katalitičko mjesto virusne integraze, enzima ključnog za integriranje virusne DNA u DNA domaćina, inhibirajući sve njezine aktivnosti i, u konačnici, replikaciju virusa (Lee-Huang i sur., 2007a; 2007b). S obzirom na način vezanja oleuropeina na gp41 podjedinicu, autori smatraju da bi oleuropein mogao biti učinkovit i u inhibiciji nekih drugih virusa s tim

membranskim glikoproteinom, poput koronavirusa (uzrokuje SARS), virusa ebole, morbili virusa (uzročnik ospica) i virusa ptičje gripe (Lee-Huang i sur., 2007a).

U.S. patent 6,117,844 navodi da oleuropein ima potencijalnu antiviralnu aktivnost i prema herpes virusima koji uzrokuju mononukleozu (EBV, CMV), virusima hepatitisa, rotavirusima, goveđem rinovirusu, psećem parvovirusu i mačjem virusu leukemije (retrovirus) (Ma i sur, 2001).

#### **4.2.7.3. Ostali antiinfektivni učinci**

Osim antibakterijskih i antiviralnih učinaka, oleuropein je pokazao i određene antifungalne učinke, antimikoplazmatske i antiparazitske učinke.

O antifungalnim učincima samog oleuropeina nema mnogo podataka. *In vitro* je utvrđeno da je oleuropein stimulirao rast plijesni roda *Aspergillus spp*, ali je inhibirao proizvodnju aflatoksina B1, B2, G1 i G2. Osim toga, inhibirao je i gljivice *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* i *Fusarium culmorum*, koje su prisutne u prehrambenim namirnicama (Winkelhausen i sur., 2005). S druge strane, oleuropein se pokazao neučinkovitim na kvasce, ponajviše one roda *Candida spp*, te na askomicetne gljivice roda *Saccharomyces spp* (Medina i sur., 2013).

Oleuropein je *in vitro* pokazao učinkovitost inhibirajući mikoplazme (*Mycoplasma hominis*, *M. fermentans*, *M. pneumoniae*, *M. pirum*), najvjerojatnije inhibicijom procesa njihove transmisije, u koncentracijskom rasponu od 20 do 320 mg/mL (Obied i sur., 2012; Furieri i sur., 2002). Iako su tetraciklini, kinoloni i eritromicin učinkoviti u terapiji mnogih infekcija izazvanih mikoplazmama, oni imaju ograničeni učinak jer njihova učinkovitost ovisi o imunskom sustavu domaćina, a javlja se i rezistencija (*M. fermentans* na eritromicin, neki sojevi *M. hominis* na tetracikline). Pojava rezistencije nije utvrđena u primjeni oleuropeina što mu, uz njegovu netoksičnost i neovisnost njegove učinkovitosti o imunskom sustavu domaćina, daje znatnu prednost u potencijalnoj kliničkoj primjeni (Furieri i sur., 2002).

Nadalje, umjereno snažan *in vitro* i *in vivo* antiinfektivni učinak oleuropein je pokazao i na unutarstanični parazit *Toxoplasma gondii* koji uzrokuje toksoplazmozu (Jiang i sur., 2008). Za liječenje toksoplazmoze koriste se samo sulfadiazin i pirimetamin, koji imaju ugraničenu upotrebu zbog toksičnosti i ozbiljnih nuspojava. *In vitro* učinak u dozi od 300 mg/kg oleuropeina se pokazao snažnijim nego učinak pirimetamina dok je *in vivo* učinak inhibicije nastajanja cisti oleuropeinom pokazao veoma sličan učincima obaju lijekova u jetri i gušterači (Jiang i sur., 2008).

#### 4.2.8. Gastroprotektivni i hepatoprotektivni učinci

Gastroprotektivni učinci oleuropeina mogu biti rezultat njegovih izravnih i neizravnih djelovanja (antioksidativnih, protuupalnih, antibakterijskih, ...). Primjerice, smatra se da su redukcija/inhibicija lipidne peroksidacije i posljedičnog gubitka integriteta stanične membrane te inhibicija pojačane aktivacije NF- $\kappa$ B, koja uzrokuje upalne reakcije koje mogu dovesti i do ozbiljnijih oboljenja, veći dio antiulcerogenog učinka oleuropeina (Giner i sur., 2011). Oleuropein je pokazao gastroprotektivne i hepatoprotektivne učinke temeljene na antioksidativnim mehanizmima djelovanja u ispitivanju na štakorima s etanolom uzrokovanim gastričnim i hepatičkim oštećenjima (Dekanski i sur., 2011). Smanjio je vidljiva oštećenja želučane mukoze za 70%, značajno je spriječio sniženje aktivnosti želučane CAT i jetrenih SOD i CAT te snizio razinu produkata lipidne peroksidacije. Pokazalo se da je oleuropein reduciraio i ekspresiju brojnih hepatičkih gena uključenih u odgovore organizma na oksidativni stres i detoksifikaciju produkata lipidne peroksidacije kao i gena proupalnih citokina. Zanimljivo je da oleuropein nije utjecao na lipidnu peroksidaciju niti na aktivnost antioksidativnih enzima kod zdravih životinja. Gastroprotektivni učinak oleuropeina bio je podjednak učinku ranitidina što indicira mogući antisekretorni mehanizam djelovanja oleuropeina (Dekanski i sur., 2011).

