

# Utjecaj polifenola na reproduktivne pokazatelje domaćih životinja

---

**Došlić, Gloria**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:*

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek /  
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:502462>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-23**



Sveučilište Josipa Jurja  
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet  
agrobiotehničkih  
znanosti Osijek**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical  
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of  
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Gloria Došlić

Diplomski studij Specijalna zootehnika

**Utjecaj polifenola na reproduktivne pokazatelje domaćih  
životinja**

Diplomski rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Gloria Došlić

Diplomski studij Specijalna zootehnika

**Utjecaj polifenola na reproduktivne pokazatelje domaćih  
životinja**

Diplomski rad

Osijek, 2021.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Gloria Došlić

Diplomski studij Specijalna zootehnika

**Utjecaj polifenola na reproduktivne pokazatelje domaćih  
životinja**

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Marcela Šperanda, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Drago Bešlo, mentor
3. doc. dr. Dejan Agić, član

Osijek, 2021.

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| <b>1. UVOD</b> .....  | 1  |
| <b>2. POLIFENOLI I NJIHOVE KORISTI</b> .....  | 3  |
| 2.1. Vrste polifenola.....  | 4  |
| 2.1.1. Fenolne kiseline.....  | 4  |
| 2.1.2. Flavonoidi.....  | 5  |
| 2.1.3. Izoflavoni, neoflavonoidi i halkoni .....  | 6  |
| 2.1.4. Flavoni, flavonoli, flavanoni i flavanonoli.....   | 7  |
| 2.1.5. Flavanoli i proantocijanidini .....  | 8  |
| 2.1.6. Antocijanidini.....  | 9  |
| 2.1.7. Polifenolni amidi .....  | 10 |
| 2.1.8. Ostali polifenoli.....   | 11 |
| 2.2. Antioksidativna aktivnost polifenola .....   | 12 |
| <b>3. IZVORI POLIFENOLA U HRANIDBI ŽIVOTINJA</b> .....  | 14 |
| <b>4. UNOS, APSORPCIJA, BIORASPOLOŽIVOST I BIOAKTIVNOST<br/>POLIFENOLA</b> .....  | 19 |
| <b>5. POLIFENOLI I REPRODUKTIVNI DOGAĐAJI <i>IN VIVO</i></b> .....  | 21 |
| 5.1. Seksualno ponašanje .....  | 29 |
| 5.2. Izlučivanje i funkcija hormona .....   | 30 |
| 5.3. Gametogeneza.....  | 31 |
| 5.4. Gravidnost i programiranje fetusa .....  | 33 |
| <b>6. POLIFENOLI I <i>IN VITRO</i> TEHNIKE POTPOMOŠNE REPRODUKCIJE</b> ..   | 35 |
| <b>7. POLIFENOLI ŽIVOTINJSKOG PODRIJETLA I LJUDSKO ZDRAVLJE</b> .....   | 44 |
| <b>8. POLIFENOLI KAO ANTIOKSIDATIVNA SREDSTVA POBOLJŠAVAJU<br/>KVALITETU PIJETLOVA SJEMENA TIJEKOM HLADNOG SKLADIŠTENJA?</b><br>..... | 46 |
| <b>9. UČINAK POLIFENOLA NA PERFORMANSE I ANTIOKSIDATIVNI STATUS<br/>KRMAČA I PRASADI</b> .....  | 48 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>10. ULOGA POLIFENOLA U LJUDSKOM ZDRAVLJU I PREHRAMBENIM<br/>SUSTAVIMA .....</b> | <b>50</b> |
| <b>11. ZAKLJUČAK .....</b>   | <b>52</b> |
| <b>12. POPIS LITERATURE .....</b>  | <b>53</b> |
| <b>13. SAŽETAK .....</b>   | <b>62</b> |
| <b>14. SUMMARY .....</b>   | <b>63</b> |
| <b>15. POPIS SLIKA .....</b>   | <b>64</b> |
| <b>16. POPIS TABLICA .....</b>   | <b>66</b> |
| <b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....</b>                                       | <b>67</b> |
| <b>BASIC DOCUMENTATION CARD .....</b>  | <b>69</b> |

## **Popis oznaka i kratica**

**ART** - tehnika potpomognute reprodukcije

**LDL** - kolesterol (lipoproteini male gustoće)

**In vitro** - (na staklu, pod staklom); oznaka za fiziološke procese koji se odvijaju izvan organizma, u laboratorijskim uvjetima

**In vivo** - (na živome); oznaka za fiziološke procese koji se zbivaju u živom biću (živoj biljci, životinji, čovjeku)

**μmol / L** - mikromol po litri

**EGCG** - epigalokatehin - 3 - galat

**ER** - estrogenski receptori

**E2** - estradiol

**GnRH** - gonadotropin - oslobađajući hormon

**LH** - luteinizirajući hormon

**FSH** - folikul - stimulirajući hormon

**P4** - progesteron

**T** - testosteron

**SDN - POA** - spolno dimorfna jezgra preoptičkog područja

**PVN** - paraventrikularna jezgra

**ARC** - lučna jezgra

**mPOA** - medijalno pre - optičko područje

**IVF** - *in vitro* oplodnja

**μg** - mikrogram

**cGMP** - ciklični guanozin monofosfat

**PGF2α** - sinkronizacije estrusa krava u laktaciji

**PGE2** - prostaglandin E2

**PGHS – 2 / COX - 2** - prostaglandin endoperoksid sintaza 2

**ppm** - nenormirani znak za milijuntinku

**GAPD** - gliceraldehid - 3 - fosfat dehidrogenaza

**RES** - resveratrol

**HT** - hidroksitirozol (3,4 dihidroksifeniletanol)

**DHPG** - 3,4 dihidroksifenilglikol

**GSPE** - ekstrakt procijanidina sjemenki grožđa

**GGCEN** - genistein

**SOD** - superoksid dismutaza

**GPx** - glutation peroksidaza

**GSH** - glutation reduktaza

**MDA** - malondialdehid

**TAC** - ukupni antioksidativni kapacitet

**CAT** - katalaza

**ROS** - reaktivne vrste kisika

**AI** - umjetna oplodnja

**Nrf2** - signalni put nuklearnog faktora eritroida 2

**IVM** - *in vitro* sazrijevanje

**IVC** - *in vitro* kultura

**GTPP** - polifenoli zelenog čaja

**GEN** - genistein

**RSV** - resveratrol

**BIO A** - biochanin A

**FOR** - formononetin



**VEGF** - vaskularni endotelni faktor rasta

**NCD** - nezarazne bolesi

**DRI** - dijetalni referentni unosi

## 1. UVOD

Stočarska proizvodnja suočena je sa ekološkim problemima kao i sa životnim navikama potrošača. Najvažniji među tim razmatranjima su ograničenje prirodnih resursa (zemlja i voda), klimatske promjene (globalno zagrijavanje, dezertifikacija i staklenički plinovi) i potražnja potrošača za organskim i funkcionalnim proizvodima koji ispunjavaju načela dobrobiti životinja. Stoga su namirnice za stoku sve više i više usmjerene na korištenje prirodnih autohtonih resursa, a ne na tradicionalni uzgoj stranih biljaka koje su vrlo zahtjevne po pitanju kvalitete te vode i tla. Štoviše, sve je više saznanja o tome da biljke i biljni proizvodi nisu samo hrana, već se mogu smatrati i nutritivnima zbog svog jedinstvenog kemijskog sastava, posebno sekundarnih metabolita s potencijalnim biološkim koristima na životinjske karakteristike i kvalitetu životinjskih proizvoda. Među sekundarnim biljnim metabolitima polifenoli su u posljednjih nekoliko godina privukli značajnu pozornost i to zbog svog obilja u različitim biljkama kao i zbog poželjnih bioloških aktivnosti. Mnoga su istraživanja potvrdila antioksidativna, protuupalna, metabolička i imuno - modularna djelovanja polifenola, ali i antihelmintska, antimutanogena i antimikrobna djelovanja, koja su od velike važnosti u stočarskoj proizvodnji. Ova svojstva potiču znanstvenike na daljnja istraživanja i podižu svijest o upotrebi ovih sekundarnih metabolita kao prirodnih alata za poboljšanje životinjskih karakteristika i kvalitete životinjskih proizvoda. U ekstenzivnoj stočarskoj proizvodnji, koju karakteriziraju niski prihodi i ograničenje krmnih resursa, potrebno je tražiti alternativne i dostupne namirnice poput grmlja, drveća i agroindustrijskih nusproizvoda. Utvrđeno je da ovi proizvodi sadrže znatne količine polifenola i sve se više koriste za hranidbu životinja, jer pozitivno utječu na rast, karakteristike i zdravlje životinja, na adekvatnost upotrebe hranjivih tvari, te na ublažavanje emisije metana kao i poboljšanje kvalitete životinjskih proizvoda.

Međutim, postoje i dokazi o negativnim učincima na homeostazu životinja, posebno koji utječu na reproduktivne događaje. Rani dokazi, 1940. godine, pokazali su da je hranjenje ovaca *Trifolium pratense* (crvena djetelina; koja je bogata izoflavonima, podrazredom polifenola) povezano s visokom stopom neplodnosti narušavajući preživljavanje embrija i razvoj fetusa; isto je potvrđeno i kod krava 40 godina kasnije (Kallela i sur. 1984.). Nakon toga, istraživanja o koristima / rizicima dodavanja polifenola su rijetka i kontroverzna (Mustonen i sur., 2014.; Baheg i sur., 2017.; Hashem i sur. 2018.). Većina istraživanja o upotrebi polifenola u prehrani domaćih životinja zanemarila su učinke polifenola na

reproduktivne sposobnosti. Zapravo, ravnoteža između rizika i koristi od upotrebe polifenola može biti u korist njegove upotrebe u uzgoju životinja koje se uzgajaju za proizvodnju mesa, jer će negativni učinci, ako postoje, prestati do kraja proizvodnog ciklusa životinje. Međutim, koristi od uzgoja životinja mogu biti upitne; uglavnom zato što nepravilan unos polifenola ne samo da može utjecati na reproduktivne rezultate roditelja, već može uzrokovati i učinke na potomstvo (zbog epigenetskih promjena koje utječu na ekspresiju / programiranje gena, a time i na buduće rezultate i zdravstveno stanje bolesnog potomstva). Ovi epigenetski učinci se ne pojavljuju samo parenteralnom izloženošću, već i primjenom tehnike potpomognute reprodukcije (ART). U ART-u se također koriste polifenoli zbog antioksidativnih ili antibakterijskih učinaka, a uključeni su i u uzgoj spolnih stanica / zametaka. S obzirom na ta saznanja, upotrebu polifenola, i *in vivo* i *in vitro*, treba i dalje istraživati prije njihove sustavne primjene u praksi. Ovaj rad ima za cilj ilustrirati nedavna otkrića koja povezuju konzumaciju prehrambenih polifenola iz različitih izvora (konvencionalne krmne smjese, alternativni izvori krme i dodaci hrani) i reproduktivne performanse domaćih životinja, ali i dostupne informacije o upotrebi spojeva za ART. Također cilj ovog rada je prikazati pregled literature o trenutnom znanju s tog područja i predložiti buduća istraživanja usredotočena na formuliranje pravilne hranidbe i uvođenje novih biljnih vrsta / materijala i dodataka hrani za adekvatan pristup reproduktivnoj funkciji / stadiju životinja, izbjegavajući moguće reproduktivne rizike i povećavajući moguće koristi.

## 2. POLIFENOLI I NJIHOVE KORISTI

"Neka hrana bude vaš lijek, a lijek vaša hrana" izjavio je Hipokrat prije više od 2000 godina, a blagodati zdravlja prirodnih prehrambenih proizvoda razmatrala su se od davnina (Wegener, 2014.). Biljna hrana kao voće i povrće osigurava bitne hranjive sastojke za ljudski i životinjski organizam i igra presudnu ulogu za zdravlje. Istraživanja biljnih sekundarnih metabolita znatno su se povećavala u posljednjih nekoliko desetljeća iz razloga što je potvrđeno da djeluju na poboljšanje ljudskog zdravlja (Clydesdale i sur., 1985). Poznato je da ove fitokemikalije imaju presudnu ulogu u prilagodbi biljaka na njihov okoliš, ali također predstavljaju važan izvor aktivnih farmaceutskih proizvoda (Yue i sur., 2016.). Tijekom gotovo 200 godina moderne kemije i biologije objasnili su ulogu primarnih metabolita u osnovnim životnim funkcijama kao što su rast i razvoj, disanje, metabolizam i razmnožavanje. Polifenoli su raznolika, bioaktivna i raširena kategorija biljnih sekundarnih metabolita koji čine bitan dio ljudske prehrane i koji su od velikog interesa zbog svojih bioloških svojstava. Tijekom posljednjih desetljeća nekoliko je istraživanja ispitivalo zdravstvene prednosti polifenola (Visioli i sur., 2011.; Lu i sur., 2012.; Pinet i sur. 2015.). Redovita konzumacija hrane bogate polifenolima dovodi do smanjenja kardiovaskularnih bolesti, raka debelog crijeva, poremećaja jetre, pretilosti, dijabetesa itd. (Bravo i sur., 1998.; Khurana i sur. 2013.). U biljkama se ti spojevi obično sintetiziraju kao obrambena sredstva protiv fizioloških i okolišnih stimulusa. Što se tiče zdravstvenih dobrobiti polifenola za ljude, posvećuje se veća pažnja posljednjih godina, a mnogi aspekti njihovih kemijskih i bioloških aktivnosti su identificirani i procijenjeni (Pereira i sur. 2009.; Zhang i sur. 2016.). Prednosti polifenola uključuju njihovu pristupačnost, specifičnost odgovora i nisku toksičnost, dok su glavni problemi s tim spojevima brzi metabolizam i mala bioraspoloživost. Hrana sadrži složene mješavine polifenola, a brojni čimbenici mogu utjecati na koncentraciju polifenola u biljkama i prehrambenim proizvodima, uključujući okolišne (npr. izloženost suncu, kiša, drugačiji uzgoj, itd.) i biokemijske (npr. stupanj zrelosti, skladištenje i način kulinarske pripreme) čimbenike. Polifenoli, posebno njihovi glikozidi, najvažniji su biljni sekundarni metaboliti u ljudskoj prehrani koji imaju široku zdravstvenu korist za ljude (Xiao i sur., 2016.). Čini se da su spojevi iz prirodnih izvora pronašli posebno mjesto u farmaceutskoj industriji u posljednjih nekoliko desetljeća i sada se koriste za dizajn i razvoj novih farmakoloških lijekova. Uz to, ovi se spojevi naveliko koriste u farmaceutskim pokusima kako bi se poboljšala bioefikasnost i bioraspoloživost konvencionalnih lijekova. Pregled literature o polifenolima, koja pokriva preko 20000 objavljenih radova iz ovog područja

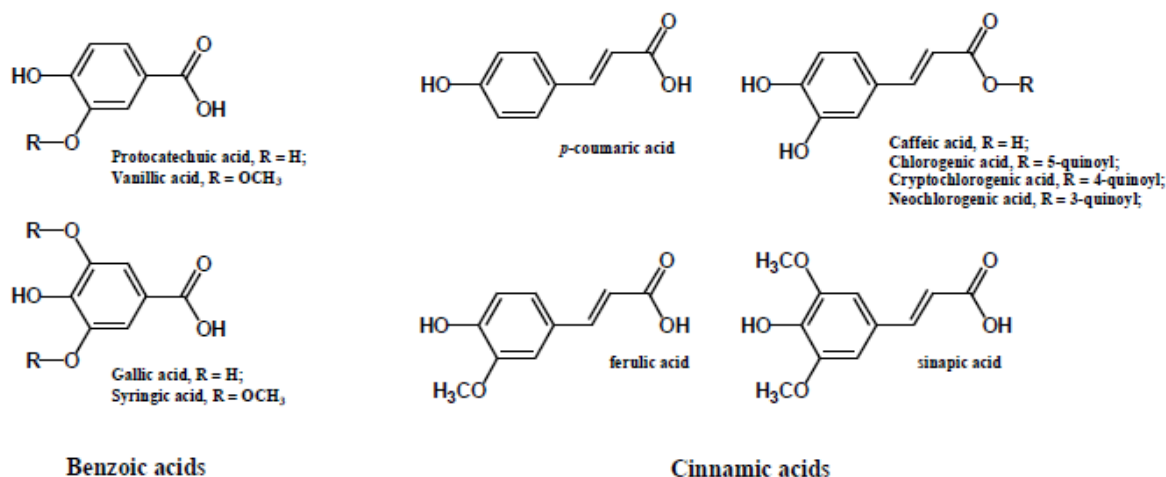
pokazalo je da više od polovice ovih molekula ima antibakterijsko, antifungalno, protuupalno i antitumorsko djelovanje, što odražava opsežnu blagodat polifenola za ljudsku zajednicu (Rendeiro i sur., 2013.).

## **2.1. Vrste polifenola**

Dijetalni fenoli ili polifenoli čine jednu od najbrojnijih i najrasprostranjenijih skupina prirodnih proizvoda u biljnom carstvu. Trenutno je više od osam tisuća poznatih fenolnih struktura, a među njima je identificirano preko četiri tisuće flavonoida (Harborne i sur. 2000; Bravo i sur.1998.; Cheynier i sur. 2005.) Iako su polifenoli kemijski karakterizirani kao spojevi s fenolnim strukturnim karakteristikama, ova skupina prirodnih spojeva vrlo je raznolika i sadrži nekoliko podskupina fenolnih spojeva. Voće, povrće, cjelovite žitarice i druge vrste hrane i pića poput čaja, čokolade kao i vina bogati su izvori polifenola. Raznolikost i široka rasprostranjenost polifenola u biljkama doveli su do različitih načina kategorizacije ovih prirodnih spojeva. Polifenoli su klasificirani prema izvoru podrijetla, biološkoj funkciji i kemijskoj strukturi. Također, većina polifenola u biljkama postoji u obliku glikozida s različitim ugljikohidratnim jedinicama i aciliranim ugljikohidratima na različitim položajima polifenolskih kostura. Klasifikacija polifenola u ovom će se radu provesti prema kemijskoj strukturi aglikona.