Kao i u gastroprotektivnom učinku, antioksidativna svojstva oleuropeina imaju veliku ulogu i u hepatoprotektivnom učinku oleuropeina. U *in vivo* istraživanju na miševima kojima su ugljikovim tetrakloridom (CCl<sub>4</sub>) bila uzrokovana oštećenja jetre, oleuropein je značajno reduciraio oksidativna oštećenja jetre, između ostalog, inhibicijom *i*NOS-a i aktivacijom antioksidativne HO-1 (Domitrović i sur., 2012). Osim toga, utvrđeni hepatoprotektivni učinak oleuropeina je također rezultat njegovih već spomenutih protuupalnih i antiapoptotskih, ali i antifibrotičkih djelovanja. Naime, oleuropein je spriječio aktivaciju hepatičkih HSC stanica (*eng.* Hepatic Stellate Cell) odgovornih za fibrinogenezu aktiviranu kod oštećenja jetre. Indukcijom HO-1, inhibicijom ekspresije COX-2 i aktivacije HSC stanica oleuropein je reduciraio fibrinogenetski potencijal i pokazao potencijalno antifibrinogeno djelovanje za koje autori naglašavaju da je više terapijsko nego profilaktičko (Domitrović i sur., 2012). Nadalje, čini se da oleuropein može doprinijeti redukciji progresije nealkoholne masne jetre (NAFLD; *eng.* Non-alcoholic fatty liver disease), patološkog stanja u kojem infiltracija masnoća u jetri iznosi 5-10% njezine težine (Barbaro i sur., 2014). NAFLD obuhvaća steatozu jetre i steatohepatitis te posljedičnu fibrozu i cirozu, a najčešće je povezan s metaboličkim sindromom, odnosno inzulinskom rezistencijom koja se nalazi u podlozi bolesti, iako patogeneza bolesti još uvijek nije u potpunosti razjašnjena (Hur i sur., 2012). OLE je smanjio

masu masne jetre redukcijom portalnog odlaganja kolagena i hepatičkog odlaganja lipida, te normalizirao steatozu i steatohepatitis na štakorima s metaboličkim, kardiovaskularnim i hepatičkim strukturnim i funkcionalnim promjenama (Poyudal i sur., 2010). Osim toga, na *in vitro* modelu hepatičke steatoze oleuropein je značajno reducirao unutarstaničnu akumulaciju TG-a te broj i veličinu lipidnih kapljica u korištenim steatohepatocitima (Hur i sur., 2012). Također je reducirao aktivaciju signalnih putova koji su odgovorni za lipotoksičnost u adipocitima, mišićima, hepatocitima i stanicama gušterače čime je pokazao potencijalni preventivni učinak na hepatičku steatozu .

#### **4.2.9. Osteoprotektivni učinci**

Pokazalo se da oleuropein ima protektivne učinke, ovisne o dozi, i na gubitak koštane mase u *in vivo* ispitivanju provedenom na modelu ovarektomiziranih štakora (animalni model postmenopauzalne osteoporoze) s upalom koja povećava gubitak koštane mase. Spomenuti učinak se očitovao smanjenjem serumske razine fibrinogena i splenomegalije (karakteristike spomenute upale) zbog čega autori smatraju da je najvjerojatniji mehanizam djelovanja oleuropeina modulacija parametara upale, budući da oleuropein nije pokazao učinke na modelu osteopenije bez upale (Barbaro i sur., 2014). Osim toga, u *in vitro* ispitivanju na MSC stanicama (*eng.* Mesenchymal Stem Cells; stanice koje mogu diferencirati, između ostalog, i u osteoblaste i adipocite) oleuropein je potencirao osteoblastogenezu i inhibirao adipogenezu (Santiago-Mora i sur., 2011). S obzirom da je gubitak koštane mase tijekom starenja povezan i s nedostatkom osteoblasta tijekom procesa koštane pregradnje i s upalnim procesima koji ga pojačavaju, spomenuti osteoprotektivni učinci oleuropeina bi možda mogli imati i kliničku primjenu.

#### **4.2.10. Učinci na kožu**

Dosada spomenuti učinci oleuropeina mogu biti primjenjivi i na kožu. U *in vivo* istraživanju, u kojem su topikalni preparati s oleuropeinom aplicirani na kožu štakora prije izlaganja UVB-zračenju te nakon uzrokovanja eritema, oleuropein je pokazao umirujući učinak reducirajući eritem, transepidermalni gubitak vode i protok krvi za 22%, 35%, odnosno 30% (Perugini i sur., 2008). Umirujući učinak (aplikacija na eritem) se pokazao mnogo jačim od protektivnog učinka (aplikacija prije izlaganja UVB-zračenju). Nadalje, oralna primjena oleuropeina značajno je inhibirala zadebljanje kože i redukciju njezine elastičnosti, kao i karcinogenezu i rast tumora na koži miševa također izloženih UVB zračenju (Bulotta i sur., 2013). Autori oba istraživanja opažene učinke pripisuju inhibiciji faktora koji

utječu na razgradnju izvanstaničnog matriksa u dermisu (MMP) i proliferaciju epidermalnih stanica te antioksidativnim učincima. Prema ovim opažanjima, upotreba oleuropeina u kozmetičkim pripravcima namijenjenima oporavku kože oštećene UV-zračenjem bi mogla biti značajna (Perugini i sur., 2008).

Osim toga, oleuropein je pokazao pozitivan učinak i na proces zacjeljivanja mehanički uzrokovane rane na koži miša ubrzavši proces reepitelizacije i proizvodnje kolagenskih vlakana te povećavši opskrbu krvlju u ozlijeđenom tkivu kože (Mehraein i sur., 2014).

### **4.3. TERMIČKA OBRADA**

Tijekom termičke obrade maslinovog ulja dolazi do kemijskih promjena njegovih sastojaka, poput hidrolize, oksidacije, izomerizacije, polimerizacije ili ciklizacije, koji reduciraju količinu antioksidansa u ulju i smanjuju njegovu stabilnost, nutritivnu vrijednost i kvalitetu. EVOO posjeduje najvišu rezistenciju na spomenute reakcije zbog velikog udjela MUFA-e, ali ponajviše zbog prisutnosti tokoferola i polifenola, odnosno antioksidansa. Iako do danas nije utvrđeno koji antioksidans je najodgovorniji za stabilnost EVOO tijekom zagrijavanja, pokazalo se da se razina sekoiridoida snizuje najbrže i najviše. Nakon 10 min prženja na 180°C stupnjeva, količina sekoiridoida se smanjila za 40-50%, a nakon 6 ciklusa prženja, ostalo je manje od 10% inicijalne količine (Quiles i sur., 2006). Osim toga, zagrijavanjem oleuropeina na 80°C, koncentracija istog se prepolovila za 6 sati, dok je zagrijavanjem na 230 °C u potpunosti nestao nakon 3 sata (Attya i sur., 2010). Informacije o utjecaju mikrovalnog zagrijavanja na EVOO su različite (Quiles i sur., 2006). Iako se dio oleuropeina kemijski modificira tijekom termičke obrade, dio se, čini se, utroši i na regeneraciju  $\alpha$ -tokoferola. Navedeno je u skladu s primijećenim kasnijim početkom smanjenja koncentracije  $\alpha$ -tokoferola u zagrijavanom ekstra djevičanskom maslinovom ulju (45 min nakon početka) u odnosu na početak smanjenja koncentracije u zagrijavanom suncokretovom ulju koje je također bogato njime (15 min nakon zagrijavanja) (Quiles i sur., 2006).

## 5. ZAKLJUČAK

- Oleuropein je pokazao antioksidativne, protuupalne, kardioprotektivne, antidijabetičke, antikancerogene, neuroprotektivne, antiinfektivne, gastroprotektivne, hepatoprotektivne i osteoprotektivne učinke te protektivne učinke na metabolizam.
- Iako posjeduje neke specifične mehanizme djelovanja, većina učinaka se temelji na njegovim antioksidativnim svojstvima, inhibiciji signalnih putova u stanici i inhibiciji ekspresije određenih proteina na razini transkripcije.
- Veći dio spomenutih učinaka dokazan je uglavnom *in vitro*, dok je kliničkih studija u kojima bi oleuropein potvrdio ili osporio dokazane *in vitro* učinke provedeno veoma malo.
- Glavni problemi u ispitivanju i utvrđivanju *in vivo* učinaka oleuropeina su velika varijabilnost njegove zastupljenosti u maslinovom ulju, nedostatak standardiziranih analitičkih metoda za njegovo ispitivanje i nedostatak standarda za usporedbu (sva tri problema su uzrok relativno velikim neslaganjima mnogih provedenih istraživanja). Osim toga, postojeće kliničke studije su provedene na malom broju ispitanika i/ili su ispitivale učinke oleuropeina u obliku ekstrakta maslinovog lista što ne može dati u potpunosti pouzdane rezultate o učincima oleuropeina jer list masline sadrži i brojne druge antioksidativne molekule koje mogu sinergističkim djelovanjem s oleuropeinom potencirati njegove učinke i dati neispravne rezultate.
- Rezultati istraživanja u kojima se koristilo (ekstra) djevičansko maslinovo ulje također mogu biti nedostadni jer je zastupljenost oleuropeina u istom relativno niska i veoma varijabilna.
- U nekim istraživanjima, pogotovo onima koja su ispitivala apsorpciju i metabolizam oleuropeina, autori su izostanak očekivanih rezultata ili nemogućnost potvrđivanja postavljenih hipoteza pripisali u većoj mjeri niskim koncentracijama oleuropeina u ulju, nedostatku standarda za usporedbu i nepostojanju standardiziranih analitičkih metoda za njegovo ispitivanje, a u manjoj mjeri njegovoj nedostatnoj apsorpciji.
- Oleuropein ima potencijal za primjenu u prehrambenoj industriji kao antioksidans u preradi prehrambenih namirnica i kao sredstvo obogaćivanja biljnih ulja, te u farmaceutskoj industriji kao lijek ili kao dodatak prehrani. Međutim, da bi se taj potencijal iskoristio, potrebno je utvrditi standardni koncentracijski raspon oleuropeina u maslinovim uljima različitih kvaliteta, standardizirati analitičke metode za njegovo ispitivanje, utvrditi njegovu bioraspoloživost u organizmu čovjeka i provesti kliničke studije na većem broju ispitanika.

## 6. LITERATURA

- Abe R, Beckett J, Abe R, Nixon A, Rochier A, Yamashita N, Sumpio B. Olive Oil Polyphenol Oleuropein Inhibits Smooth Muscle Cell Proliferation. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2011, 41, 814-820.
- Ahmadvand H, Noori A, Ghasemi Dehnoo M, Bagheri S, Cheraghi RA. Hypoglycemic, hypolipidemic and antiatherogenic effects of oleuropein in alloxan-induced Type 1 diabetic rats. *Asian Pac J Trop Dis*, 2014, 4, 421-425.
- Al-Azzawie HF, Saeed Alhamdani MS. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sciences*, 2006, 78, 1371 – 1377.
- Alirezaei M, Kheradmand A, Heydari R, Tanideh N, Neamati Sh, Rashidipour. Oleuropein protects against ethanol-induced oxidative stress and modulates sperm quality in the rat testis, *Mediterr J Nutr Metab*, 2012, 5, 205–211.
- Andreadou I, Iliodromitis EK, Mikros E, Constantinou M, Agalias A, Magiatis P, Skaltsounis AL, Kamber E, Tsantili-Kakoulidou A, Kremastinos DT. The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *J Nutr*, 2006, 136, 2213-2219.
- Andreadou I, Mikros E, Ioannidis K, Sigala F, Naka K, Kostidis S, Farmakis D, Tenta R, Kavantzias N, Bibli SI, Gikas E, Skaltsounis L, Kremastinos DT, Iliodromitis EK. Oleuropein prevents doxorubicin-induced cardiomyopathy interfering with signaling molecules and cardiomyocyte metabolism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2014, 69, 4–16.
- Attya M, Benabdelkamel H, Perri E, Russo A, Sindona G. Effects of Conventional Heating on the Stability of Major Olive Oil Phenolic Compounds by Tandem Mass Spectrometry and Isotope Dilution Assay. *Molecules*, 2010, 15, 8734-8746.
- Barbaro B, Toietta G, Maggio R, Arciello M, Tarocchi M, Galli A, Balsano C. Effects of the Olive-Derived Polyphenol Oleuropein on Human Health. *Int. J. Mol. Sci*, 2014, 15, 18508-18524.
- Bazoti FN, Bergquist J, Markides KE, Tsiropoulos A. Noncovalent Interaction between Amyloid- $\beta$ -Peptide (1–40) and Oleuropein studied by electrospray ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2006, 17, 568–575.
- Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gómez-Caravaca AM, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Lercker G. Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a Survey of