### **2.1.1. Fenolne kiseline**

Fenolne kiseline su ne - flavonoidni polifenolni spojevi koji se dalje mogu podijeliti u dvije glavne vrste, derivate benzojeve kiseline i cimetne kiseline na osnovi C1 - C6 i C3 - C6 okosnica (slika 1). Iako voće i povrće sadrži mnogo slobodnih fenolnih kiselina, u žitaricama i sjemenkama - posebno u mekinjama ili ljusci - fenolne kiseline su često u vezanom obliku (Kim i sur. 2006.; Adom i sur. 2002.; Chandrasekara i sur. 2010.). Te se fenolne kiseline mogu osloboditi ili hidrolizirati samo kiselinskom ili alkalnom hidrolizom ili enzimima.



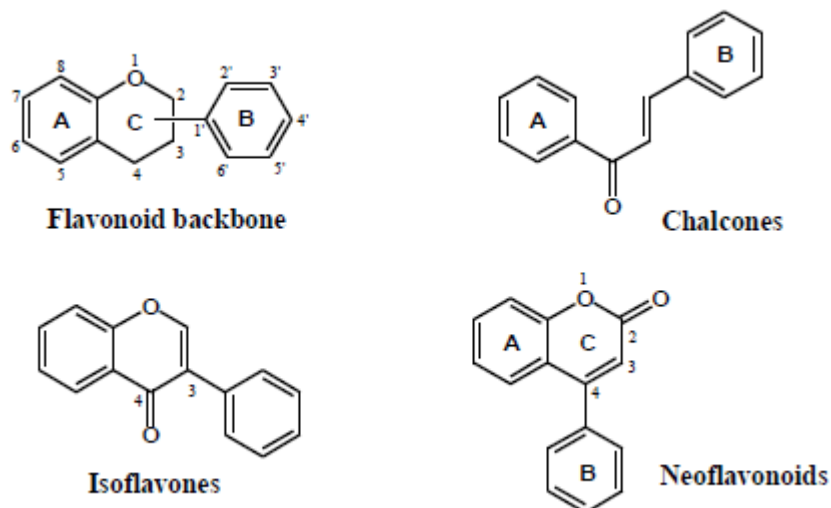
Slika 1. Tipične fenolne kiseline u hrani: lijevo, benzojeve kiseline; desno, cimetne kiseline.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

### 2.1.2. Flavonoidi

Flavonoidi imaju opću strukturnu okosnicu C<sub>6</sub> – C<sub>3</sub> – C<sub>6</sub> u kojoj su dvije C<sub>6</sub> jedinice (prsten A i prsten B) fenolne prirode (slika 2). Zbog hidroksilacije i varijacija u kromanskom prstenu (prsten C), flavonoidi se mogu dalje podijeliti u različite podskupine kao što su antocijani, flavan - 3 - oli, flavoni, flavanoni i flavonoli.

Halkoni, iako im nedostaje heterociklički prsten C, i dalje su kategorizirani kao članovi obitelji flavonoida. Osnovne strukture flavonoida su aglikoni; međutim, u biljkama većina ovih spojeva postoji u obliku glikozida. Biološke aktivnosti ovih spojeva, uključujući antioksidativno djelovanje, ovise i o strukturnoj razlici i o uzorcima glikozilacije (Tsao R., 2010.).

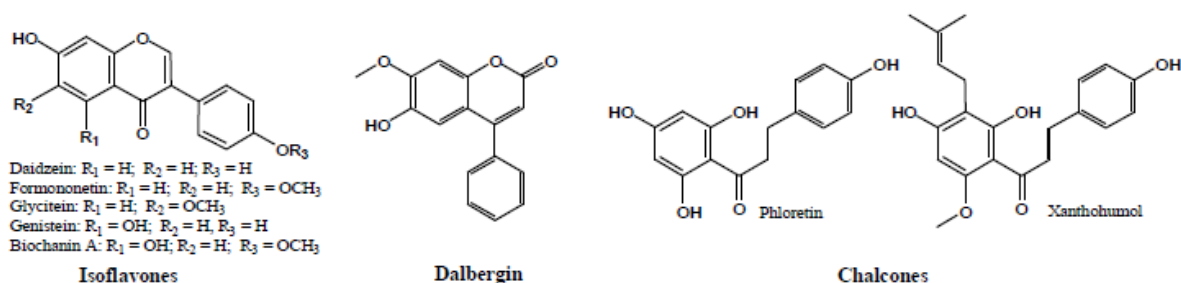


Slika 2. Osnovne flavonoidne strukture.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

### 2.1.3. Izoflavoni, neoflavonoidi i halkoni

Izoflavoni imaju svoj prsten B pričvršćen za C3 položaj prstena C (slika 3). Uglavnom ih ima u mahunarkama. Budući da je grah, posebno soja, glavni dio prehrane u mnogim kulturama, uzgoj izoflavona ima tako velik utjecaj na ljudsko zdravlje. Genistein i daidzein dva su glavna izoflavona koja se nalaze u soji, zajedno s gliceteinom, biochaninom A i formononetinom (Wang i sur. 1994.; Mazur i sur. 1998.) (slika 3). Ima ih i u crvenim djetelinama. Svi ovi izoflavonski aglikoni uglavnom se nalaze kao 7 - O - glukozidi i 6'' - O - malonil - 7 - O glukozidi. Neoflavonoidi se često nalaze u prehrambenim biljkama, ali dalbergin je najčešći i relativno široko rasprostranjen neoflavon u biljnom carstvu. Halkoni s otvorenim prstenom nalaze se u voću poput jabuka i hmelja ili piva.

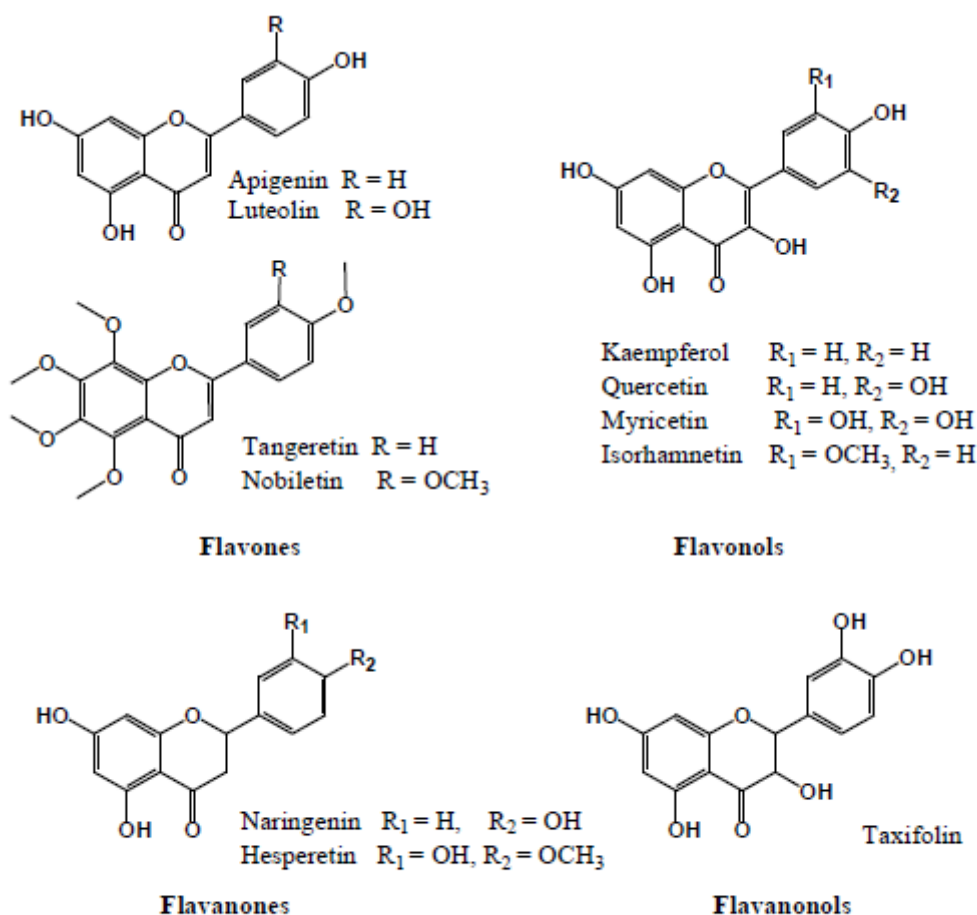


Slika 3. Tipični izoflavoni, neoflavoni i halkoni koji se nalaze u hrani.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

### 2.1.4. Flavoni, flavonoli, flavanoni i flavanonoli

Te su flavonoidne podskupine najčešće i gotovo sveprisutne u čitavom biljnom carstvu (slika 4). Flavoni i njihovi 3 - hidroksi derivati flavonoli, uključujući njihove glikozide, metoksidi i drugi acilirani proizvodi na sva tri prstena čine ovo najvećom podskupinom među svim polifenolima. Najčešći aglikoni flavonola, kvercetin i kempferol, sami imaju najmanje 279, odnosno 347 različitih glikozidnih kombinacija. Značajno se povećao broj flavanona i njihovih 3 - hidroksi derivata (flavanonoli, koji se nazivaju i dihidroflavonoli) koji su identificirani u posljednjih 15 godina. Neki flavanoni imaju jedinstvene supstitucijske uzorke, npr. prenilirani flavanoni, furanoflavanoni, piranoflavanoni, benzilirani flavanoni, što daje velik broj supstituiranih derivata ove podskupine. Dobro poznati flavanonol je taksifolin iz agruma (Grayer i sur. 2006.; Kawaii i sur. 1999.).



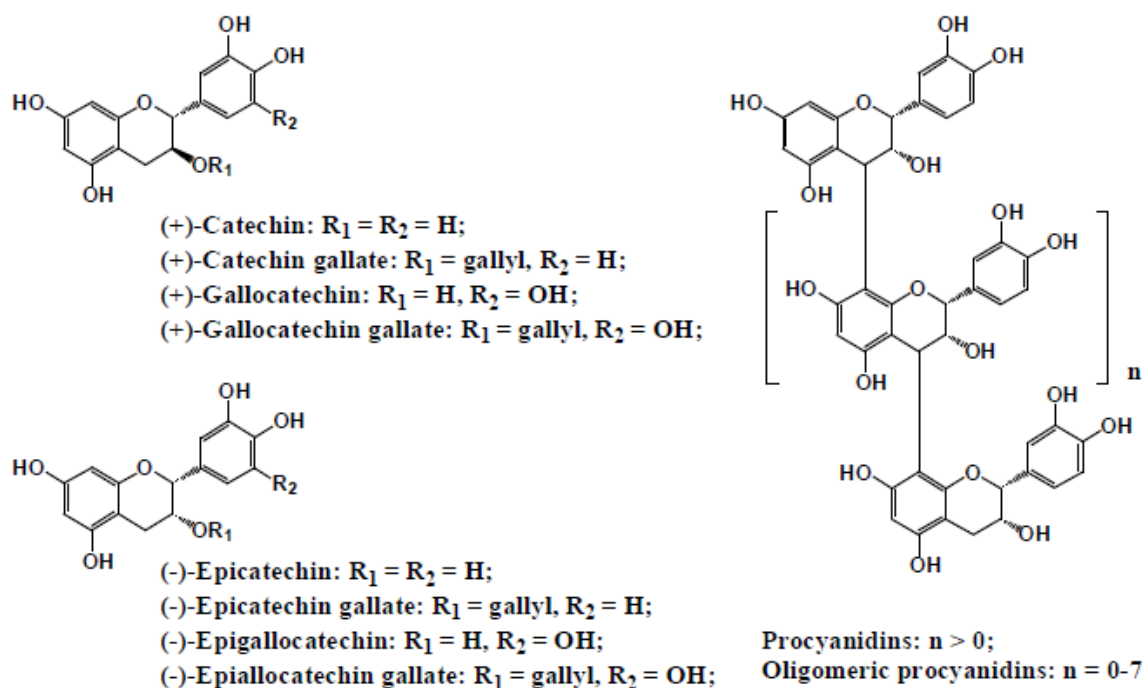
Slika 4. Flavoni, flavonoli, flavanoni i flavanonoli.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)



### 2.1.5. Flavanoli i proantocijanidini

Flavanoli ili flavan - 3 - oli često se nazivaju katehinima. Za razliku od većine flavonoida, ne postoji dvostruka veza između C2 i C3, niti C4 karbonila u prstenu C flavanola. Ovo i hidroksilacija na C3 omogućuje flavanolima da imaju dva kiralna centra na molekuli (na C2 i C3), dakle četiri moguća diastereoizomera. Katehin je izomer s trans konfiguracijom, a epikatehin s cis konfiguracijom. Svaka od ove dvije konfiguracije ima dva stereoizomera, tj. (+) - katehin, (-) - katehin, (+) - epikatehin i (-) - epikatehin. (+) - katehin i (-) - epikatehin dva su izomera koja se često nalaze u biljnoj hrani (slika 5). Flavanoli se nalaze u mnogim plodovima, posebno u kožicama grožđa, jabuke i borovnica. Monomerni flavanoli (katehin i epikatehin), njihovi derivati (npr. galokatehini) glavni su flavonoidi u lišću čaja i zrnu kakaoa (čokolada) (Si i sur. 2006.; Prior i sur. 2001.). Katehin i epikatehin mogu tvoriti polimere, koji se često nazivaju proantocijanidinima jer kiselo katalizirano cijepanje polimernih lanaca daje antocijanidine (slika 5).

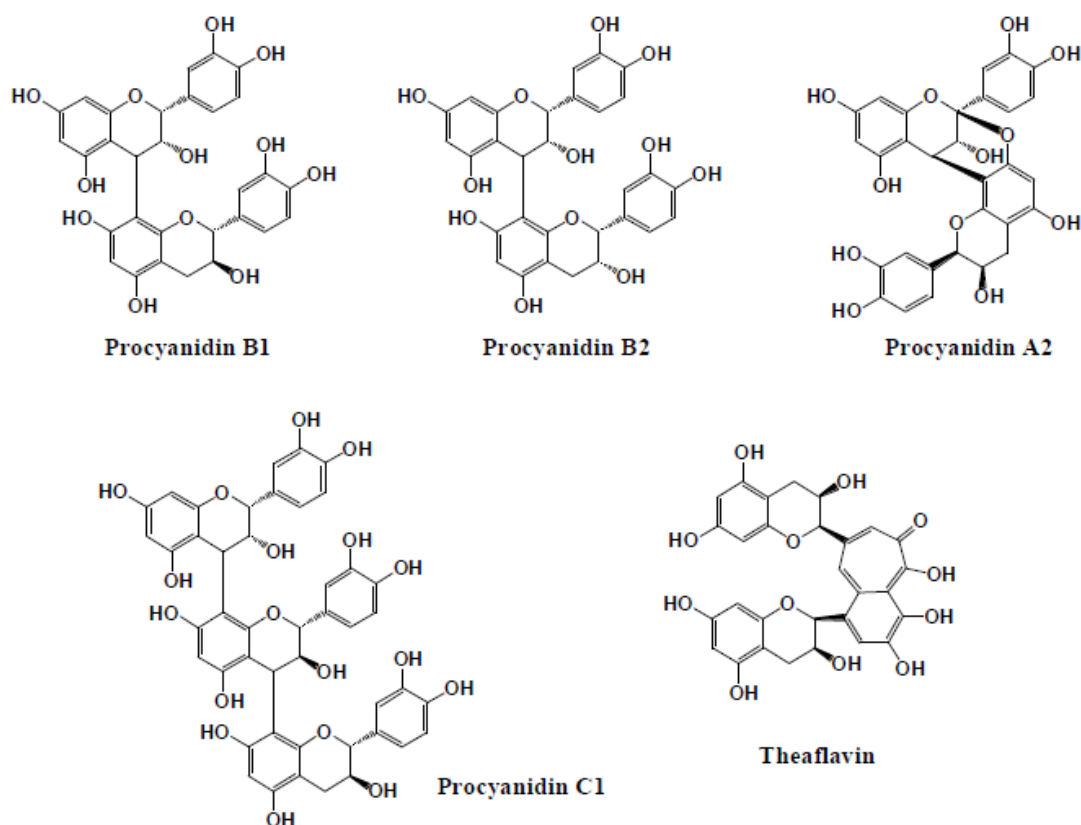


Slika 5. Flavanoli i procijanidini.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

Proantocijanidini se tradicionalno smatraju kondenziranim taninima. Flavanoli i oligomeri (koji sadrže 2 - 7 monomernih jedinica) poznati su kao jaki antioksidanti, koji su povezani s

nekoliko potencijalnih zdravstvenih blagodati. Ovisno o interflavanskim vezama, oligomerni proantocijanidini mogu biti struktura tipa A u kojoj su monomeri povezani C2 - O - C7 ili C2 - O - C5 vezom, ili B vrsta u kojoj su C4 - C6 ili C4 - C8 uobičajeni. Procianidin C1 je trimer. Također, flavanoli čaja mogu fermentirati jedinstvene dimere poput theaflavina (slika 6).