- Their Sensory Properties, Health effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. *Molecules*, 2007, 12, 1679-1719.
- Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J Pharm Pharmacol*, 1999, 51, 971–974.
- Bulotta S, Oliverio M, Russo D, Procopio A. Biological Activity of Oleuropein and Its Derivatives. U: Natural Products. Ramawat KG, Merillon JM, urednici, New York, Springer, 2013, 3605-3638.
- Cioffi G, Pesca MS, De Caprariis D, Braca A, Severino L, De Tommasi N. Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 2010, 121, 105-111.
- Coni E, Di Benedetto R, Di Pasquale M, Masella R, Modesti D, Mattei R, Carlini EA. Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits. *Lipids*, 2000, 35, 45–53.
- Corona G, Deiana M, Incani A, Vauzour D, Dessí M, Spencer JPE. Inhibition of p38/CREB phosphorylation and COX-2 expression by olive oil polyphenols underlies their anti-proliferative effects. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2007, 362, 606-611.
- Corona G, Tzounis X, Dessí MA, Deiana M, Debnam ES, Visioli F, Spencer JPE. The fate of olive oil polyphenols in the gastrointestinal tract: Implications of gastric and colonic microflora-dependent biotransformation. *Free Radical Res*, 2006, 40, 647-658.
- Cumaoglu A, Rackova L, Stefek M, Kartal M, Maechler P, Karasu Ç. Effects of olive leaf polyphenols against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity in insulin secreting  $\beta$ -cells. *Acta Biochim Pol*, 2011, 58, 45-50.
- Czerwińska M, Kiss AK, Naruszewicz M. A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein. *Food Chemistry*, 2011, 131, 940–947.
- Daccache A, Lion C, Sibille N, Gerard M, Slomianny C, Lippens G, Cotelle P. Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitors. *Neurochem Int*, 2011, 58, 700–707.
- de Bock M, Derraik JG, Brennan CM, Biggs JB, Morgan PE, Hodgkinson SC, Hofman PL, Cutfield WS. Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. *PLoS One*, 2013, 8, 57622.



- de la Puerta R, Martínez-Domínguez E, Ruiz Gutierrez V. Effect of Minor Components of Virgin Olive Oil on Topical Antiinflammatory Assays. *Z Naturforsch C*, 2000, 55, 814-819.
- de la Puerta R, Ruiz Gutierrez V, Hoult JRS. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochemical Pharmacology*, 1999, 57, 445-449.
- Dekanski D, Ristić S, Radonjić NV, Petronijević ND, Dekanski A, Mitrović DM. Olive leaf extract modulates cold restraint stress-induced oxidative changes in rat liver. *J. Serb. Chem. Soc.*, 2011, 76, 1207–1218.
- Del Boccio P, Di Deo A, D Curtis A, Celli N, Iacoviello L, Rotilio D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol in rat plasma and urine after oral administration. *Journal of Chromatography B*, 2003, 785, 47-56.
- Dell' Agli M, Fagnani R, Galli GV, Maschi O, Gilardi F, Bellosta S, Crestani M, Bosisio E, De Fabiani E, Caruso D. Olive Oil Phenols Modulate the Expression of Metalloproteinase 9 in THP-1 Cells by Acting on Nuclear Factor- $\kappa$ B Signaling. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, 2246-2252.
- Dell' Agli M, Maschi O, Galli GV, Fagnani R, Dal Cero E, Donatella Caruso, Bosisio E. Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase. *British Journal of Nutrition*, 2008, 99, 945–951.
- Diomede L, Rigacci S, Romeo M, Stefani M, Salmona M. Oleuropein Aglycone Protects Transgenic *C. elegans* Strains Expressing A $\beta$ 42 by Reducing Plaque Load and Motor Deficit. *PLoS ONE*, 2013, 8, 58893.
- Domitrović R, Jakovac H, Vasiljev Marchesi V, Šain I, Romić Ž, Rahelić D. Preventive and therapeutic effects of oleuropein against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Pharmacological Research*, 2012, 65, 451– 464.
- Edgecombe SC, Stretch GL, Hayball PJ. Oleuropein, an antioxidant polyphenol from olive oil, is poorly absorbed from isolated perfused rat intestine. *J Nutr*, 2000, 130, 2996–3002.
- Esmaeili-Mahani S, Zare L. Olive (*Olea europaea L.*) leaf extract and its main component (oleuropein) mitigate the development of morphine physical dependence in rats. *Physiology and Pharmacology*, 2013, 16, 360-370.
- Esmailidehaj M, Mirhosseini SJ, Rezvani ME, Rasoulilian B, Hossein MM, Haghshenas D. Prolonged Oral Administration of Oleuropein Might Protect Heart against Aconitine-induced Arrhythmia. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2012, 11, 1255-1263.

- Fakhraei N, Abdolghaffari AH, Delfan B, Abbasi A, Rahimi N, Khansari A, Rahimian R, Dehpour AR. Protective Effect of Hydroalcoholic Olive Leaf Extract on Experimental Model of Colitis in Rat: Involvement of Nitrenergic and Opioidergic Systems. *Phytother Res*, 2014, 28, 1367-1373.
- Farràs M, Valls RM, Fernández-Castillejo S, Giralt M, Solà R, Subirana I, Motilva MJ, Konstantinidou V, Covas MI, Fitó M. Olive oil polyphenols enhance the expression of cholesterol efflux related genes *in vivo* in humans. A randomized controlled trial. *J Nutr Biochem*, 2013, 24, 1334-1339.
- Flemmig J, Kuchta K, Arnhold J, Rauwald H.W. Olea europaea leaf (Ph.Eur.) extract as well as several of its isolated phenolics inhibit the gout-related enzyme xanthine oxidase. *Phytomedicine*, 2011, 18, 561–566.
- Furieri PM., Marino A, Saija A, Uccella N, Bisignano G. *In vitro* antimycoplasmal activity of oleuropein. *Int J Antimicrob. Agents*, 2002, 20, 293–296.
- García- Villalba R, Carrasco-Pancorbo A, Nevedomskaya E, Mayboroda OA, Deelder AM, Segura-Carretero A, , Fernández-Gutiérrez A. Exploratory analysis of human urine by LC-ESI-TOF MS after high intake of olive oil: understanding the metabolism of polyphenols. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 398, 463-475.
- Giamarellos-Bourboulis EJ, Geladopoulos T, Chrisofos M, Koutoukas P, Vassiliadis J, Alexandrou I, Tsaganos T, Sabracos L, Karagianni V, Pelekanou E, Tzepi I, Kranidioti H, Koussoulas V, Giamarellou H. Oleuropein: a novel immunomodulator conferring prolonged survival in experimental sepsis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Shock*, 2006, 26, 410-416.
- Gikas E, Papadopoulos N, Tsarbopoulos A. Kinetic study of the acidic hydrolysis of oleuropein, the major bioactive metabolite of olive oil. *J. Liquid Chromatogr. Relat. Technol*, 2006, 29, 497–508.
- Giner E, Recio MC, Ríos JL, Giner RM. Oleuropein Protects against Dextran Sodium Sulfate-Induced Chronic Colitis in Mice. *J. Nat. Prod.*, 2013, 76, 1113–1120.
- Grossi C, Rigacci S, Ambrosini S, Ed Dami T, Luccarini I, Traini C, Failli P, Berti A, Casamenti F, Stefani M. The Polyphenol Oleuropein Aglycone Protects TgCRND8 Mice against A $\beta$  Plaque Pathology. *PLoS One*, 2013, 8, 8.
- Hamdi HK, Castellon R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334, 769-778.

- Hassan ZK, Elamin MH, Omer SA, Daghestani MH, Omer SA, Al-Olayan ES, Elobeid MA, Virk P, Mohammed OB. Oleuropein Induces Anti-metastatic Effects in Breast Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13, 4555-4559.
- Impellizzeri D, Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Di Paola R, Bramanti P, Morittu VM, Procopio A, Perri E, Britti D, Cuzzocrea D. The effects of a polyphenol present in olive oil, oleuropein aglycone, in an experimental model of spinal cord injury in mice. *Clin. Nutr*, 2011, 30, 533-40.
- Jemai H, Bouaziz M, Fki I, El Feki A, Sayadi S. Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chemico-Biological Interactions*, 2008, 176, 88-98.
- Jiang JH, Jin CM, Kim YC, Kim HS, Park WC, Park H. Anti-toxoplasmosis Effects of Oleuropein Isolated from *Fraxinus rhychophylla*. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31, 2273-2286.
- Kendall M, Batterham M, Callahan DL, Jardine D, Prenzler PD, Robards K, Ryan D. Randomized controlled study of the urinary excretion of biophenols following acute and chronic intake of olive leaf supplements. *Food Chemistry*, 2012, 130, 651-659.
- Khalatbary AR, Zarrinjoei GhR. Anti-Inflammatory Effect of Oleuropein in Experimental Rat Spinal Cord Trauma. *Iran Red Crescent Med J*, 2012, 14, 229-234.
- Kotyzová D, Hodková A, Eybl V. The effect of olive oil phenolics – Hydroxytyrosol and oleuropein on antioxidant defence status in acute arsenic exposed rats. *Abstracts / Toxicology Letters*, 2011, 205S, 180-300.
- Landete JM, Curiel JA, Rodríguez H, de las Rivas B, Munoz R. Study of the inhibitory activity of phenolic compounds found in olive products and their degradation by *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Chemistry*, 2008, 107, 320-326.
- Lee-Huang S, Huang PL, Zhang D, Lee JW, Bao J, Sun Y, Chang YT, Zhang J, Huang PL. Discovery of Small-Molecule HIV-1 Fusion and Integrase Inhibitors Oleuropein and Hydroxytyrosol: I. Fusion Inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 354, 872-878.
- Lee-Huang S, Huang PL, Zhang D, Lee JW, Bao J, Sun Y, Chang YT, Zhang J, Huang PL. Discovery of Small-Molecule HIV-1 Fusion and Integrase Inhibitors Oleuropein and Hydroxytyrosol: II. Integrase Inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 354, 879-884.
- Ma SC, He ZD, Deng XL, But PP, Ooi VE, Xu HX, Lee SH, Lee SF. *In vitro* evaluation of secoiridoid glucosides from the fruits of *Ligustrum lucidum* as antiviral agents. *Chem Pharm Bull*, 2001, 49, 1471-1473.

- Markopoulos C, Vertzoni M, Agalias A, Magiatis P, Reppas C. Stability of oleuropein in the human proximal gut. *J Pharm Pharmacol*, 2009, 61, 143-149.
- Masella R, Giovannini C, Vari R, Di Benedetto, Coni E, Volpe R, Fraone N, Bucci A. Effects of Dietary Virgin Olive Oil Phenols on Low Density Lipoprotein Oxidation in Hyperlipidemic Patients. *Lipids*, 2001, 36, 1195-1202
- Mehraein F, Sarbishegi M, Aslani A. Therapeutic Effects of Oleuropein on Wounded Skin in Young Male Balb/c Mice. *Wounds*, 2014, 26, 83-88.
- Menendez JA, Vazquez-Martin A, Colomer R, Brunet J, Carrasco-Pancorbo A, Garcia-Villalba R, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer*, 2007, 7, 80.
- Obied HK, Prenzler PD, Ryan D, Servili M, Taticchi A, Esposto S, Robards K. Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. *Nat. Prod. Rep*, 2008, 25, 1167–1179.
- Obied HK, Prenzler PD, Omar SH, Ismael R, Servili M, Esposto S, Taticchi A, Selvaggini R, Urbani S. Pharmacology of olive biophenols. U: Advances in molecular toxicology. Fishbein FC, Heilman JM, urednici, Kidlington, Elsevier, 2012, 195 – 223.
- Oi-Kano Y, Kawada T, Watanabe T, Koyama F, Watanabe K, Senbongi R, Iwai K. Oleuropein, a phenolic compound in extra virgin olive oil, increases uncoupling protein 1 content in brown adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, 2008, 54, 363-70.
- Omar SH. Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2010, 18, 111–121.
- Ostomy, 2014., <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ostomy.html>, pristupljeno 12.11. 2014.
- Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Spiegelhalder, Bartsch H. The antioxidant/ anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, 2000, 36, 1235-1247.
- Paiva-Martins F, Fernandes J, Rocha S, Nascimento H, Vitorino R, Amado F, Borges F, Belo L, Santos-Silva A. Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage. *Mol. Nutr. Food Res*, 2009, 53, 609 – 616.
- Paiva-Martins F, Gordon MH, Gameiro P. Activity and location of olive oil phenolic antioxidants in liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2003, 124, 23–36.