Slika 6. Tipični dimeri procijanidina, trimeri i theaflavin.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

### 2.1.6. Antocijanidini

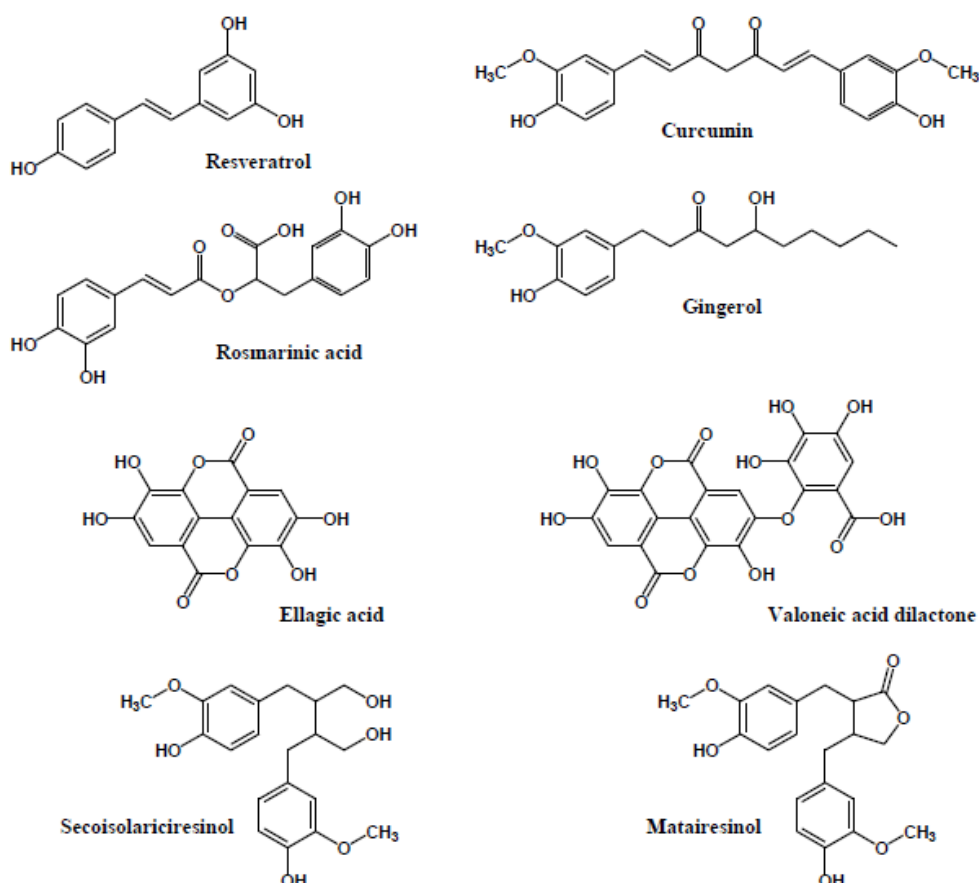
Antocijanidini su glavne komponente crvenog, plavog i ljubičastog pigmenta većine latica cvijeća, voća, povrća i nekih posebnih sorti žitarica, npr. crne riže (slika 7). Antocijanidini u biljkama uglavnom postoje u glikozidnim oblicima koji se obično nazivaju antocijaninima. Cijanidin, delphinidin i pelargonidin najčešći su antocijanidini. Zapravo, 90% antocijanina temelji se na cijanidinu, delfinidinu i pelargonidinu i njihovim metiliranim derivatima. Ukupno je poznato više od 500 antocijanina, ovisno o hidroksilaciji, uzorcima metoksilacije na B prstenu i glikozilaciji s različitim jedinicama šećera (Tsao i sur. 2009.; McCallum i sur.



(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

### 2.1.8. Ostali polifenoli

Pored fenolnih kiselina, flavonoida i fenolnih amida, postoji nekoliko ne - flavonoidnih polifenola koji se nalaze u hrani koja se smatra važnom za ljudsko zdravlje. Među njima je i resveratrol jedinstven za grožđe i crno vino; elaginska kiselina i njeni derivati nalaze se u bobičastom voću, npr. jagodama i malinama, te u kožicama različitih orašastih plodova. Lignani postoje u vezanim oblicima u lanu, sezamu i mnogim žitaricama; dolje prikazane strukture (slika 9) su proizvodi hidrolize. Kurkumin je snažni antioksidans iz kurkume (slika 9). Rozmarinska kiselina je dimer kafene kiseline, a elaginska kiselina dimer galne kiseline. Iako se i galna i elaginska kiselina nalaze u slobodnim oblicima, njihovi esteri glukoze, skupina poznata kao hidrolizirani tanini, također postoje u različitim biljkama. Ti spojevi mogu posjedovati anti - hranjiva svojstva (Tsao R., 2010.).



Slika 9. Ostali važni polifenoli.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

## 2.2. Antioksidativna aktivnost polifenola

Polifenoli su sekundarni metaboliti koje biljke proizvode kako bi se zaštitile od drugih organizama. Dokazano je da prehrambeni polifenoli igraju važnu ulogu u ljudskom zdravlju. Visok unos voća, povrća i cjelovitih žitarica, bogatih polifenolima, povezan je sa smanjenim rizicima od mnogih kroničnih bolesti, uključujući karcinom, kardiovaskularne bolesti, kronične upale i mnoge degenerativne bolesti (Milner i sur. 1994.; Duthie i sur. 1994.). Nedavna istraživanja otkrila su da su mnoge od ovih bolesti povezane s oksidativnim stresom reaktivnih vrsta kisika i dušika. Fitokemikalije, posebno polifenoli, najviše pridonose ukupnim antioksidativnim aktivnostima voća, a ne vitamin C. Utvrđeno je da su polifenoli snažni antioksidansi koji mogu neutralizirati slobodne radikale donirajući elektron ili vodik. Visoko konjugirani sustav i određeni uzorci hidroksilacije, poput 3 - hidroksi skupine u flavonolima, smatraju se važnima u antioksidacijskim aktivnostima. Polifenoli suzbijaju stvaranje slobodnih radikala, smanjujući tako brzinu oksidacije inhibirajući stvaranje ili deaktiviranje aktivnih vrsta i prekursora slobodnih radikala. Češće djeluju kao hvatači izravnih radikala u lančanim reakcijama peroksidacije lipida (prekidači lanca). Prekidači lanca doniraju elektron slobodnom radikalu, neutralizirajući radikale te tako postaju stabilni (manje reaktivni) radikali, zaustavljajući tako lančane reakcije. Pored uklanjanja radikala, polifenoli su poznati i kao kelatori metala. Kelacija prijelaznih metala poput  $Fe^{2+}$  može izravno smanjiti brzinu Fentonove reakcije, sprječavajući tako oksidaciju uzrokovanu visoko reaktivnim hidroksilnim radikalima. Polifenoli ne djeluju sami. Utvrđeno je da polifenoli zapravo mogu funkcionirati kao ko - antioksidansi i sudjelovati u regeneraciji esencijalnih vitamina. Nekoliko *in vitro* antioksidativnih modela razvijeno je za procjenu ukupnih antioksidativnih aktivnosti. Iako su ove metode ograničene u smislu sličnosti s mehanizmima antioksidativnog djelovanja u biološkom sustavu, oni zajedno mogu dobro prikazati kako polifenoli djeluju kao antioksidansi, a time i rasvijetliti stvarnu ulogu polifenola u ljudskom zdravlju. S gledišta kemije, molekule polifenola, nakon što doniraju elektron ili atom vodika, postaju slobodni radikali, s obzirom na dovoljnu koncentraciju, te stoga mogu potencijalno prouzrokovati prooksidacijske aktivnosti. Međutim, pitanje je hoće li se takva prooksidacijska aktivnost pojaviti *in vivo* i naštetiti čovjeku ili ne, potrebna su daljnja istraživanja (Halliwell i sur., 2008.).

Uz gore navedeni mogući način antioksidativnog djelovanja, drugi mehanizmi poput inhibicije ksantin oksidaze i povišenja endogenih antioksidansa također se smatraju važnima. Polifenoli mogu inducirati antioksidativne enzime poput glutation peroksidaze,

katalaze i superoksid dismutaze koji razlažu hidroperokside, vodikov peroksid i superoksidne anione, te inhibirati ekspresiju enzima kao što je ksantin oksidaza (Du i sur. 2007.). Iako izravne i neizravne antioksidativne aktivnosti polifenola mogu igrati važnu ulogu u smanjenju oksidacijskog stresa pomoću gore spomenutih mehanizama, stvarne uloge na staničnoj razini ovih spojeva mogu biti složenije. Postoji novo stajalište da fitokemikalije, posebno polifenoli i njihovi *in vivo* metaboliti, ne djeluju kao konvencionalni antioksidanti koji doniraju vodik ili elektron, već mogu vršiti modulacijsko djelovanje u stanicama djelovanjem na signalne puteve protein kinaze i lipid kinaze. Iako se polifenoli poput flavonoida mogu apsorbirati kroz gastrointestinalni trakt, koncentracije u plazmi su niske, obično manje od 1  $\mu\text{mol} / \text{L}$ , dijelom i zbog brzog metabolizma u ljudskim tkivima. To je veoma niska koncentracija da bi većina polifenola pokazala bilo kakve značajne i izravne antioksidativne aktivnosti, pa su neki istraživači čak zauzeli stav da je malo vjerojatno da polifenoli djeluju kao antioksidanti *in vivo*. Stoga treba obratiti pozornost na funkcije izvan uobičajenih antioksidativnih aktivnosti. Nutrigenomija se kao rezultat takvih stajališta pojavila kao novo multidisciplinarno područje istraživanja, ne samo na polifenolima, već i na fitokemikalijama u cjelini. Učinci na biomarkere koji su uključeni u gore navedene i druge puteve mogu dovesti do promjena u staničnim funkcijama, a time i potencijalnih zdravstvenih koristi. Williams i sur. (2004.) također sugeriraju da su za jasno razumijevanje mehanizama djelovanja flavonoida, bilo kao antioksidansi ili modulatori stanične signalizacije, te utjecaj njihovog metabolizma na ta svojstva ključni za procjenu ovih snažnih biomolekula kao antikancerogenih sredstava, kardioprotektora i inhibitora neurodegeneracije (Williams i sur., 2004.). Buduća istraživanja polifenola nesumnjivo vode u istom smjeru.

### 3. IZVORI POLIFENOLA U HRANIDBI ŽIVOTINJA

Većina domaćih životinja, kao biljojedi, prirodno su izloženi velikim količinama polifenola kao dio svog uobičajenog sustava hranidbe. Mnoge sjemenke i krmiva koja se koriste u hranidbi domaćih životinja sadrže polifenole različitih koncentracija i oblika, dajući svakoj biljci svoj jedinstveni polifenolski profil (Tablica 1). Na primjer, formononetin, daidzein, genistein i biochanin A su glavni polifenoli u korijenu *Trifolium (T.)* (djeteline) i *T. Pratense* (crvene djeteline) koji sadrže izoflavone, koji čine do 5% suhe tvari, dok su kumestani glavni polifenoli u *Medicago sativa* (lucerni) i *Melilotus albus* (bijelom kokotcu) (Reed i sur., 2016).

Tablica 1. Izvori polifenolnih spojeva u sastojcima hrane za domaće životinje.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

| Dijetalni izvor  | Ukupno fenola, mg / g DM | Glavna klasa | Identificirani polifenolni spojevi   |
|--|--------------------------|--------------|--|
| <b>Koncentrati za hranu</b>                              |                          |              |  |
| <i>Glycine max</i> (soja)                                | 2.23 - 6.18              | Izoflavon    | Genistein, daidzein, glicitein, formononetin, puerarin, kumestrol  |
| <i>Linum usitatissimum</i> (lan)                         | 8.0 - 10.0               | Lignani      | Secoisolariciresinol, matairesinol, pinoresinol, pinoresinol, izolariciresinol, esterificirane fenolne kiseline, Kempferol, herbacetin |
| <b>Krma i grmlje</b>                                     |                          |              |  |
| <i>Trifolium Subterraneum</i> (podzemna djetelina)       | 24.2 - 114.2             | Flavonoidi   | Flavonoidi, poput flavona, flavonola i izoflavoni  |
| <i>Trifolium pratense</i> (crvena djetelina)             | 14.82                    | Izoflavoni   | Formononetin, biochanin A, genistein, daidzein, ononin, sissotrin, fenolne kiseline  |
| <i>Trifolium Alexandrinum</i> (aleksandrijska djetelina) | 52.55                    | Izoflavon    | Biochanin A, formononetin, genistein, daidzein, ononin, sissotrin, klovamidi (derivati kofeinske kiseline), fenolne kiseline           |
| <i>Medicago sativa</i> (lucerna)                         | 70.50                    | Kumestani    | Kumestani, formononetin, biochanin A, genistein, daidzein, ononin, sissotrin   |

|   |               |                                |  |
|---|---------------|--------------------------------|--|
| <i>Sesbania sesban</i><br>(sesbania)              | 167.66        | Tanini, fenolne<br>kisljine    | Galska kislina, katehin<br>hidrat, vanilinska kislina,<br>kofeinska kislina,<br>epikatehin, rutin elaginska<br>kislina, miricetin,<br>kempferol, kvercetin   |
| <i>Moringa<br/>Oleifera</i> (konjska<br>rotkvica) | 96.30         | Flavonoli,<br>fenolne kisljine | Kafeoilkininske kisljine,<br>karotenoidi, lutein,<br>kempferol, kvercetin,<br>elagična kislina i apigenin<br>glukozid, miricetin, rutin,<br>izorhamnetin, ferulinska<br>kislina, kumarinske<br>kisljine, kafeinska kislina,<br>galna kislina, elagična<br>kislina, klorogenska<br>kislina, epikatehin  |
| <i>Lotus<br/>corniculatus</i><br>(svinđuša)       | -             | Flavonoidi                     | Kempferol, kvercetin,<br>izorhamnetin i njihovi<br>derivati  |
| <i>Cichorium intybus</i><br>(cikorija)            | 0.65 - 3.73   | Flavonoidi                     | Klorogenske i kofeinske<br>kisljine  |
| <i>Salix</i> (vrba)                               | 212.0         | Tanini                         | Kondenzirani tanini,<br>salicilati, derivati cimetine<br>kisljine, galna kislina,<br>kofeinska kislina, vanilin,<br>p-kumarska kislina,<br>miricetin, katehin,<br>epigalokatehin galat, rutin,<br>kvercetin, salicin   |
| <i>Acacia etbaica</i><br>(bagrem)                 | -             | Tanini                         | Proantocijanidin, derivati<br>galoila, kempferol,<br>kvercetin, miricetin  |
| <i>Quercus robur</i><br>(hrast lužnjak)           | 25.30 - 50.95 | Tanini                         | Elagitanini (roburin A, B,<br>C, D, E; grandinin,<br>veskalagin; kastalagin),<br>protokatehuinska kislina /<br>aldehid, galna kislina,<br>vanilinska kislina,<br>kafeinska kislina, vanilin,<br>siringaldehid, kumarska<br>kislina, skopoletin,<br>ferulinska kislina,<br>sinapinska kislina,<br>koniferil aldehid,<br>sinapaldehid, elagična<br>kislina |



| Agroindustrijski<br>nusproizvodi i<br>dodaci hrani |                 |                       |  |
|--|-----------------|-----------------------|--|
| <i>Vitis vinifera</i><br>(vinova loza)             | 14.8 - 70.5     | Tanini,<br>antocijani | Antocijanini, kondenzirani tanini, katehin, epikatehin, galne kiseline, cijanidin - 3 - glukozid, malividin - 3 - glukozid, peonidin, resveratrol  |
| <i>Olea europaea</i><br>(maslina)                  | 4.1 - 19.4      | Flavanon              | Tirozol, hidroksitirozol, oleuropein, verbakozid, rutin, luteolin, apigenin, kvercetin   |
| <i>Citrus sinensis</i><br>(slatke naranče)         | 104 - 223       | Flavanon              | Hesperidin, kvercetin, eriocitrin, narirutin, izosakuranetin rutinozid, kempferol, galna kiselina, ferulinska kiselina, p - kumarna, katehini, epikatehini   |
| <i>Punica granatum seed</i> (obični morganj)       | 27.2            | Tanini                | Flavonoidi, antocijani, tanini koji se mogu hidrolizirati, galna kiselina  |
| <i>Punica granatum Peel</i> (obični morganj)       | 48.3            | Tanini                | Galska kiselina, punikalagin, punikalin, flavonoidi, hidrolizirani tanini, kondenzirani tanini   |
| <i>Solanum lycopersicum</i><br>(rajčica)           | 6.1 - 6.4       | Flavonoli             | Naringenin, rutin, kvercetin, kempferol  |
| <i>Citrus aurantifolia</i><br>(limeta)             | 104 - 223       | Flavanon              | Hesperidin, kvercetin, kempferol, galna kiselina, ferulinska kiselina, p - kumarna, katehini, epikatehini  |
| <i>Camellia sinensis</i><br>(zeleni čaj)           | 148.16 - 252.65 | Katehini              | Katehin, epikatehin, galokatehin, epigalokatehin, katehin galat, epikatehin galat, galokatehin galat, galna kiselina, elagična kiselina, kvercitrin, astragalin, kvercetin, kempferol, klorogenska kiselina, miricetin |
| <i>Phoenix dactylifera</i><br>(datulja)            | 12.7 - 47.7     | Fenolne kiseline      | Hidroksitirozol, tirozol oleuropein, galna kiselina, ferulinska kiselina, kumarinske kiseline, p - hidroksibenzojeva kiselina, flavonoidi  |

|                 |               |                                 |   |
|-----------------|---------------|---------------------------------|---|
| <i>Propolis</i> | 65.49 - 228.4 | Fenolne kiseline,<br>flavonoidi | Galska kiselina, kofeinska kiselina, katehin, klorogenska kiselina, p-kumarska kiselina, ferulna kiselina, naringenin, kvercetin, apigenin, baikalin, luteolin, pinocembrin, galangin |
|-----------------|---------------|---------------------------------|---|

U tradicionalnim poljoprivrednim sustavima vrste *Glycine max* (soja), *Linum usitatissimum* (laneno sjeme) i djeteline poput *T. subterraneum* (podzemna djetelina), *T. pratense* (crvena djetelina), *Trifolium alexandrinum* (aleksandrijska djetelina) najčešći su izvori polifenola u hranidbi životinja.

Zbog ograničenja tradicionalnih resursa za stočnu hranu, mnoge se alternative kao što su grmlje i drveće uvode kao nova hrana za životinje. Zanimljivo je da pronađene alternative sadrže znatne količine polifenola. U tim biljkama tanini se mogu naći u gotovo 80% drvenastih višegodišnjih dvosupnica i 15% jednogodišnjih i zeljastih višegodišnjih dvosupnica kao što su drveće, grmlje, mahunarke, bilje i žitarice. Mnogi od njih koriste se kao hrana za životinje kao što su *Dichrostachys* (bagrem), *Dorycnium* (bjeloglavica), *Hedysarum* (sladkovina), *Leucaena* (bijeli bagrem), *Onobrychis* (esparzeta), *Populus* (topola), *Rumex* (štavelj), *Salix* (vrbe), *Quercus robur* (hrast lužnjak) s prevalencijom kondenziranih tanina koji čine do 20% suhe tvari (Mueller - Harvey i sur., 2019.).

Uključivanje agroindustrijskih nusproizvoda u hranidbu uzgajanih životinja paralelno je s pozivima na upotrebu dodataka hrani za životinje na bazi polifenola zbog njihove antioksidativne aktivnosti za koju se tvrdi da ima blagotvorne učinke na karakteristike domaćih životinja i kvalitetu životinjskih proizvoda (meso i mlijeko). Agroindustrijski nusproizvodi, poput industrijskih nusproizvoda od voća i povrća, uvode se kao nekonvencionalna hrana za životinje (Tablica 1); među njima su najviše korišteni *Vitis vinifera* (vinova loza), *Punica granatum* (šipak), *Olea europaea* (maslina), *Camellia sinensis* (zeleni čaj), *Solanum lycopersicum* (rajčica) i ostaci *Citrus aurantifolia* (limeta). Svaki od ovih nusproizvoda ima jedinstveni profil polifenola (Tablica 1).

S tim u vezi, ostaci *Vitis vinifera* sadrže flavonoide (antocijani ili kvercetin), stilbene (resveratrol) i tanine, dok su ostaci *Camellia sinensis* bogati flavonoidima (katehini), a ostataka *Olea europaea* ima u izobilju u fenolnim kiselinama (hidroksitirozol i tirozol) (Leouifoudi i sur., 2015.). Te činjenice navode na zaključak da se od domaćih životinja

očekuje da masovno konzumiraju prehrambene polifenole u dnevnom unosu obroka tijekom svog životnog ciklusa. U skladu s tim, kvaliteta ovih biljnih materijala utječe na karakteristike domaćih životinja, posebno na reproduktivne, što dovodi do minimalno mogućeg reproduktivnog otpada kao i posljedica gubitka ekonomske učinkovitosti farme.

## 4. UNOS, APSORPCIJA, BIORASPOLOŽIVOST I BIOAKTIVNOST POLIFENOLA

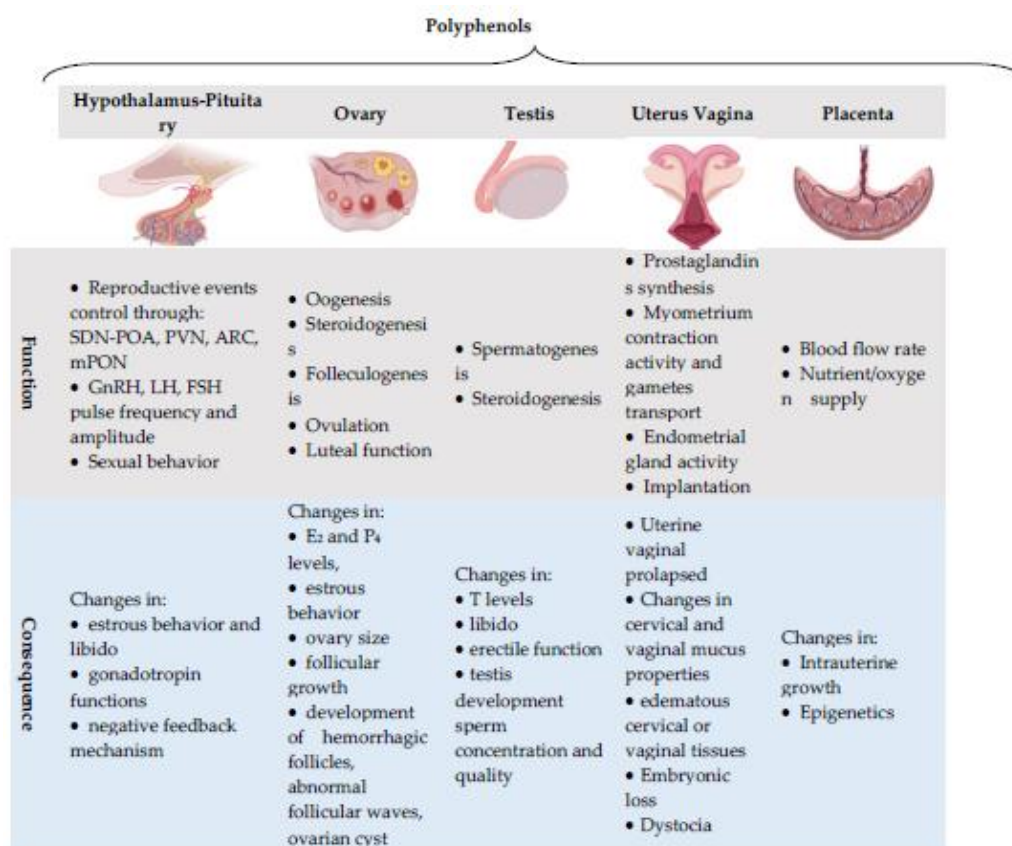
Biljni polifenoli su sekundarni metaboliti, koji presudno doprinose obrambenim mehanizmima biljaka od napada patogena i insekata, biljojeda, ranjavanja, sunčevog zračenja i drugih stresnih stanja. Do danas je oko osam tisuća molekula identificirano kao polifenoli i klasificirano prema kemijskoj strukturi u flavonoidima, neflavonoidima, fenolnim kiselinama i taninima (Slika 1). Flavonoida i fenolnih kiselina ima najviše i oni čine oko jedne, odnosno dvije trećine ukupnih polifenola. Biljni polifenoli konjugirani su s ostacima šećera i / ili drugim fenolima, organskim kiselinama, aminima i lipidima (Tsao i sur., 2010.). Nakon unosa, manje od 5 - 10% biljnih polifenola apsorbira se kroz enterocite, bilo pasivnom difuzijom ili selektivnim transportiranjem, ali samo ako su u obliku aglikona ili jednostavnih glikozida. Te činjenice ugrožavaju njegovu kinetiku kroz probavni trakt i njegovu dostupnost za kasniju metabolizaciju normalnim biološkim putovima, pa bioraspoloživost polifenola u većini slučajeva može biti nedovoljna da izazove značajne biološke učinke. Različita istraživanja potvrdila su bioraspoloživost i bioaktivnost polifenola, bilo izravno mjerenjem njihovih koncentracija ili njihovih metabolita u plazmi i mokraći, bilo neizravno dokazima povećanog antioksidativnog kapaciteta plazme ili tkiva (Huang i sur., 2018.). Bioraspoloživost polifenola potvrđena je u različitim reproduktivnim organima, uključujući reproduktivne centre u mozgu (hipotalamus i hipofiza), testis, jajnik, posteljica maternice i fetus, što potvrđuje sposobnost polifenola da prolaze kroz različite krvotočne barijere reproduktivnih organa i stoga utječe na njihove fiziološke funkcije. Međutim, bioraspoloživost polifenola kroz reproduktivne organe ovisi o nekoliko čimbenika kao što su vrsta polifenola, selektivni transport kroz tkiva i fiziološki status životinje. Selektivnost tkiva na različite polifenole dokazano je uspoređivanjem koncentracija katehina u majčinoj krvi, posteljici i fetusu kod štakora nakon primanja epikatehina i epigalokatehin - 3 - galata (EGCG) u obliku ekstrakta *Camellia sinensis* (zeleni čaj). Majčina plazma pokazala je 10 puta višu razinu katehina od placente i 50 - 100 puta višu od fetusa. Međutim, također je važno naglasiti da su placenta i fetus pokazali nisku razinu epikatehina i visoku razinu EGCG - a, što sugerira da se epikatehin, suprotno od EGCG, dobro apsorbira i distribuira u majčinoj cirkulaciji, ali ne i u embriju. Fiziološki status životinje također je presudan za bioraspoloživost polifenola, što je potvrđeno istraživanjima koja su uspoređivala koncentracije izoflavona i njihovih metabolita u krvnoj plazmi kod visoko ili rano bređih junica, gdje su pronađene znatno veće koncentracije kod rano bređih junica.

Zdravstveno stanje i promjene imunološkog i pro / protuupalnog statusa također su presudni čimbenici koji utječu na bioraspoloživost polifenola. U tom smislu, utvrđeno je da protupalni status, kakav se javlja tijekom mastitisa i metritisa, povećava bioraspoloživost izoflavona i njihovih metabolita (Woclavek – Potočka i sur., 2013.). Bioaktivnost polifenola osim toga ovisi o još nekoliko čimbenika, uključujući molekularnu masu polifenola, njegovu konjugaciju s drugim derivatima, njegovu hidrolizu enzimima probavnog trakta (želudac i crijeva), djelovanje mikroflore buraga, cekula i afinitet vezanja za proteine krvne plazme. Djelovanje enzima iz probavnog trakta i mikroflore dovelo je do stvaranja novih metabolita polifenola različitog biološkog djelovanja od izvornih spojeva. Na primjer, lignani (npr.: matairesinol, lariciresinol i secoisolariciresinol) mogu se metabolizirati gastrointestinalnim bakterijama u snažnije estrogene „lignane sisavaca“ (enterodiol i enterolakton). Na primjer, izoflavoni poput genisteina i biochanina A pretvaraju se u nestrogeni metabolit (p - etil fenol), dok se formononetin i daidzein pretvaraju u moćan estrogenu metabolit (ekvol). Učinci uzrokovani ekvolom, metabolitom formononetina i daidzeina, najpoznatiji su primjeri koji naglašavaju važnost testiranja upotrebe polifenola u životinjskoj proizvodnji; reproduktivni poremećaji uočeni u stadima ovaca hranjenih *T. pratense* (nazvanom bolest djeteline (Reed i sur., 2016.).

## 5. POLIFENOLI I REPRODUKTIVNI DOGAĐAJI *IN VIVO*

Polifenoli su, kao što je prethodno navedeno, iskazali ogromnu količinu blagotvornih djelovanja (antioksidativna, protuupalna, antimikrobna, antihelmintska, antimetanogena...), ali i druge neželjene učinke. Prepoznati su kao glavni spojevi koji mogu narušiti okoliš i promijeniti hormonalnu ravnotežu kod sisavaca i reproduktivne funkcije kod muškaraca i kod žena (Hashem i sur., 2016.). Jedinstvena kemijska struktura polifenola i njegova sličnost s kemijskom strukturom estrogena sisavaca, omogućuje im da imaju hormonske učinke vezanjem i aktiviranjem estrogenskih receptora (ER: ER $\alpha$  i ER $\beta$ ), koji rezultiraju estrogen - agonističkim ili antagonističkim učincima. Afinitet vezanja polifenola za ER (estrogenske receptore) određuje se njihovom kemijskom strukturom, uz prisustvo fenolnog prstena koji je odgovoran za vezanje na ER, molekularnom težinom i optimalnim uzorkom hidroksilacije. Sveukupno, afinitet vezanja polifenola uvijek je manji od prirodnog liganda estradiola (E2) i estrogen - agonistički ili antagonistički učinci modulirani su činjenicom da, za razliku od E2, koji se s sličnim afinitetom veže za oba podtipa ER - a, polifenoli imaju različiti afinitet vezanja za dva podtipa ER - a (osim resveratrola, s usporedivim afinitetom za obje podvrste ER). S tim u vezi, genistein, daidzein, equol (ekvol) i koumestrol pokazuju veći afinitet za ER $\beta$  nego za ER $\alpha$ , s estrogenom aktivnošću kumestrola koja je oko 15 puta veća od izoflavona, genisteina, biochanina A i formononetina. Suprotno tome, 8 - prenilnaringenin ima oko 100 puta veći afinitet za ER $\alpha$ , ali slabiji za ER $\beta$  od genisteina. Dakle, različiti afiniteti polifenola prema oba podtipa ER i različita raspodjela ER među reproduktivnim tkivima uvelike utječu na konačni rezultat izloženosti polifenolima (Cipolletti i sur., 2018.). Kroz ovaj način djelovanja polifenoli mogu intervenirati u regulaciji svih reproduktivnih događaja hormonskom modulacijom neurohormona (hormon koji oslobađa gonadotropin, GnRH i oksitocin), gonadotropini (luteinizirajući hormon, LH i folikul - stimulirajući hormon FSH), steroidi (E2, progesteron, P4 i testosteron, T) i prostaglandini. Polifenoli također mogu kontrolirati funkciju steroida vezanjem ili inaktivacijom enzima za proizvodnju spola, poput aromataze P450, 5 $\alpha$  - reduktaze, 17 $\beta$  - hidroksisteroidne dehidrogenaze (17 $\beta$  - OHDH), topoizomeraze i tirozin kinaze. Uz to, polifenoli mogu promijeniti afinitet za globulinom koji veže spolni hormon (SHBG), a time i razinu aktivnih steroida u cirkulaciji krvi (Yousif i sur., 2019.). Polifenoli također mogu utjecati na reproduktivne funkcije kontroliranjem ekspresije gena ili aktivnošću enzima koji doprinose regulaciji reproduktivnih događaja: (1) aktivnost enzima koji kontroliraju replikaciju DNA (topoizomeraze I i II) i kinaze regulirane izvanstaničnim signalom; (2)

antioksidativni i upalni molekularni putovi; (3) stanični apoptotični i putovi širenja; (4) modifikacija ekspresije gena povezanih sa sintezom čimbenika angiogeneze u različitim reproduktivnim tkivima; (5) epigenetski mehanizmi koji uključuju hipermetilaciju i hipometilaciju; (6) regulacija metaboličkih hormonskih signala kao što su hormoni rasta, inzulinski faktori rasta i trijodotironin; i (7) modifikacija ekspresije gena povezanih s metabolizmom masnih kiselina. Stoga, polifenolni spojevi, zbog svojih svestranih bioloških funkcija, mogu utjecati na reproduktivne funkcije na različitim nivoima i gotovo se preklapati sa svim reproduktivnim događajima *in vivo* i intervenirati na uspjehu *in vitro* ART - a, kao što je sažeto na Slici 10. i raspravljeno u sljedećim odjeljcima.



Slika 10. Učinci polifenola na funkcije reproduktivnih organa i njegove posljedice.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

Kratice: spolno dimorfna jezgra preoptičkog područja (SDN - POA), paraventrikularna jezgra (PVN) lučna jezgra (ARC), medijalno pre - optičko područje (mPOA), hormon koji oslobađa gonadotropin (GnRH), luteinizirajući hormon (LH), folikul stimulirajući hormon (FSH), estradiol (E<sub>2</sub>), progesteron (P<sub>4</sub>), testosteron (T). Promjene se odnose na: pozitivne ili negativne učinke.

Sažetak nedavnih *in vivo* istraživanja o učincima polifenola na reproduktivnu sposobnost mužjaka i ženki domaćih životinja prikazan je u Tablicama 2 i 3. Ukratko, ova istraživanja govore o tome da domaće životinje koje konzumiraju hranu osnovanu na sjemenkama i / ili krmi s polifenolnim spojevima izoflavona i lignana (fitoestrogeni) dokazuju značajne reproduktivne poremećaje u spolnoj aktivnosti, hormonalnoj ravnoteži i funkciji spolnih žlijezda (*T. pratense* (crvena djetelina), *T. alexandrinum* (aleksandrijska djetelina)). Hranidba na bazi *Glicina max* (soje) ili *Linum usitatissimum* (laneno sjeme), prikriva sve pozitivne učinke na antioksidativno djelovanje i redoks homeostazu (Abo - Elsoud i sur., 2019.). Negativne učinke na reproduktivna svojstva uzrokuju hormonsko slični učinci, koji djeluju kao agonisti i / ili antagonisti estrogena polifenolskih spojeva poznatih kao fitoestrogeni (flavonoidi, lignani i stilbeni).