- Parzonko A, Czerwińska ME, Kiss AK, Naruszewicz M. Oleuropein and oleacein may restore biological functions of endothelial progenitor cells impaired by angiotensin II via activation of Nrf2/hemeoxygenase-1 pathway. *Phytomedicine*, 2013, 20, 1088–1094.
- Perugini P, Vettor M, Rona C, Troisi L, Villanova L, Genta I, Conti B, Pavanetto F. Efficacy of oleuropein against UVB irradiation: preliminary evaluation. *Int J Cosmet Sci*, 2008, 30, 113–120.
- Pinto J, Paiva-Martins F, Corona G, Debnam ES, Oruna-Concha MJ, Vauzour D, Gordon MH, Spencer JPE. Absorption and metabolism of olive oil secoiridoids in the small intestine. *British Journal of Nutrition*, 2011, 105, 1607–1618.
- Piscopo A, Poiana M. Packaging and Storage of Olive Oil. U: Olive Germplasm - The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy. Muzzalupo I, urednik, Rijeka, InTech, 2012, 151-171.
- Poyudal H, Campbell F, Brown L. Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats. *J Nutr*, 2010, 140, 946-953.
- Priore P, Siculella L, Gnoni GV. Extra virgin olive oil phenols down-regulate lipid synthesis in primary-cultured rat-hepatocytes. *J Nutr Biochem*, 2014, 25, 683-691.
- Puel C, Quintin A, Agalias A, Mathey J, Obled C, Mazur A, Davicco MJ, Lebecque P, Skaltsounis AL. Olive oil and its main phenolic micronutrient (oleuropein) prevent inflammation-induced bone loss in the ovariectomised rat. *Br J Nutr*, 2004, 92, 119-127.
- Quiles JL, Ramírez-Tostosa, Yaqoob P. Olive oil and health. Trowbridge, Cromwell Press, 2006, str. 46-62. 68-70. 110-116. 173-178. 194-196. 204-206.
- Rigacci S, Guidotti V, Bucciantini M, Parri M, Nediani C. Oleuropein aglycon prevents cytotoxic amyloid aggregation of human amylin. *J Nutr Biochem*, 2010, 21, 726–735.
- Roche M, Dufour C, Loonis M, Reist M, Carrupt PA, Dangles A. Olive phenols efficiently inhibit the oxidation of serum albumin bound linoleic acid and butyrylcholine esterase. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790, 240–248.
- Romani A, Lapucci C, Cantini C, Ieri F, Mulinacci N, Visioli F. Evaluation of minor polar compounds and antioxidant capacity during storage of bottled extra virgin olive oil. *J Agric Food Chem*, 2007, 55, 1315–1320.
- Romero C, Medina E, Vargas J, Brenes M, De Castro A. In Vitro Activity of Olive Oil Polyphenols against *Helicobacter pylori*. *J. Agric. Food Chem*, 2007, 55, 680-686.
- Ruiz Gutierrez V, De la Puerta R, Catalá A. The effect of tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein on the non-enzymatic lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2001, 217, 35–41.

- Scheffler A, Rauwald HW, Kampa B, Mann U, Mohr FW, Dhein S. *Olea europaea* leaf extract exerts L-type Ca<sup>2+</sup> channel antagonistic effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008, 120, 233–240.
- Sepporta MV, Fuccelli R, Rosignoli P, Ricci G, Servili M, Morozzi G, Fabiani R. Oleuropein inhibits tumour growth and metastases dissemination in ovariectomised nude mice with MCF-7 human breast tumour xenografts. *Journal of functional foods*, 2014, 8, 269–273.
- Spadafora A, Mazzuca S, Chiappetta FF, Parise A, Perri E, Innocenti AM. Oleuropein-Specific-β-Glucosidase activity marks the early response of olive fruits (*Olea europaea*) to mimed insect attack. *Agricul Sci China*, 2008, 12, 703–712.
- Sudjana AN, D'Orazio C, Ryan V, Rasool N, Ng J, Islam N, Riley TV, Hammer KA. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2009, 33, 461–463.
- Susalit E, Agus N, Effendia I, Tjandrawinatac RR, Nofiarnyc D, Perrinjaquet-Moccetid T, Verbruggend M. Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine*, 2011, 18, 251–258.
- Svobodova M, Andreadou I, Skaltsounis AL, Kopecky J, Flachs P. Oleuropein as an inhibitor of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Genes Nutr*, 2014, 376.
- Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev*, 2005, 18, 98–112.
- Visioli F, Galli C, Galli G, Caruso D. Biological activities and metabolic fate of olive oil phenols. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2002a, 104, 677 – 684.
- Visioli F, Poli A, Galli C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev.*, 2002, 22, 65-75.
- Vissers MN, Zock PL, Katan MB. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans: a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2004, 58, 955–965.
- Vissers MN, Zock PL, Roodenburg AJC, Leenen R, Katan MB. Olive oils are absorbed in humans. *J. Nutr*, 2002, 132, 409-417.
- Wainstein J, Ganz T, Boaz M, Bar Dayan Y, Dolev E, Kerem Z, Madar Z. Olive Leaf Extract as a Hypoglycemic Agent in Both Human Diabetic Subjects and in Rats. *J Med Food*, 2012, 15, 1–6.
- Winkelhausen E, Pospiech R, Laufenberg. Antifungal activity of phrnolic compounds extracted from dried Olive pomace. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia*, 2005, 24, 41–46.