Tablica 2. Sažetak nedavnih *in vivo* istraživanja o učincima polifenola na reproduktivne karakteristike kod mužjaka domaćih životinja. IVF = *in vitro* oplodnja.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

| Životinja    | Tretman   | Glavni rezultati  |
|--------------|---|---|
| Barki ovnovi | 0,40 mg / kg ekstrakta lišća <i>Moringa oleifera</i> (konjske rotkvice) | - Svježe sjeme: povećani volumen sjemena, koncentracije sperme, aktivnosti sjemene katalaze u plazmi, glutation peroksidaze, glutation reduktaze, superoksid dismutaze, alkalne fosfataze, kisele fosfataze, askorbinske kiseline i ukupni antioksidativni kapacitet<br>- Smrznuto - odmrznuto sjeme: povećana pokretljivost spermija nakon odmrzavanja, indeks |



|                  |  |  |
|------------------|--|--|
|                  |  | <p>održivosti, integritet membrane i aktivnosti enzima antioksidansa sjemena</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Smanjena koncentracija malondialdehida u sjemennoj plazmi, akrosomski nedostaci i fragmentacija DNA</li> </ul>   |
| Vepar            | 0, 2, 4% pulpe <i>Vitis vinifere</i> (vinove loze)   | <p>Obje razine:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Poboljšane kinetičke varijable, integritet membrane svježeg i uskladištenog sjemena (hlađenje na 17 ° C)</li> <li>- Smanjene abnormalnosti sperme i peroksidacija lipida u svježem i uskladištenom sjemenu</li> </ul> |
| Janjad (mužjaci) | 0, 4, 8% hranidbe lanenim sjemenom <i>Linum usitatissimum</i>                                    | <p>Sa 8%:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Smanjen sadržaj testosterona i genomske DNA u krvi</li> <li>- Povećan hormon rasta i stimulirajući hormon štitnjače</li> </ul>  |
| Zečevi (mužjaci) | 0, 5, 20 mg / kg tjelesne težine izoflavona <i>Glicine max</i> (soja) (5 daidzein : 1 genistein) | <p>Na obje razine:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Smanjen libido, koncentracija sperme i testosteron</li> <li>- Povećan trijodtironin</li> </ul> <p>Pri 20 mg / kg tjelesne težine:</p>  |

|                   |  |  |
|-------------------|--|--|
|                   |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Povećani ukupni antioksidativni kapacitet i smanjeni malondialdehid</li> </ul>  |
| Zečevi (mužjaci)  | Hranidba na bazi <i>Glicine max</i> (soje) i lanenog sjemena <i>Linum usitatissimum</i>      | <p>Obje hranidbe:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Poboljšana pokretljivost i održivost sperme</li> <li>- Povećan trijodtironin</li> <li>- Smanjen libido, koncentracija sperme i testosteron</li> <li>- Nema utjecaja na plodnost mužjaka</li> <li>- Poboljšani ukupni antioksidativni kapacitet i smanjeni malondialdehid</li> </ul> |
| Klonirani jarčevi | 0, 8, 83, 17, 66% sjemena <i>Punice granatum</i> (običnog morganja) tijekom 9 tjedana        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Povećana pokretljivost i vitalnost sperme, integritet staničnih membrana smrznutog i odmrznutog sjemena</li> <li>- Nema utjecaja na stopu cijepanja i razvoj blastociste nakon IVF-a</li> </ul>   |
| Zečevi (mužjaci)  | 0, 5, 10 g / kg sjemenki <i>Arctium</i> (čička) i lišća <i>Salvia Rosmarinus</i> (ružmarina) | <p>Na sjemenke čička 10 i listove ružmarina u hranidbi od 5 g / kg:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Povećana koncentracija sperme, vitalnost i pokretljivost</li> <li>- Poboljšani testosteron i plodnost</li> </ul>  |

|  |  |  |
|--|--|--|
| Toplinom stresirani zečevi (mužjaci)       | 0, 50, 100, 150 mg / kg tjelesne težine ekstrakta lišća <i>Moringa oleifera</i> (konjska rotkvica) | Sve razine:<br>- Poboljšane osobine kvalitete sperme<br>- Visoka razina (150 mg / kg tjelesne težine) nastojala je smanjiti testosteron i ukupni antioksidativni kapacitet |
| Muška janjad držana u ograničenim uvjetima | 0, 5, 10% vina od komete <i>Punice granatum</i> (običnog morganja) tijekom 74 dana                 | - Povećana težina testisa, koncentracija sperme, pokretljivost i integritet akrosoma i antioksidativni status testisa kod uzgajanih životinja                              |

S druge strane, čini se da je hranidba taninima sigurnija, pa čak i pozitivna za reproduktivne funkcije (*Quercus hartwissiana* (hrast strandža), *Sesbania sesban* (sesbania), *Acacia saligna* (zlatni vijenac), sjeme *Punice granatum* (obični morganj)). Suprotno tome, taninska skupina ima daljnja biološka svojstva za razliku od ostalih polifenolnih spojeva. Tanini se, u suvišku, vežu na dijetalne proteine i smanjuju adsorpciju proteina kroz enterocite, što može dovesti do reproduktivnog otpada, kao što je smanjenje brzine ovulacije i povećanje embrionalnog gubitka. Međutim, umjerena konzumacija može poboljšati metabolizam proteina povećanjem apsorpcije aminokiselina i smanjenjem oslobađanja ureje. Takvo poboljšanje hranidbenog statusa životinja pozitivno utječe na njihovu reproduktivnu sposobnost, kao što je dokazano u ispitivanju (Ramirez - Restrepo i sur., 2005.) uspoređujući ovce koje su pasle *L. corniculatus* (taninjasta paša; svinđuša), imale su veće stope ovulacije i janjenja od onih koje pasu višegodišnji ljulj / bijelu djetelinu na pašnjaku (fitoestrogena paša). Ti podaci potkrepljuju korisnost i relativnu sigurnost crnogoričnih biljaka (grmlja i drveća), ako se pravilno konzumiraju, za poboljšanje reproduktivnih sposobnosti životinja (*Yucca schidigera* (španjolski bodež), *Quebracho tanini*). S druge strane, potreban je oprez kada se reproduktivne životinje hrane biljkama bogatim fitoestrogenim polifenolima (flavonoidi, neflavonoidi i fenolne kiseline) kao što su soja, laneno sjeme, djetelina, sjeme mlijeka čička, lišće ružmarina, dodataka izoflavona soje i zelenog čaja u prahu. Čini se da je

bioraspoloživost tanina smanjena zbog njihove velike molekularne mase uz slabiju apsorpciju kroz crijeva, što može ograničiti njihove učinke (Nawab i sur., 2020.). Posebne napomene treba uputiti na upotrebu polifenolskih spojeva za poboljšanje reproduktivnih svojstava domaćih životinja izazvanih u stresnim uvjetima. Suplementacija prehranbenim propolisom (dodatak hrani bogat polifenolom) ili *Moringa oleifera* (konjska rotkvice) ostavlja etanolni ekstrakt, poboljšava redoks status, svojstva kvalitete sjemena i osobine kunića koji su pod stresom od vrućine, dok je u drugom istraživanju propolis ublažio reproduktivnu toksičnost cipermetrina kod ženki kunića. Dodatak vina *Punica granatum* (grožđe) također je pokazalo da poboljšava redoks status, težinu testisa i svojstva kvalitete sjemena muške janjadi koji se drže u ograničenim uvjetima (Zhao i sur., 2017.). Poboljšanje reproduktivnih karakteristika u ovim istraživanjima povezano je s antioksidativnim djelovanjem polifenolskih spojeva i njihovom sposobnošću da ublaže štetno djelovanje reaktivnih vrsta kisika. Ovi rezultati podržavaju zaštitnu ulogu polifenolnih spojeva u stresnim uvjetima, kada se aktiviraju štetni putovi kao što su oksidativni i upalni stres. Stoga bi se moglo zaključiti da polifenolni spojevi mogu dovesti do reproduktivnih dobitaka kod životinja koje su pod stresom. Međutim, nema dovoljno podataka o učincima različitih polifenola u reprodukciji i potrebno je više istraživanja kako bi se ove pretpostavke potvrdile ili odbacile, s naglaskom na polifenolskom profilu svake biljke.

Tablica 3. Sažetak nedavnih *in vivo* istraživanja o učincima polifenola na reproduktivne sposobnosti kod ženki domaćih životinja.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. *Antioxidants*. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

| Životinja    | Tretman   | Glavni rezultati   |
|--------------|---|--|
| Zečice       | 0, 5, 20 g / 100 kg<br><i>Camellie sinensis</i> (zelenog čaja) u prahu od odbića (starost 45 dana) i kroz dva uzastopna reproduktivna ciklusa | - Povećana duljina i promjer jajnika, ali ne i primarni i sekundarni folikuli u rastu<br>- Smanjena stopa koncepcije i broja živorođene i odbijene mladunčadi<br>- Povećana smrtnost ženki, ali ne i njihova tjelesna težina |
| Ženke bivola | 0, 100, 200 g / grlu / dan<br><i>Quebracho</i> tanina   | - Nema utjecaja na razinu progesterona, broja embrija po začeću i brzinu začeća  |

|   |  |   |
|---|--|---|
| Sezonski anestrozne<br>Rahman ovce  | <i>T. alexandrinum</i> i silaža<br>kukuruza 2 tjedna prije<br>janjenja do 8 tjedana nakon<br>induciranog estrusa                           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Smanjenje progesterona</li> <li>- Skraćeno trajanje estrusa</li> <li>- Potisnuti razvojni kapacitet malih i srednjih folikula</li> <li>- Nema utjecaja na brojeve i promjere žutog tijela</li> <li>- Smanjena plodnost i veličina legla</li> </ul>                           |
| Janjad (sa prepubertetskom<br>vunom/dlakom) tijekom<br>prirodne anestrozne sezone | 0, 300 mg ferulinske<br>kislone / dan / glavi<br>tijekom 34 dana   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Povećana masa reproduktivnog trakta, masa jajnika</li> <li>- Povećan broj većih folikula i žutog tijela te postotak janjadi s velikim folikulima i žutim tijelima</li> <li>- Nema utjecaja na broj malih folikula i postotak janjadi s malim folikulima</li> </ul>           |
| Barki ovce  | Kondenzirani <i>Quebracho</i><br>tanini (20 g / glavi / dan)<br>tijekom četiri tjedna prije<br>parenja do janjenja                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nema utjecaja na broj i veličinu folikula jajnika ili na broj i promjer žutog tijela, te na razinu progesterona i estradiola.</li> </ul>   |
| Barki ovce debelog repa   | 50, 100% zamjena sijena<br>djeteline biljkom koja je<br>bogata taninima ( <i>Acacia saligna</i> )  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nema promjena u stopi začeća</li> <li>- Poboljšana stopa plodnosti i janjenja</li> <li>- Nema razlika u koncentraciji progesterona</li> </ul>  |
| Kunić (ženka)   | Ekstrakt <i>Yucca schidigera</i><br>(španjolskog bodeža) - 0, 5,<br>20 g ekstrakta praha na 100<br>kg hrane tijekom 350 dana.              | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Povećana razina oksitocina i prostaglandina F2<math>\alpha</math> u plazmi;</li> <li>- Povećana koncentracija progesterona u plazmi kod niskih doza <i>Yucca schidigera</i>, ali smanjena visokim dozama <i>Yucca schidigera</i></li> <li>- Povećana stopa začeća</li> </ul> |
| Junice Holštajna (Holstein)   | <i>Trifolium alexandrinum</i> i<br>kukuruzna silaža tijekom<br>pet mjeseci, 3 (mjeseca)<br>prije parenja plus 2<br>(mjeseca) nakon parenja | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Smanjenje progesterona, povećanje estradiola, visok omjer estradiola i progesterona</li> <li>- Visok povratak u estrus</li> <li>- Povećani broj koncepcija</li> </ul>  |
| Kunić sa cipermetrinom  | 50 mg / kg tjelesne težine<br>propolisa  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Poboljšani redoks status</li> <li>- Ublaženi negativni učinci cipermetrina na histologiju jajnika, sintezu steroida</li> </ul>   |

|  |  |   |
|--|--|---|
|  |  | (progesteron i estradiol) i reproduktivne performanse   |
| Janje Finskog landrasa                   | Silaža <i>T. pratense</i> i silaža od trave za pet mjeseci, 3 mjeseca prije parenja plus dva nakon parenja | - Povećana ukupna masa maternice<br>- Smanjenje progesterona<br>- Nema promijenjene plodnosti<br>- Povećana razina uree     |
| Prepubertetska ženska janjad pasmine Tuj | <i>Quercus hartwissiana</i>  | - Ne utječe na sekreciju luteinizirajućeg hormona induciranog gonadotropinom koji oslobađa hormon kod prepubertetskih ženki |
| Menz ovce                                | 0.28% <i>Sesbania sesbana</i> prije parenja, tijekom parenja, gravidnosti i janjenja                       | - Nema utjecaja na razinu progesterona<br>- Poboljšana stopa koncepcije za 17%<br>- Poboljšana veličina legla               |

### 5.1. Seksualno ponašanje

Seksualno ponašanje je presudan reproduktivni događaj, jer se može smatrati početnim korakom za kasniji ciklus reproduktivnih događaja i nedostatak ili slabost estrusnih znakova u ponašanju ženke ili libido i seksualno ponašanje mužjaka koji dovode do održavanja životinja bez stvarnog reproduktivnog doprinosa stadu, što dovodi do reproduktivnog i ekonomskog otpada. Nekoliko je istraživanja potvrdilo sposobnost polifenola da utječu na seksualne aktivnosti kod različitih vrsta domaćih životinja. Konzumacija grma *Sesbania sesban* negativno utječe na izričaj estrusa kod ovaca i hranjenje izoflavonom *T. alexandrinum* (212.076,2 µg / ovca / dan bogata biochaninom A) također sprječava ili skraćuje estrus kod ovaca. Slično tome, utvrđeno je da hranidba na bazi lanenog sjemena (koja sadrži prvenstveno secoisolariciresinol i daidzein), soje (koja sadrži uglavnom genistein i daidzein) ili sojinim izoflavonima (koji sadrže omjer 1 genisteina: 5,7 daidzeina) smanjuje libido kunića (Hashem i sur., 2016.). Suprotno tome, Mustonen i sur. (2014.) izvijestili su da hranjenje ovaca silažom *T. pratense* (koja sadrži formononetin, biochanin A, genistein i daidzein) ukupno 5 mjeseci nije utjecalo na prosječan broj estrusa po gravidnosti ( $2,1 \pm 0,7$  za *T. pratense* L. naspram  $2,2 \pm 0,8$  silaže od trave u kontrolama). Ovi različiti rezultati učinka polifenola na seksualno ponašanje mogu se objasniti različitim mehanizmima, ali uglavnom antiestrogenim učincima koji mogu ometati endogeno djelovanje estrogena. U svakom slučaju, učinci polifenola ovise o koncentraciji endogenog

E2 jer se polifenoli i E2 natječu za mjesta vezanja na ER, a polifenoli mogu djelovati kao estrogenski antagonisti, inhibirajući punu aktivnost estrogena zauzimajući dio ER. Štoviše, mnogi polifenoli imaju veći afinitet za ER $\beta$  nego za ER $\alpha$ , za koji se sumnja da je uključen u antagonističko djelovanje E2 (Lorand i sur., 2010.). Također postoje istraživanja na mužjacima koja se bave time da vezanje polifenola s ER u mozgu uzrokuje promjene u reproduktivnom, stresom povezanom ponašanju, socijalnom ponašanju i kognitivnim funkcijama. Na primjer, spolno dimorfna jezgra preoptičkog područja (SDN - POA) uključena je u kontrolu oslobađanja gonadotropina, a seksualno ponašanje mužjaka i veličina SDN - POA povezana je s preferencijama seksualnih partnera (Roselli i sur., 2010.). S tim u vezi, konzumacija soje smanjuje količinu SDN - POA kod mužjaka, ali ne i kod ženki, što ugrožava seksualno i kopulatorno ponašanje.

## 5.2. Izlučivanje i funkcija hormona

Hormoni su kritični signali za reproduktivne sposobnosti i stoga odgovarajuća hormonalna sekrecija i funkcija igraju presudnu ulogu u reproduktivnoj sposobnosti. Nekoliko istraživanja otkrilo je sposobnost polifenola da mijenjaju biosintezu i funkciju reproduktivnih hormona duž osi hipotalamusa - hipofize - gonada. Na razini mozga polifenolni spojevi mogu spolno utjecati na dimorfnu jezgru hipotalamusa, kontrolirajući i seksualno ponašanje i hormon koji oslobađa gonadotropin (GnRH) (tj.: preoptičko područje (SDN - POA), paraventrikularna jezgra (PVN), lučna jezgra (ARC) i medijalno pre - optičko područje (mPOA)) i može poremetiti funkciju hipofize, a time i sintezu LH i FSH (Reed i sur., 2016.). Postoje podaci koji govore o tome da infuzija genisteina u mozak ovarijektomiziranih ovaca rezultira smanjenom učestalošću LH - pulsa i koncentracijom LH u plazmi, dok dugotrajna konzumacija soje (koja sadrži genistein i daidzein) inhibira LH - stimulirano lučenje progesterona. Ovi poremećaji u učestalosti i amplitudi LH - pulsa povezani su sa značajnim smanjenjem koncentracije perifernog progesterona tijekom lutealne faze i rane gravidnosti ovaca i junica. Suprotno tome, druga istraživanja Coolsa i suradnika (2014.) te Watzkove i suradnika (2011.) govore o tome da hranjenje sojinim izoflavonima (genistein i daidzein) nije povezano sa smanjenjem perifernih koncentracija P4. Moguće objašnjenje ovih nedosljednih rezultata može se naći nakon *in vitro* istraživanja učinaka izoflavona (biochanin A i genistein) na sintezu progesterona u stanicama granulose goveda; takvi su učinci dvofazni i ovisni o dozi; budući da sintezu P4 stimuliraju male doze, a obrnuto, doze iznad praga potiskuju sintezu P4. Na razini spolnih žlijezda, polifenoli mogu utjecati na sintezu steroida bilo granuloznim stanicama jajnika ili intersticijskim stanicama

testisa, zbog njihove sposobnosti da promijene osjetljivost tih stanica na djelovanje gonadotropina ili aktivnost enzima koji sudjeluju u biosintezi spolnih hormona. Na primjer, kora zgusnutih stabala bogatih taninom (npr.: *Acacia mangium* (šumska mangrova), *Sonneratia caseolaris* (mangrova jabuka), *Acacia mearnsii* (crna pletenica), *Salix rorida* (vrba), *Larix leptolepis* (japanski ariš), *Cryptomeria japonica* (japanska kriptomerija) i *Thujopsis dolabrata* (japanska hiba)) može inhibirati aktivnost steroida 5 $\alpha$  - reduktaze vezanjem za enzim (Liu i sur., 2008.). Izoflavoni, stilbeni i kumestani mogu inhibirati 5 $\alpha$  - reduktazu, aromatazu i kompleks 3 $\beta$  - hidroksisteroidne dehidrogenaze / izomeraze smanjenjem ekspresije gena i / ili inhibicijom samog enzima. U drugim istraživanjima, gopipol inhibira aktivnost enzima 5 $\alpha$  - reduktaze i 3 $\alpha$  - hidroksisteroidne dehidrogenaze, kao i antioksidativni enzim superoksid dismutaza, putem drugog messenger cGMP puta, što dovodi do inhibicije stvaranja steroida različitim molekularnim putovima (Basini i sur., 2009.). Slično tome, ekstrakt zelenog čaja može promijeniti funkcije jajnika i blokirati ovulaciju kod kunića. To se pripisuje njegovom glavnom sastojku EGCG s proapoptotskim i antisteroidnim hormonima. Na razini maternice utvrđeno je da izoflavoni i njihovi metaboliti, najzastupljeniji fitoestrogeni izvedeni iz soje, mijenjaju sekreciju PGF2 $\alpha$  i PGE2 u tkivu endometrija goveda, što dovodi do povećanog odnosa PGF2 $\alpha$  / PGE2, što, pak, može povećati mogućnost nastanka luteoliza, neuspjeh implantacije i, posljedično tome, rane smrtnosti ili pobačaja embrija. Međutim, povećani omjer PGF2 $\alpha$  / PGE2 može biti koristan za luteolizu i ovulaciju postpartalnih anestrozni mliječnih krava, olakšavajući obnavljanje postpartalne cikličnosti. U tom kontekstu, utvrđeno je i da polipepigalokatehin - 3 - galat stimulira aktivnost prostaglandin G / H sintaze - 2 (PGHS - 2; poznat i kao COX - 2), a time i sintezu PGF2 $\alpha$ , što bi moglo biti od interesa za cikličnost jajnika kada se održavaju više razine progesterona, što ometa normalnu reproduktivnu aktivnost (Colitti i sur., 2007.). U nekim su istraživanjima ove hormonalne neravnoteže bile povezane s očitim reproduktivnim poremećajima, kao što su kod ženki povećani rizici za nimfomaniju, prolaps rodnice i porođajne poteškoće, rani embrionalni gubici i smanjenje plodnosti i, kod mužjaka, nizak libido, erektilna disfunkcija i oligospermija (Reed i sur., 2016.).

### **5.3. Gametogeneza**

I kod mužjaka i kod ženki gametogeneza je složeni biološki proces koji obuhvaća niz staničnih dioba praćenih strukturnim (diferencijacija) i funkcionalnim konfiguracijama. Napredak ovih procesa strogo kontroliraju hormoni, uglavnom hormoni osi hipotalamus - hipofiza - gonada i mnogi stanični signalni čimbenici (Swelum i sur., 2020.). Stoga se snažno



očekuje implikacija polifenola na izmjenu učinkovitosti gonadogeneze. Kod odraslih životinja - kunića, hranjenje bilo na bazi soje (koja sadrži genistein i daidzein izoflavoni) ili hranom zasnovanom na lanenom sjemenu (koje sadrži lignan secoisolariciresinol) značajno je smanjilo sintezu testosterona, spermatogeni proces i libido. Čini se da su ti učinci jači za lignane iz lanenog sjemena od učinaka sojinih izoflavona. Evans i sur. (1995.) pronašli su taj enterolakton (metabolit secoisolariciresinol) koji ima najveću inhibicijsku snagu (98%) na aktivnost 17 $\beta$ -hidroksisteroidnih dehidrogenaza u usporedbi s genisteinom (82%) i daidzeinom (34%). Uz to, i izoflavoni i lignani mogu aktivirati ER putove, ovisno o njihovom relativnom afinitetu vezanja za ER i relativnoj transkripcijskoj snazi. S obzirom na ove nalaze, moglo bi se predložiti da lignani, uglavnom secoisolariciresinol, mogu imati veći afinitet vezanja ili transkripcijsku snagu od izoflavona, uglavnom genisteina i daidzeina, kod odraslih muških kunića, što dovodi do jačih bioloških učinaka na spermatogenezu, steroidogenezu i libido. Uz to, Hadadi i sur. (2020.) izvijestili su da je konzumiranje *Medicago sativa* (lucerne) kod odraslih štakora tijekom 30 dana rezultiralo pozitivnim prolaznim učinkom na broj sjemenskih tubula, primarnih spermatocita, spermatozoida i Leydigovih stanica. Međutim, kada se eksperimentalno razdoblje produljilo za 60 dana, primijećeno je smanjenje broja zametnih stanica i Leydigovih stanica. Poznato je da polifenoli lucerne imaju fitoestrogeno djelovanje s estrogenim ili antiestrogenim, antioksidativnim i endokrinim učincima. Fitoestrogen može smanjiti proliferaciju preteča Leydigovih stanica, vjerojatno aktiviranjem fagocitoze makrofaga (Perez - Martinez i sur., 1997.). Cjeloživotna (od začeca do odrasle dobi) hranidba zasnovana na soji koja sadrži 150 ppm daidzeina i 190 ppm genisteina smanjila je broj haploidnih stanica u testisu i epididimalnim stanicama sperme, bez promjene razine testosterona u serumu ili sazrijevanja Sertolijevih stanica i funkcije CD - 1 miševa. U ovom istraživanju svi markeri koji pokrivaju različite faze rane i midspermatogeneze ostaju nepromijenjene. Međutim, spermatidni specifični marker GAPD (gliceraldehid - 3 - fosfat dehidrogenaza), koji kodira protein koji regulira glikolizu, a time i pokretljivost i plodnost sperme, nije reguliran u testisu. Uz to, smanjeni geni su regulirani receptorima androgena. Ovi podaci sugeriraju da su kasne faze procesa spermatogeneze, nakon faze okrugle spermatide, najosjetljivije faze prehrambenih polifenola, što bi se moglo pripisati interferenciji sojinih polifona s putem receptora androgena. U kontekstu toga, muški štakori kronično izloženi genisteinu imaju abnormalnosti u spermatogenezi, što rezultira promjenama u pokretljivosti sperme i smanjenju veličine legla popraćeno dokazima o gubitku embrija nakon implantacije kada su odrasli štakori bili podvrgnuti ispitivanju plodnosti (Eustache i sur., 2009.). Kod ženki je sve

više dokaza da polifenoli mogu utjecati na proces oogeneze na različitim razinama. Polifenoli mogu utjecati na prenatalni, postnatalni i folikularni razvoj odraslih, kontrolirajući folikularnu / oocitnu rezervu jajnika, razvoj oocita i kvalitetu. S druge strane, pozitivni učinci polifenola poput resveratrola na proces gametogeneze primijećeni su u stresnim uvjetima poput izloženosti toksinima iz okoline, velike tjelesne aktivnosti i visokog oksidacijskog stresa i kod mužjaka i kod ženki (Macias - Cruz i sur., 2018.).

#### **5.4. Gravidnost i programiranje fetusa**

Neadekvatne razvojne osobine potomstva sve se više opisuju u posljednjih nekoliko godina, zbog sve većeg pritiska na isplativu proizvodnju (skraćivanje neproduktivnih razdoblja i sve veći broj potomaka po leglu) ili zbog okolišnih izazova (hrana, temperatura, dostupnost vode, stres). Posljedica takvih poremećaja je sve veća učestalost potomstva pogođenog intrauterinim ograničenjem rasta i, nakon toga, male porođajne težine. Pojava male porođajne težine ugrožava održivost i zdravlje mladunčeta, ali štoviše, uzrokuje štetne cjeloživotne učinke zbog epigenetskih promjena. Polifenoli se sve više koriste u materinjoj prehrani za suzbijanje oksidativnog stresa, upale niskog stupnja i metaboličkih poremećaja koji se obično nalaze kod fetusa ugrožene gravidnosti. Korištenje polifenola tijekom gravidnosti temelji se na percepciji "prirodnih i neškodljivih" proizvoda, ali postoji vrlo malo znanja o njihovim učincima kod gravidnih životinja i o ravnoteži između blagotvornih učinaka na razvoj i metaboličke osobine fetusa i štetnih učinaka zbog njihovih ksenoestrogenih i epigenetskih svojstava. S tim u vezi, flavonoidi su vjerojatno najviše konzumirani polifenoli jer se nalaze u većini biljaka, voća i povrća, a među njima je i kvercetin vjerojatno najviše konzumirani flavonoid. Nakon kvercetina, unos izoflavona genisteina u svijetu postaje visok zbog sve veće potrošnje sojinih proizvoda kao alternativnog izvora proteina. Stoga je većina istraživanja o upotrebi flavonoida tijekom gravidnosti provedena pomoću kvercetina. Dodaci sa kvercetinom tijekom gravidnosti povezani su s poboljšanjima antioksidativnog / oksidativnog i metaboličkog statusa majke i naknadnim pozitivnim učincima na fetalni antioksidativni kapacitet i razvojne osobine. Ti se učinci zadržavaju tijekom postnatalnih stadija, poboljšavajući antioksidativne obrambene sustave i postnatalne metaboličke osobine potomstva te smanjujući oštećenje DNA izazvano oksidativnim stresom (Prater i sur. 2008.). Slični su učinci pronađeni kod hranidbe bogate genisteinom; posebno smanjen oksidativni stres i blagotvorni učinci na kardiovaskularni sustav, smanjujući učestalost hipertenzije. Resveratrol stilben ima usporedive pozitivne učinke na oksidativni stres i metabolizam kod odraslih, a postoje eksperimentalni dokazi koji

poboljšavaju embrionalni oksidativni stres i apoptozu povezane s dijabetičkom embriopatijom, sprječavanje kašnjenja u razvoju embrija od dijabetičkih brana i, nakon toga, gubitak glomerula i bubrežna nezrelost kod fetusa (Singh i sur., 2013.). Međutim, izloženost visokim dozama flavonoida povezana je s neuspjesima u gravidnosti i epigenetskim učincima na potomstvo zbog uloge ksenoestrogena, kao fitoestrogena. U stvari, najmoćniji fitoestrogeni su polifenoli (genistein, daidzein i kumestrol), a ovaj aspekt treba uzeti u obzir prilikom promicanja unosa proizvoda dobivenih iz soje. Izloženost fitoestrogenima tijekom prenatalnog razvoja i ranog postnatalnog života može imati izrazite učinke na reproduktivni sustav potomaka, narušavajući spolnu diferencijaciju i reproduktivnu funkciju u odrasloj dobi. Ti su učinci najopsežnije opisani za genistein, premda postoje i dokazi da ksenoestrogeni učinci visokih doza kvercetina mogu utjecati na implantaciju embrija, a time i na uspjeh u gravidnosti, a nakon toga mogu ubrzati postnatalni reproduktivni razvoj ženskog potomstva. Izloženost visokim dozama genisteina povezana je s epigenetskim promjenama u genima koji moduliraju metabolizam i masnoću, reproduktivnu funkciju i pojavu različitih tumora (Doerge i sur., 2011.). Polifenoli, a posebno kvercetin, također su snažni modulatori upale niskog stupnja inhibiranjem ekspresije ciklooksigenaze i djelujući na pretvorbu masnih kiselina u prostanoide (prostaglandini, prostaciklini i tromboksani, s prostaciklinom I<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> i tromboksanom A<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>, glavni proizvodi). Ravnoteža PGI<sub>2</sub> / TXA<sub>2</sub> presudna je za adekvatnu regulaciju krvožilne funkcije majke i fetusa tijekom gravidnosti. Kvercetin povećava omjer i može poboljšati feto - placentnu cirkulaciju i neke negativne ishode preeklampsije, poput stope smrtnosti mladunčadi, ali bez značajnih poboljšanja pri porođajnoj težini mladunčadi. Međutim, povećani omjer tijekom kasne gravidnosti može potaknuti promjene u fetalnom krvožilnom sustavu; konkretno, suženje *ductus arteriosus* koje tjera fetalni protok krvi iz desne klijetke u silaznu aortu. Suženje arterioznog duktusa može uzrokovati zatajenje srca fetusa i mladunčeta, hidrops i plućnu hipertenziju mladunčadi, što dovodi do smrti. Istodobno, prenatalna izloženost visokim dozama kvercetina povezana je s povećanom ekspresijom upala povezanih citokina u odrasloj dobi. Kvercetin, ali također i genistein i drugi polifenoli, inhibiraju transport kroz placentu nekoliko bioaktivnih spojeva (organski kationi, glukoza i vitamini B i C (Biondi i sur. 2007.)).

## 6. POLIFENOLI I *IN VITRO* TEHNIKE POTPOMOŽNUTE REPRODUKCIJE

Sažetak nedavnih *in vitro* istraživanja o učincima polifenola na rezultate nekih ART - a kod mužjaka i ženki domaćih životinja prikazan je u tablicama 4 i 5.

Tablica 4. Sažetak nedavnih *in vitro* istraživanja o učincima polifenola na rezultate nekih potpomognutih reproduktivnih tehnika (ART) kod mužjaka domaćih životinja.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

| Tehnike potpomognute reprodukcije - ART                              | Izvor / doza                                      | Glavni rezultati  |
|--|---|---|
| Smrznuto – odmrznuti proizlivač sjemena bivola                       | 0, 10, 20, 50, 100 $\mu$ M / ml RES (resveratrol) | Pri 50, 100 $\mu$ M / ml:<br>- Povećana pokretljivost sperme, antioksidativni status (viši SOD, GPx, CAT)<br>Pri 100 $\mu$ M / ml:<br>- Smanjena fragmentacija DNA<br>- Povećani integritet plazme sperme i potencijal mitohondrijske membrane<br>te stopa gravidnosti nakon AI |
| Skladišteni tekući (hlađenje na 5 °C, 168h ) proizlivač sjemena ovna | 0, 200, 400 $\mu$ M / ml RES                      | Pri 400 $\mu$ M / ml:<br>- Povećana progresivna pokretljivost, antioksidativni status (viši SOD i GSH, niži MDA)<br>- Zaštićena morfologija glave sperme, poboljšana kinematika, parametri i <i>in</i>  |

|  |  |  |
|--|--|--|
|  |  | <i>vitro</i> plodnost (stope cijepanja i blastociste)  |
| Smrznuto - odmrznuti<br>produživač sjemena ovna  | 0, 10, 30, 50, 70 µg / ml<br>HT, DHPG i smjese (MIX)   | Na svim razinama HT-a i DHPG-a:<br>- Smanjen LPO<br>- Nema promjene u integritetu plazme sperme, statusu akrosoma, potencijalu mitohondrijske membrane, smanjena membrana sperme i integritet akrosoma |
| Skladišteno tekuće (4 ° C, 120 h) sjeme jarca    | 0, 10, 30, 50 i 70 mg / L<br>GSPE  | Pri 30 mg / L:<br>- Povećana pokretljivost spermija<br>- Poboljšani antioksidativni status sjemena (veći TAC, CAT, SOD i niži MDA)<br>- Poboljšani ishodi AI (veličina legla)                          |
| Smrznuto - odmrznuti<br>produživač sjemena jarca | 0, 10, 50, 100, 250 µM / ml<br>RES   | Pri 10 ili 50 µM / ml:<br>- Povećana progresivna pokretljivost, integritet membrane i akrosoma, aktivnost mitohondrija i održivosti sperme<br>- Smanjenje ROS-a  |
| IVF sjemenom nerasta                             | 0, 1, 10, 100 µg / mL tanina hrasta lužnjaka ( <i>Quercus robur</i> ) i njegove četiri frakcije (FA, FB, FC, FD) | Pri 10 µg / ml:<br>- Povećani kapacitet i oplodnja spermom<br>Pri 100 µg / ml:<br>- Potisnuta kapacitacija i stopa oplodnje  |

|  |   |  |
|--|---|--|
|  |   | - Najveća jačina bila je za FB frakciju  |
| Smrznuto - odmrznuti proizuživač sjemena bivola            | 0, 0.5, 1, 10 i 50 $\mu\text{M}$ / ml<br>RES                              | Pri 50 $\mu\text{M}$ / ml:<br>- Smanjene promjene poput kapacitivnosti, oksidativnog stresa (veći TAC, niži ROS i MDA)<br>- Poboljšanje stabilnosti membrane i IVF sposobnosti<br>- Nema utjecaja na stopu gravidnosti |
| Sjemeni proizuživač vepra nakon odmrzavanja tijekom 1 sata | 0, 0.5, 1, 2 mM / ml RES ili<br>0, 25, 50, 100 $\mu\text{M}$ / ml<br>EGCG | - RES ili EGCG nisu utjecali na održivost sperme i integritet akrosoma<br>- EGCG 25 i 50 $\mu\text{M}$ i RES 2 mM povećana je stopa oplodnje   |
| IVF pomoću kriokonzerviranih goveđih spermatozoida         | 0, 0.074, 0.74, 7.4 $\mu\text{mol}$ / L<br>GEN                            | - Nema utjecaja na pokretljivost sperme<br>- Pri 7,4 $\mu\text{mol}$ / L: inhibicija vezanja sperme - zona pellucida i smanjena akrosomska reakcija  |

Kratice: *In vitro* oplodnja (IVF), resveratrol (RES), hidroksitirozol (3,4 dihidroksifeniletanol, HT), 3,4 dihidroksifenilglikol (DHPG), ekstrakt procijanidina sjemenki grožđa (GSPE), epigalokatehin - 3 - galat (EGCG), genistein (GGCEN), superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPx), glutation reduktaza (GSH), malondialdehid (MDA) ukupni antioksidativni kapacitet (TAC), katalaza (CAT), reaktivne vrste kisika (ROS), umjetna oplodnja (AI).