Zbidi H, Salido S, Altarejos J, Perez-Bonilla M, Bartegi A, Rosado JA, Salido GM. Olive tree wood phenolic compounds with human platelet antiaggregant properties. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 2009, 42, 279–285.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

### 7.1. SAŽETAK

Oleuropein je antioksidativni polifenolni sekoiridoidni spoj iz maslinovog ulja odgovoran za njegov gorak okus i oksidativnu stabilnost. Najzastupljenija je supstanca u listovima i plodovima masline dok ga u maslinovom ulju ima mnogo manje. Njegovi učinci na zdravlje čovjeka ovise ponajviše o njegovoj količini u maslinovom ulju koja veoma varira, a manje o apsorpciji i metabolizmu u organizmu čovjeka.

Oleuropein je pokazao antioksidativne, protuupalne, kardioprotektivne, antidijabetičke, antiproliferativne, neuroprotektivne, antiinfektivne, gastroprotektivne, hepatoprotektivne i osteoprotektivne učinke. Iako su neki učinci temeljeni na specifičnim mehanizmima djelovanja, većina navedenih učinaka se temelji na njegovim antioksidativnim svojstvima i njegovoj sposobnosti inhibicije unutarstaničnih signalnih putova i ekspresije određenih proteina na razini transkripcije.

Antioksidativni učinci se temelje na njegovim izravnim (vezanje, odnosno inaktivacija radikala i sprječavanje lančane reakcije, redukcijska aktivnost i kelacija metalnih iona) i na neizravnim (regeneracija endogenog antioksidativnog sustava i modulacija genske ekspresije antioksidativnih enzima) mehanizmima djelovanja. Protuupalni učinci se temelje na inhibiciji signalnih putova što dovodi do smanjene ekspresije proupalnih medijatora, citokina i enzima. Kardioprotektivni učinci obuhvaćaju antihipertenzivne, hipolipemične, antiaterogene i antiishemične učinke. Oni se temelje na inaktivaciji oksidativnih molekula, inhibiciji lipidne peroksidacije, inhibiciji ekspresije NO i adhezivnih molekula, inhibiciji agregacije trombocita, na modulaciji lipidnog profila i metabolizma lipida te na antiaritmičkim mehanizmima. Antidijabetički učinci se temelje na modifikaciji glikemijskih parametara, protektivnom učinku na  $\beta$ -stanice gušterače i povećanju osjetljivosti stanica na inzulin. Antikancerogeni učinci se temelje na antiproliferativnom, antimetastatskom i antiangiogenom djelovanju oleuropeina dok se neuroprotektivni učinci temelje na antiamiloidogenom i antioksidativnom djelovanju. Antiinfektivni učinci obuhvaćaju antibakterijske (npr. MRSA, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*), antiviralne (HIV-1, RSV, Para 3), antimikoplazmatske i antiparazitske (*Toxoplasma gondii*) učinke. Gastroprotektivni učinci se temelje na antioksidativnim djelovanjima, a hepatoprotektivni još i na antisteatogenim djelovanjima. Osteoprotektivni učinci temelje se na modulaciji parametara upale u postmenopauzalnoj osteoporozi i na stimulaciji osteoblastogeneze, dok se učinci na kožu temelje na antioksidativnim, protuupalnim i regenerativnim učincima oleuropeina.



## 7.2. SUMMARY

Oleuropein is an antioxidative polyphenolic compound in the olive oil responsible for its bitter taste and oxidative stability. It is the major compound in the olive leaves and fruits, while in an olive oil is much less abundant. Its impacts on human health mostly depend on its quantity in the olive oil (which is very variable), and to a lesser degree on the absorption and metabolism in the human organism.

Oleuropein has shown antioxidative, anti-inflammatory, cardioprotective, antidiabetic, antiproliferative, neuroprotective, anti-infective, gastroprotective, hepatoprotective and osteoprotective effects. Although some of its effects are exerted through specific mechanisms of action, most of them are exerted through its antioxidative activities and its ability to inhibit intracellular signaling pathways and expression of certain proteins at the transcriptional level.

Antioxidative effects of oleuropein are exerted through its direct (such as scavenging of free radicals and radical chain breaking, reducing activity and chelation of metal ions) and indirect (regeneration of an endogenous antioxidative system and modulation of a gene expression of some antioxidative enzymes) mechanisms of action. Anti-inflammatory effects are exerted through the inhibition of some signaling pathways resulting in a reduced expression of proinflammatory mediators, cytokines and enzymes. Cardioprotective effects include antihypertensive, hypolipemic, anti-atherogenic and anti-ischemic effects. They are based on the inactivation of the oxidative molecules, inhibition of the lipid peroxidation, inhibition of NO and adhesion molecules expression, platelet aggregation inhibition, on the modulation of lipid profile and their metabolism, and on antiarrhythmic mechanisms. Antidiabetic effects are based on the modification of the glycemic parameters, protective impacts on  $\beta$ -cells in the pancreas, and increased cellular insulin sensitizing. Anticancer effects are based on the antiproliferative, antimetastatic and antiangiogenic activities of oleuropein, while neuroprotective effects are based on the antiamyloidogenic and antioxidative activities. Anti-infective effects include antibacterial (e.g. MRSA, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*), antiviral (HIV-1, RSV, Para 3), antimycoplasmatic and antiparasitic (*Toxoplasma gondii*) activities. Gastroprotective effects are based on the antioxidative activities, as well as the hepatoprotective effects, which are also based on the antisteatogenic activities. Osteoprotective effects of oleuropein are based on the modification of the inflammatory parameters in postmenopausal osteoporosis and the stimulation of the osteoblastogenesis, while its impacts on the skin include antioxidative, anti-inflammatory and regenerative activities.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Zavod za Kemiju prehrane  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### BIOLOŠKI UČINCI OLEUROPEINA