Jasno je da reputacija polifenola kao snažnih kandidata za antioksidanse proizvedenih za *in vitro* manipulaciju spolnim kulturama, sazrijevanjem i očuvanjem spolnih stanica potiče njihovo uključivanje u medije. Rezultati istraživanja prikazanih u Tablicama 4 i 5 podupiru da polifenoli djeluju kao antioksidativni agensi, pa su se stoga većina proučavanih varijabli

i interpretacija rezultata temeljile na toj pretpostavci. Potvrđena je antioksidativna aktivnost mnogih polifenola, uključujući ekstrakt procijanidina sjemenki grožđa, silibinin mlijeka čička, hidroksitirozol i 3,4 dihidroksifenilglikol, epigalokatehin - 3 - galat, genistein i resveratrol. Veliki broj dokaza podupirao je potencijal polifenola da poboljšaju dobitke / ishode nekih ART - a. Izvješteno je o značajnim poboljšanjima u očuvanim svojstvima sjemena (skladištenog tekućeg ili zamrznutog) i oplodnje, razvoj i sposobnost oocita i razvoj embrija (Spinaci i sur., 2019.). Drugi dokaz koji se može uočiti iz *in vitro* istraživanja jest da bi dodavanje polifenolskih spojeva tijekom manipulacije gametama ili embrijom *in vitro* moglo nastaviti na *in vivo* životinjama. To dodaje dodatnu vrijednost za uključivanje ovih spojeva u medije pod manipulacijom gameta / sperme. Ahmed i sur. (2020.) otkrili su da je dodavanje resveratrola (100 µg / ml) smrznutom i odmrznutom sjemenu bivola značajno povećalo stopu gravidnosti nakon umjetne oplodnje. Slično tome, Wen i sur. (2019.) otkrili su da je dodavanje ekstrakta procijanidina sjemenki grožđa (30 µg / ml) u tekuće kozje sjeme značajno povećalo količinu legla nakon umjetne oplodnje. Kao što se raspravljalo u različitim istraživanjima, ta su poboljšanja uglavnom bila posljedica zaštitne uloge polifenola na integritet stanične membrane, potencijal mitohondrijske membrane i fragmentaciju DNA protiv podizanja reaktivnih vrsta kisika. Uvriježeno je mišljenje da polifenoli mogu učinkovito modulirati redoks - status bioloških sustava putem različitih mehanizama. Polifenolski spojevi imaju sposobnost izravnog uklanjanja reaktivnih vrsta kisika poput superoksidnih anionskih radikala i hidroksilnih radikala, prekidajući tako lančanu reakciju slobodnih radikala. Također imaju sposobnost pojačavanja ekspresije i aktivnosti antioksidativnih enzima kroz različite putove, poput signalnog puta nuklearnog faktora eritroida 2 (Nrf2) (Arando i sur., 2019.). Međutim, vrijedno je napomenuti da polifenoli mogu igrati obrnutu ulogu i preusmjeriti redoks reakcije prema stvaranju reaktivnih vrsta kisika. Ovaj učinak uglavnom ovisi o razini polifenola; visoke razine polifenola mogu masovno uklanjati reaktivne vrste kisika ili djelovati kao prooksidanti smanjenjem metalnih iona, što dovodi do stvaranja slobodnih radikala. Međutim, reaktivne vrste kisika poznate su kao štetne molekule, njihove umjerene razine ključne su za izvršavanje mnogih bioloških funkcija u stanicama, uključujući spolne stanice i embrije. Te činjenice objašnjavaju negativne učinke uočene u nekim istraživanjima zbog dodavanja visoke razine polifenola. Na primjer, goveđi oociti uzgajani u zreлом mediju nadopunjeni s derivatima zelenog čaja od 15 µM / ml (99% katehina), uglavnom EGCG, imaju veće koncentracije unutarstaničnog glutationa (GSH), stope sazrijevanja, cijepanja i blastociste od onih dopunjenih s 20 µM / ml (Wang i sur., 2012.). U skladu s tim opažanjima, navedeno

je da je dodavanje niže koncentracije EGCG (10 µg / ml) tijekom oplodnje *in vitro* značajno povećalo njezinu brzinu, dok je veća koncentracija EGCG (25 µg / ml) smanjila brzinu oplodnje. Ista su zapažanja zabilježena i za ART primijenjene na sjeme / spermu, jer su visoke razine polifenola imale štetne učinke na integritet membrane sperme i potencijal mitohondrijske membrane, kapacitivnost sperme, pokretljivost sperme i vezanje pellucida u zoni sperme, a time i na ishode oplodnje *in vitro*. Sveukupno, djelovanje polifenola povezano je s njihovom kemijskom strukturom, razinom, osjetljivošću stanica i poluvremenom reaktivnih vrsta kisika, što bi moglo objasniti različite rezultate dobivene nakon korištenja polifenolskih spojeva kao antioksidativnih sredstava (Arando i sur., 2019.).

Tablica 5. Sažetak nedavnih *in vitro* istraživanja o učincima polifenola na rezultate nekih potpomognutih reproduktivnih tehnika (ART) kod ženki domaćih životinja.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

| Tehnike potpomognute reprodukcije - ART | Izvor / doza   | Glavni rezultati  |
|---|--|---|
| IVM oocita ovaca                        | Ekstrakti metanolnih biljaka: 0, 50, 100 mg / ml<br><i>Bituminaria bituminosa</i> (djeteljnjak), <i>Medicago sativa</i> (lucerna), <i>Cichorium intybus</i> (cikorija), <i>Trifolium subterraneum</i> (podzemna djetelina), <i>T. pratense</i> (crvena djetelina), <i>Biserrula pelecinus</i> (dalmatica) i <i>Eremophila glabra</i> (katranski grm) | Sa 100 mg / L: <i>B. pelecinus</i> poboljšao je oplodnju i razvoj embrija.<br>- <i>C. intybus</i> (50 i 100 mg / ml) povećao je TCN, ali <i>M. sativa</i> (50 i 100 mg / ml) smanjio je TCN.<br>- Ostali biljni ekstrakti nisu utjecali na cijepanje ili razvoj embrija |
| IVC fragmenata jajnika kunića           | 0, 1, 10 ili 100 mg / ml EGCG, GTPP i RSV  | - EGCG je povećao nakupljanje kaspaze 3, dok su se i GTPP i RSV smanjili  |



|  |   |  |
|--|---|--|
|  |   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- EGCG inhibira izlaz P4 i T (10 ili 100 <math>\mu\text{g} / \text{ml}</math>)</li> <li>- GTPP je stimulirao P4 (10 ili 100 <math>\mu\text{g} / \text{ml}</math>) i inhibirao T (sve doze) RSV je promovirao oslobađanje i P4 (1 <math>\mu\text{g} / \text{ml}</math>) i T (1 ili 10 <math>\mu\text{g} / \text{ml}</math>).</li> </ul>  |
| <p>IVM goveđih oocita: suplementirani (IVM A) ili nedopunjeni (IVM B) cisteinom i b - merkaptoetanolom</p> | <p>0, 1, 5, 10, 20 <math>\mu\text{g} / \text{mL}</math> enološki <i>Quincus robur</i> (hrast lužnjak) - izveden tanin</p> | <p>Na svim testiranim razinama:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nema utjecaja na sazrijevanje nuklearnih oocita. Bilo u IVM-u A ili IVM - u B</li> <li>- Nema utjecaja na izlučivanje E2 i P4 od strane kumulusnih stanica</li> <li>- Poboljšan antioksidativni status u IVM B</li> </ul> <p>Pri 20 <math>\mu\text{g} / \text{ml}</math>:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Smanjeno sazrijevanje citoplazme oocita</li> </ul> |
| <p>IVM prepubertetnih oocita koza; visoke [16] (+) ili niske (-) kakvoće</p>                               | <p>0,1 <math>\mu\text{M} / \text{ml}</math> RSV</p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Oociti (+, -) uzgajani u IVM medijima koji sadrže REV imali su povećanu proizvodnju blastociste i razinu GSH nakon IVF-a</li> <li>- Nema utjecaja na aktivnost mitohondrija, ROS i ATP u rezultirajućim blastocistima</li> </ul>  |

|  |   |   |
|--|---|---|
| <p>Iskustvo 1: IVC ovčjih embrija</p>              | <p>0, 0.1, 0.25, 0.5, 2.0, 5.0 <math>\mu\text{M}</math> / ml RSV</p>                                | <p>Iskustvo 1:<br/> Pri 0.25 i 0.5 <math>\mu\text{M}</math> / mL:<br/> - Povećane stope morule i blastociste<br/> Pri 0.5 <math>\mu\text{M}</math>:<br/> - Povećani broj trofektoderma i unutarnje stanične mase te ukupan broj stanica blastocista</p>   |
| <p>Iskustvo 2: IVM oocita i IVC ovčjih embrija</p> | <p>0, 0.1, 0.25, 0.5, 2.0, 5.0 <math>\mu\text{M}</math> / ml RSV</p>                                | <p>Iskustvo 2:<br/> Pri 0.5 <math>\mu\text{M}</math> / ml:<br/> - Povećana stopa morule i blastociste<br/> Pri 5.0 <math>\mu\text{M}</math> / ml:<br/> - Smanjena stopa morule i blastociste</p>  |
| <p>IVM oocita i IVF ovaca</p>                      | <p>0, 5, 10, 25 <math>\mu\text{g}</math> / ml GEN, BIO A, FOR</p>                                   | <p>Pri 25 <math>\mu\text{g}</math> / ml:<br/> - GEN je smanjio stopu cijepanja, brzinu blastociste i učinkovitost blastociste<br/> - BIO smanjena brzina cijepanja, učinkovitost blastociste i ukupan broj izlučenih stadija blastociste<br/> - FOR smanjeni broj blastomera izvaljenih stadija blastociste</p> |
| <p>IVM goveđih oocita</p>                          | <p>0, 10, 15, 20 <math>\mu\text{M}</math> / ml katehina zelenog čaja (<i>Camellia sinensis</i>)</p> | <p>Pri 15 <math>\mu\text{M}</math> / ml:<br/> - povećana brzina cijepanja i blastocista te unutarstanične koncentracije GSH oocita</p>  |

|   |                                  |  |
|---|----------------------------------|--|
| IVM i IVF oocita svinja                             | 0, 2,5, 5, 10,25 µg / ml<br>EGCG | Pri ≤10 mg / ml:<br>- Nema utjecaja na sazrijevanje jajnih stanica, razgradnju oocita, oplodnju i monospermiju<br>Pri ≥10 mg / ml:<br>- Inhibirana spontana akrosomska reakcija<br>Pri 25 mg / ml:<br>- Smanjeni partenoti razvili su se u blastocistu<br>- Smanjena sinteza P4, ali nema utjecaja na E2<br>- Smanjen postotak oplodjenih oocita |
| IVC stanica svinjske granulose (iz folikula > 5 mm) | 0, 5, 50 µg / ml EGCG            | - Obje razine: inhibirana proliferacija, steroidogeneza, proizvodnja VEGF  |

Kratice: *in vitro* sazrijevanje (IVM), *in vitro* kultura (IVC), polifenoli zelenog čaja (GTPP), umjetna oplodnja (IVF), epigalokatehin - 3 - galat (EGCG), genistein (GEN), resveratrol (RSV), biochanin A (BIO A), formononetin (FOR), progesteron (P4), testosteron (T), glutation - reduktaza (GSH).

Unatoč poboljšanju rezultata primjenom ART - a zbog antioksidativnih učinaka polifenolskih spojeva, druga istraživanja izvijestila su o sposobnosti nekih polifenolskih spojeva (epigalokatehin - 3 - galat, genistein, biochanin A, formononetin) da inhibiraju proliferaciju stanica granulose, brzinu cijepanja embrija, steroidogenezu, sintezu vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) i nakupljanje čimbenika povezanih s apoptozom, poput kaspaze 3 (Balazi i sur., 2019.). Te se opasnosti odnose na potencijal polifenolskih spojeva da utječu na ekspresiju gena u vrlo ranim fazama razvoja spolnih stanica / zametaka, što može utjecati na završetak reproduktivnih događaja kao što su gravidnost i reproduktivne sposobnosti potomstva u budućnosti. Dakle, *in vitro* istraživanja usmjerena na ispitivanje učinaka polifenola na ishode ART - a trebale bi u značajnoj mjeri

uzeti u obzir širok spektar bioloških aktivnosti polifenolskih spojeva, a ne antioksidativno djelovanje. Ovo je važno kako bi se izradio integrirani pregled učinaka ovih spojeva na reprodukciju domaćih životinja i kako bi se osigurala njihova sigurnost u svim reproduktivnim događajima i performansama životinja, prije nego što se preporuča kao prirodni i sigurni kemijski spojevi. Vrijedno je napomenuti da *in vitro* istraživanja koja su ispitivala učinke polifenolskih spojeva na reprodukciju nisu provedena samo kao pokušaj poboljšanja rezultata pomognutih reproduktivnih tehnika, već i kao alat za procjenu relevantnosti novih biljnih vrsta na reproduktivne događaje (Amir i sur., 2019.). Bez obzira na pozitivne ili negativne rezultate takvih istraživanja, valja napomenuti da priroda tih istraživanja ne uzima u obzir složenost metaboličkih procesa i bioraspoloživost polifenola i njihovih metabolita na fiziološki i hormonalni status životinja te varijacije u biljnom sastavu. Ovi čimbenici često mogu uzrokovati promjene u učincima prehranbenih polifenola *in vivo*, što dovodi do nepravilne procjene sigurnosti testiranih biljnih vrsta. Sveukupno, prije primjene rezultata *in vitro* pokusa, trebalo bi dobiti više detalja o reproduktivnim svojstvima životinja koje su primile spolne stanice / embrije prethodno tretirane polifenolnim spojevima kako bi se osigurao nedostatak negativnih učinaka na reproduktivne sposobnosti odraslih životinja. Uz to, treba pratiti vitalnost i buduće reproduktivne rezultate rezultirajućeg potomstva kako bi se osiguralo da nema dugoročnih negativnih učinaka koji mogu utjecati na reproduktivne performanse stada.

## **7. POLIFENOLI ŽIVOTINJSKOG PODRIJETLA I LJUDSKO ZDRAVLJE**

U ljudskoj prehrani glavni izvor polifenola su biljke (voće, povrće, sjeme i žitarice), ali i životinjski proizvodi (mlijeko i meso) mogu biti potencijalni izvori polifenola. Stoga je važno znati moguće učinke polifenola životinjskog podrijetla na ljudsko zdravlje i reprodukciju. Polifenoli u životinjskim proizvodima potječu od hrane s pašnjaka bogatih polifenolima (bijela djetelina, crvena djetelina, lucerna i pašnjaci bogati cikorijom). Uz to, metaboliti polifenola sisavaca kao što su enterolignani i ekvol identificirani su u životinjskim proizvodima zbog djelovanja crijevne mikroflore (Blahova i sur., 2016.).

Utvrđeno je da mlijeko krava i koza sadrže različite polifenolne spojeve, uključujući lignane, kumestane i izoflavone (genistein, daidzein, formononetin i biochanin A), kao i izoflavonski ekvol (metabolit formononetina). U goveđem mlijeku utvrđena koncentracija polifenola iznosi 132,4 mg / L. S obzirom na klasu polifenola koncentracija izoflavona (genistein, daidzein, biochanin A i formononetin) kreće se u rasponu od 0,1 do 7,7 mg / L, engnalakton lignana između 19 i 96 mg / L, a koncentracija ekvola između 45 i 364 mg / L.

Ovi podaci pokazuju prevalenciju polifenolskog endola u mlijeku. Pretpostavlja se da je sadržaj polifenola u životinjskim proizvodima niži od onog u biljkama (npr. soja i njezini proizvodi); međutim, polifenoli životinjskog podrijetla imaju posebnu važnost zbog prisutnosti znatnih koncentracija polifenola sisavaca, koje se ne mogu dobiti izravno konzumacijom biljaka, jer njihova sinteza ovisi o djelovanju mikroflore ljudi i / ili životinjskih crijeva. Pretpostavlja se da samo 20 - 35% odrasle ljudske populacije može proizvoditi ekvol (Setchell i sur., 2005.), dok su životinjske populacije obično proizvodile ekvol nakon unosa izoflavona.

Bilo je različitih istraživanja o potencijalnim koristima polifenola sisavaca za ljudsko zdravlje, posebno ekvola, s naglaskom na istaknutu ulogu u smanjenju rizika od kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, neurodegenerativnih bolesti, razvoja tumora, osteoporoze i simptoma povezanih s menopauzom. S druge strane, ti spojevi također predstavljaju rizik za ljudsko zdravlje zbog svoje sposobnosti da utječu i na antioksidativni status i na endokrini sustav. Polifenoli sisavaca imaju veću estrogenu snagu od svojih izvornih prekursora. Prema dosadašnjim saznanjima, malo je istraživanja o učincima konzumacije polifenola životinjskog podrijetla na reproduktivno zdravlje ljudi. Većina istraživanja u tom području usredotočila se na učinke biljnih polifenola, uglavnom

izoflavona soje, na razvoj ljudi tijekom prenatalne, mlade i odrasle dobi. Glavni zaključak ovih istraživanja je da je konzumacija izoflavona povezana s mnogim reproduktivnim poremećajima, poput obilnih menstruacija, spolnog dimorfnog ponašanja poput maskulinizacije i malformacije reproduktivnog trakta (Brouwers i sur., 2010.).