Ivana Matelić

#### SAŽETAK

Oleuropein je antioksidativni polifenolni sekoiridoidni spoj iz maslinovog ulja odgovoran za njegov gorak okus i oksidativnu stabilnost. Najzastupljenija je supstanca u listovima i plodovima masline dok ga u maslinovom ulju ima mnogo manje. Njegovi učinci na zdravlje čovjeka ovise ponajviše o njegovoj količini u maslinovom ulju koja veoma varira, a manje o apsorpciji i metabolizmu u organizmu čovjeka. Oleuropein je pokazao antioksidativne, protuupalne, kardioprotektivne, antidijabetičke, antiproliferativne, neuroprotektivne, antiinfektivne, gastroprotektivne, hepatoprotektivne i osteoprotektivne učinke. Iako su neki učinci temeljeni na specifičnim mehanizmima djelovanja, većina navedenih učinaka se temelji na njegovim antioksidativnim svojstvima i njegovoj sposobnosti inhibicije unutarstaničnih signalnih putova i ekspresije određenih proteina na razini transkripcije. Antioksidativni učinci se temelje na njegovim izravnim (vezanje, odnosno inaktivacija radikala i sprječavanje lančane reakcije, redukcijska aktivnost i kelacija metalnih iona) i na neizravnim (regeneracija endogenog antioksidativnog sustava i modulacija genske ekspresije antioksidativnih enzima) mehanizmima djelovanja. Protuupalni učinci se temelje na inhibiciji signalnih putova što dovodi do smanjene ekspresije proupalnih medijatora, citokina i enzima. Kardioprotektivni učinci obuhvaćaju antihipertenzivne, hipolipemične, antiaterogene i antiishemične učinke. Oni se temelje na inaktivaciji oksidativnih molekula, inhibiciji lipidne peroksidacije, inhibiciji ekspresije NO i adhezivnih molekula, inhibiciji agregacije trombocita, na modulaciji lipidnog profila i metabolizma lipida te na antiaritmičkim mehanizmima. Antidijabetički učinci se temelje na modifikaciji glikemijskih parametara, protektivnom učinku na  $\beta$ -stanice gušterače i povećanju osjetljivosti stanica na inzulin. Antikancerogeni učinci se temelje na antiproliferativnom, antimetastatskom i antiangiogenom djelovanju oleuropeina dok se neuroprotektivni učinci temelje na antiamiloidogenom i antioksidativnom djelovanju. Antiinfektivni učinci obuhvaćaju antibakterijske (npr. MRSA, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*), antiviralne (HIV-1, RSV, Para 3), antimikoplazmatske i antiparazitske (*Toxoplasma gondii*) učinke. Gastroprotektivni učinci se temelje na antioksidativnim djelovanjima, a hepatoprotektivni još i na antisteatogenim djelovanjima. Osteoprotektivni učinci temelje se na modulaciji parametara upale u postmenopauzalnoj osteoporozi i na stimulaciji osteoblastogeneze, dok se učinci na kožu temelje na ntioksidativnim, protuupalnim i regenerativnim učincima oleuropeina.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 66 stranica, 7 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 91 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: oleuropein, metabolizam oleuropeina, farmakološki učinci oleuropeina, antioksidativni učinci oleuropeina

Mentor: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lovorka Vujić**, *viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Irena Vedrina- Dragojević**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Mario Jug**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: ožujak 2015.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of Food Chemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### BIOLOGICAL EFFECTS OF OLEUROPEIN

Ivana Matelić

#### SUMMARY

Oleuropein is an antioxidative polyphenolic compound in the olive oil responsible for its bitter taste and oxidative stability. It is the major compound in the olive leaves and fruits, while in an olive oil is much less abundant. Its impacts on human health mostly depend on its quantity in the olive oil (which is very variable), and to a lesser degree on the absorption and metabolism in the human organism. Oleuropein has shown antioxidative, anti-inflammatory, cardioprotective, antidiabetic, antiproliferative, neuroprotective, anti-infective, gastroprotective, hepatoprotective and osteoprotective effects. Although some of its effects are exerted through specific mechanisms of action, most of them are exerted through its antioxidative activities and its ability to inhibit intracellular signaling pathways and expression of certain proteins at the transcriptional level. Antioxidative effects of oleuropein are exerted through its direct (such as scavenging of free radicals and radical chain breaking, reducing activity and chelation of metal ions) and indirect (regeneration of an endogenous antioxidative system and modulation of a gene expression of some antioxidative enzymes) mechanisms of action. Anti-inflammatory effects are exerted through the inhibition of some signaling pathways resulting in a reduced expression of proinflammatory mediators, cytokines and enzymes. Cardioprotective effects include antihypertensive, hypolipemic, anti-atherogenic and anti-ischemic effects. They are based on the inactivation of the oxidative molecules, inhibition of the lipid peroxidation, inhibition of NO and adhesion molecules expression, platelet aggregation inhibition, on the modulation of lipid profile and their metabolism, and on antiarrhythmic mechanisms. Antidiabetic effects are based on the modification of the glycemic parameters, protective impacts on  $\beta$ -cells in the pancreas, and increased cellular insulin sensitizing. Anticancer effects are based on the antiproliferative, antimetastatic and antiangiogenic activities of oleuropein, while neuroprotective effects are based on the antiamyloidogenic and antioxidative activities. Anti-infective effects include antibacterial (e.g. MRSA, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*), antiviral (HIV-1, RSV, Para 3), antimycoplasmatic and antiparasitic (*Toxoplasma gondii*) activities. Gastroprotective effects are based on the antioxidative activities, as well as the hepatoprotective effects, which are also based on the antisteatogenic activities. Osteoprotective effects of oleuropein are based on the modification of the inflammatory parameters in postmenopausal osteoporosis and the stimulation of the osteoblastogenesis, while its impacts on the skin include antioxidative, anti-inflammatory and regenerative activities.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 66 pages, 7 figures, 1 table and 91 references. Original is in Croatian language.

Keywords: oleuropein, metabolism of oleuropein, pharmacological effects of oleuropein, antioxidative effects of oleuropein

Mentor: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Lovorka Vujić, Ph.D.** Senior Assistant, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Irena Vedrina- Dragojević, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Mario Jug, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: March 2015.