## **8. POLIFENOLI KAO ANTIOKSIDATIVNA SREDSTVA POBOLJŠAVAJU KVALITETU PIJETLOVA SJEMENA TIJEKOM HLADNOG SKLADIŠTENJA?**

Krajnji cilj uzgajivača peradi je proizvodnja rasplodnih jaja, jer imaju veliku ekonomsku važnost u određivanju profitabilnosti proizvodnje. Pravilan odabir i održavanje rasplodnih pijetlova od ključne je važnosti, budući da se njihovoj sjemenskoj kvaliteti pridaje velik značaj. Svako oštećenje njihove reproduktivne učinkovitosti nepovoljno će utjecati na gospodarske prinose. Sama sperma ptica ima jedinstvenu strukturu i sastav za razliku od ostalih vrsta sisavaca. Lipidni dio spermatozoidne membrane je obogaćen polinezasićenim masnim kiselinama, naglašavaju funkciju propusnosti, fluidnosti i fleksibilnosti membrane za kretanje i stapanja sperme s jajnom stanicom (Surai i sur., 2001.). Suprotno tome, ovo inicira rizik od peroksidacije lipida popraćene slobodnim radikalima što rezultira morfološkim deformacijama, lošom pokretljivošću, razgradnjom membrane i slabijom sposobnošću spajanja oocita uzrokujući mužjakovu neplodnost (Wishart, 1984). Nadalje, zbog malog volumena citoplazmatskog sadržaja s antioksidantima, ptičji spermatozoidi brzo gube sposobnost oplodnje (Donoghue i Wishart, 2000). Surai (2002.) je uočio da u fiziološkim uvjetima prirodni antioksidanti (vitamin E, askorbinska kiselina, glutation), zajedno s enzimskim antioksidantima (superoksid dismutaza, glutation peroksidaza) u spermi i sjemenoj plazmi suzbijaju štetne učinke reaktivnih vrsta kisika (ROS). Međutim, kada generacija ROS premaši obrambene mehanizme, razvija se oksidativni stres zbog razlike između pro i antioksidansa. Neki od važnih ROS - a prisutnih u sjemenoj plazmi uključuju superoksidni anion, hidroksilni radikal i vodikov peroksid (Urso i Clarkson, 2003). Uz rastuću tehniku umjetne oplodnje (AI) u sektoru peradi, rutinski se prakticira kratkotrajno čuvanje razrijeđenog sjemena od nekoliko sati do nekoliko dana na temperaturi od oko 0 do 5 °C. Otkriveno je da je tijekom *in vitro* čuvanja sjemena došlo do značajnog smanjenja ukupnog sadržaja lipida i udjela fosfolipida, zajedno s padom kvalitete sperme i stope plodnosti (Blesbois i sur., 1999.). U nastojanju da se poboljšaju sjemene osobine i antioksidativna zaštita sjemene plazme, brojna istraživanja preporučuju ugradnju različitih antioksidansa poput vitamina E, organskog selena i L - karnitina. Međutim, pojavio se interes za primjenu fitogenih derivata kao antioksidativnog aditiva za povećanje kvalitete sjemena kod ljudi i životinja. Poznato je da bioaktivni principi poput polifenola imaju antioksidativna svojstva zahvaljujući svojoj ulozi u uklanjanju slobodnih radikala, kelaciji metala, stimuliranju antioksidativnih enzima, smanjenju alfa tokoferolnih radikala i

inhibiciji oksidaza. Znanstveno je dokazano da su polifenoli u komini grožđa, maslinovom ulju, kadulji, *S. Khuzistanici*, ružmarinu i zelenom čaju (Rahman i sur., 2018.) snažni antioksidansi s različitim odgovorima, a još uvijek se provode značajna istraživanja s mogućim izvorima. Dokazi također potvrđuju da kore od nara (*Punica granatum*) čine 60% ploda, sadrže nekoliko polifenolskih spojeva poput flavanoida, elagitanina i proantocijanidina, a pretpostavlja se i da ublažavaju oksidativni stres. Stoga je ovaj eksperiment imao za cilj procijeniti učinkovitost različitih koncentracija polifenola na sjemenskim svojstvima i antioksidativni status sjemena pijetlova u različitim razdobljima skladištenja.

Provedeno je *in vitro* istraživanje kako bi se procijenio učinak na kakvoću sperme i antioksidativni status u različitim razdobljima skladištenja dodavanjem polifenola u pijetlovu sjemenu plazmu. Nasumično je odabrano dvadeset zdravih White Leghorn pijetlova sa jednakom tjelesnom težinom. Polifenoli u korama nara ekstrahirani su upotrebom metanola kao otapala. Uzorci su podijeljeni podjednako u tri dijela radi uključivanja različitih koncentracija od 0, 50 i 100 ppm polifenola. Procjena katalaze, inhibicije peroksidacije lipida, smanjenog glutaciona i superoksid dismutaze rađena je u intervalima 0, 24 i 48 sati. Pokretljivost spermatozoida se povećavala u svim tretiranim skupinama (50, 100 ppm). Ostali fizički atributi poput koncentracije sperme, živih i mrtvih spermatozoida nisu se razlikovali u kontroli bez obzira na koncentracije i vremenska razdoblja čuvanja. Nije uočena nikakva promjena tijekom 0 i prva 24 sata, no inhibicija peroksidacije lipida utvrđena je na kraju 48 sati skladištenja u skupinama tretiranim polifenolom. Utvrđeno je da polifenoli ekstrahirani iz kore nara poboljšavaju pokretljivost spermatozoida i antioksidativne mehanizme sjemene plazme u smislu katalaze, inhibicije peroksidacije lipida, razine GSH - a (glutaciona) i SOD - a (superoksid dismutaze), što dokazuje njezinu sposobnost obrane sperme od oksidativnog stresa. Budući da parametri ovise o vremenu i dozi, bitna su istraživanja molekularnih mehanizama odgovornih za ovu antioksidativnu aktivnost polifenola, jer ove bioaktivne fitokemikalije imaju neizmjeran opseg u učinkovitom očuvanju spermatozoida (M. Gopi i sur., 2020.).



## 9. UČINAK POLIFENOLA NA KARAKTERISTIKE I ANTIOKSIDATIVNI STATUS KRMAČA I PRASADI

Genetski napredak pridonio je poboljšanju reproduktivnog potencijala krmača i profitabilnosti stočarske proizvodnje na komercijalnim farmama. Kao rezultat, porođajna težina legla i broj odbijenih prasadi po krmači posljednjih su se godina znatno povećali (Foxcroft 2012; Szymanska 2012). Unatoč gore navedenom, gravidnost, perinatalno razdoblje, odbiće i velika gustoća stoke na komercijalnim farmama gdje se svinje drže na rešetkastim podovima izvor su znatnog stresa za životinje. Ti čimbenici dovode do bržeg povećavanja koncentracije reaktivnih vrsta kisika (ROS) i induciraju oksidativni stres (Frankić i Salobir 2011). Rezultirajuća redoks neravnoteža može inducirati nepovratne strukturne i funkcionalne promjene u stanicama, uključujući oštećenje DNA, modifikaciju aminokiselina, fragmentaciju proteina, peroksidaciju lipida u staničnim membranama, apoptozu i nekrozu stanica (Lykkesfeldt i Svendsen 2007). Te promjene utječu na zdravstveno stanje i karakteristike životinja te na kvalitetu životinjskih proizvoda (Durand i sur. 2013.). Programi hranidbe životinja moraju se kontinuirano poboljšavati, s posebnim naglaskom na aditive za hranu. Dodatak vitamina E u hranidbu poboljšava zdravstveni status i reproduktivne sposobnosti krmača. Vitamin E je glavni antioksidans koji djeluje protiv peroksidacije lipida u stanicama. Alfa - tokoferol lokaliziran je u staničnim membranama i lipoproteinima plazme, a štiti fosfolipide i polinezasićene masne kiseline od oksidacije. Tokoferoli se dobivaju iz biljnih ulja, ali također su dostupni i sintetski oblici vitamina E (Bramley i sur. 2000.). Posljednjih godina proizvođači i potrošači hrane pokazuju sve veći interes za podrijetlom dodataka hrani, a posebna pažnja posvećuje se prirodnim spojevima. Polifenoli su snažni antioksidansi čija je učinkovitost usporediva s učinkovitošću vitamina E. Čine jednu od najvećih skupina bioaktivnih spojeva dobivenih iz biljaka. Prisutni su u voću, povrću, začinskom bilju, začinicima, crvenom vinu, crnom i zelenom čaju. Također pokazuju protuupalna, antivirusna i antikarcinogena svojstva. Rezultati brojnih *in vitro* i *in vivo* istraživanja otkrili su povoljan utjecaj ovih bioaktivnih spojeva u hranidbi životinja zbog njihovih antioksidativnih, baktericidnih i imunostimulacijskih aktivnosti (Alonso i sur. 2002.). Trenutno se istražuju mehanizmi bioloških učinaka polifenola. Testirana je hipoteza koja kaže da polifenoli zbog svojih antioksidativnih svojstava mogu djelomično nadomjestiti vitamin E u hranidbi krmača u perinatalnom razdoblju. Tijekom istraživanja htio se utvrditi učinak dodataka prehrani sintetičkim vitaminom E i biljnim polifenolima na karakteristike i antioksidativni status krmača i prasadi (Krzysztof Lipiński i sur. 2019.).

Daljnijim istraživanjem htjela se utvrditi učinkovitost polifenola kod svinja. Pokus je izveden na 52 krmače podijeljene u 4 skupine. Netretiranim kontrolnim krmačama (skupina 1) nije se davao vitamin E u premiksima. Hranidba pokusnih životinja nadopunjena je vitaminom E u količini od 50 mg (skupina 2) ili hranidba od 100 mg / kg (skupina 3) (hranidba za gravidnost) i 75 mg (skupina 2) ili hranidba od 150 mg / kg (skupina 3) (hranidba za laktaciju). Hranidba krmača ove četiri skupine dopunjena je vitaminom E (50/75 mg / kg, gravidnost / laktacija) i Provioxom (polifenoli) (50/75 mg / kg, gravidnost / laktacija). Analiziran je utjecaj različitih razina uključenosti vitamina E i vitamina E / polifenola u hrani na karakteristike, koncentracije vitamina E i antioksidativni status krmača i prasadi. Krmače u čiju su hranu bili dodani vitamin E i polifenoli (50:50) odlikovale su se sličnom plodnošću, uspjehom u parenju i karakteristikama legla kao i skupina čija je hrana dopunjena samo vitaminom E. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su krmače koje su dobivale vitamin E i polifenole karakterizirale sličan ili poboljšani antioksidativni status u usporedbi sa životinjama kojima je hrana dopunjena sa 100 mg / 150 mg vitamina E / kg. Može se zaključiti da zamjena 50% dijetalnog vitamina E s polifenolima nije ugrozila učinak rasta krmača ili prasadi i poboljšala njihov antioksidativni status (Zofia Antoszkiewicz i sur., 2019.).

## **10. ULOGA POLIFENOLA U LJUDSKOM ZDRAVLJU I PREHRAMBENIM SUSTAVIMA**

Polifenoli, organski spojevi koji se u obilju nalaze u biljkama, postali su novo područje interesa u prehrani posljednjih desetljeća. Sve više istraživanja ukazuje na to da konzumacija polifenola može igrati vitalnu ulogu u zdravlju kroz regulaciju metabolizma, težine, kroničnih bolesti i proliferacije stanica. Do sada je identificirano preko osam tisuća spojeva, iako njihovi kratkoročni i dugoročni učinci na zdravlje nisu u potpunosti istraženi (Lecour i sur., 2011.). Istraživanja na životinjama, ljudima i epidemiološka istraživanja pokazuju da različiti polifenoli imaju antioksidativna i protuupalna svojstva koja bi mogla imati preventivne i / ili terapijske učinke na kardiovaskularne bolesti, neurodegenerativne poremećaje, rak i pretilost. Međutim, mogu postojati i štetni učinci prekomjernom konzumacijom polifenola (Crowe i sur., 2013.). Ovim istraživanjem znanstvenici žele potvrditi trenutne rezultate koji se odnose na polifenole za opće zdravlje i nezarazne bolesti (NCD). Opisuju implikacije tih dokaza na javno zdravlje i raspravljaju o budućim smjernicama za istraživanja, praksu i politiku. Citirane publikacije potječu uglavnom iz životinjskih modela i pokusa hranjenja, kao i iz istraživanja ljudskih zajednica i interesantnih slučajeva. Također se razmatraju potencijalni štetni učinci nekih polifenola, o čemu istraživačka literatura nema dovoljno argumenata. Razgovara se o nedavnim međunarodnim vladinim propisima koji sankcioniraju tvrdnje o sigurnosti i zdravlju samo nekoliko specifičnih polifenolnih spojeva. Procjenjuju se i implikacije prerade hrane na bioraspoloživost polifenola, uz zdravstvene tvrdnje i marketing polifenola kao funkcionalne hrane. Potvrđuje se potreba za povećanom regulacijom i smjernicama za potrošnju polifenola kako bi se potrošačima omogućila sigurnost i pravovremeno informiranje.

Postoje značajni dokazi da specifični polifenoli koriste zdravstvenom stanju, posebno za prevenciju i liječenje nekih kroničnih bolesti. Treba istražiti potencijalne negativne ishode za neke podskupine, a potrebna su i dodatna istraživanja na ljudima kako bi se potvrdili biološki mehanizmi i implikacije polifenola na javno zdravlje. *In vitro* istraživanja na životinjama koristila su mnogo veće razine od onih koje se obično nalaze u ljudskoj prehrani, pa razina na kojoj se polifenoli mogu sigurno i korisno konzumirati ostaje nejasna. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se shvatilo mogu li se i kako iste koristi od polifenola konzumiranih u cjelovitoj hrani dobiti iz izoliranih oblika. Kako znanstvenici imaju više saznanja o polifenolima, tako se povećava i svijest potrošača o prednostima i potencijalnim rizicima pri konzumiranju hrane. Regulatorna tijela bi trebala biti upoznata sa znanstvenim

istraživanjima pa tako i dokazima kako bi pružila smjernice za konzumaciju i dodatak polifenola, uključujući regulaciju njihovih zdravstvenih i funkcionalnih zahtjeva, te uspostavljanje dijetalnih referentnih unosa (DRI) za uobičajene i / ili potencijalno štetne polifenole. Budući da se polifenoli najčešće nalaze u zdravoj hrani biljnog podrijetla, poput voća i povrća, preporuke za konzumaciju trebaju se povezati sa postojećim obrazovnim sustavom o prehrani i smjericama za promicanje zdrave prehrane. Iako je mnogo toga još nepoznato, mjere javnog zdravstva treba poduzeti što ranije kako bi potrošači uvijek bili na vrijeme informirani pa prema tome i sigurni. (Hannah Cory i sur., 2018.).

## 11. ZAKLJUČAK

Ovaj diplomski rad predstavlja trenutne informacije o povezanosti prehrambenih polifenola i reproduktivnih procesa kod domaćih životinja, s ciljem da se pomogne utvrditi jesu li polifenoli izvor reproduktivne dobiti ili otpada.

Prema istraživanjima obuhvaćenim ovim radom, fiziološki čimbenici koji moduliraju učinke polifenolnih spojeva te utječu na njihovu biološku aktivnost i korsit / rizik kod životinja su: raznolikost, izvor i dvostruki učinci. S druge strane, životinjska vrsta, dob, spol, fiziološki i zdravstveni status, vrijeme i duljina izloženosti, metabolizam polifenola i bioraspoloživost drugi su fiziološki čimbenici koji moduliraju njihove učinke. Ove čimbenike bi trebali imati na umu prilikom korištenja polifenola u hranidbi domaćih životinja. Polifenoli, kao „prirodni“ proizvodi, smatraju se korisnim i neškodljivim proizvodima. Međutim, analiza trenutno dostupnih informacija pokazuje veliku prazninu u našem znanju o sigurnosti ovih spojeva u reproduktivne svrhe. Sveukupno, prisutnost polifenola u hrani domaćih životinja tijekom njihovog reproduktivnog ciklusa i / ili u ART medijima može poboljšati njihove reproduktivne karakteristike kada se pravilno koriste; međutim, još uvijek postoje nepoznate reproduktivne opasnosti. Stoga je potrebno više istraživanja o profilu aktivnih polifenolskih spojeva u svakoj biljci i o biološkim učincima svakog polifenolskog spoja prije upotrebe novih biljnih vrsta, agroindustrijskih nusproizvoda i / ili hranidbe bogate polifenolima u uzgoju životinja.

## 12. POPIS LITERATURE

1. Abo-El-soud, M.A.; Hashem, N.M.; Nour El-Din, A.N.M.; Kamel, K.I.; Hassan, G.A. Soybean isoflavone affects in rabbits: Effects on metabolism, antioxidant capacity, hormonal balance and reproductive performance. *Anim. Reprod. Sci.* 2019, 203, 52–60, doi:10.1016/j.anireprosci.2019.02.007.
2. Adom, K.K.; Liu, R.H. Antioxidant activity of grains. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 6182-6187.
3. Ahmed, H.; Jahan, S.; Ullah, H.; Ullah, F.; Salman, M.M. The addition of resveratrol in tris citric acid extender ameliorates post-thaw quality parameters, antioxidant enzymes levels, and fertilizing capability of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Theriogenology* 2020, 152, 106–113, doi:10.1016/j.theriogenology.2020.04.034.
4. Alonso AM, Guill\_e DA, Barroso CG, Puertas B, Garc\_ia A. 2002. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *J Agric*
5. Amir, A.A.; Kelly, J.M.; Kleemann, D.O.; Durmic, Z.; Blache, D.; Martin, G.B. Extracts of forage plants affect the developmental competence of ovine oocytes in vitro. *Anim. Prod. Sci.* 2019, 59, 1814, doi:10.1071/an18170.
6. Arando, A.; Delgado, J.; Fernández-Prior, A.; León, J.; Bermúdez-Oria, A.; Nogales, S.; Pérez-Marín, C. Effect of different olive oil-derived antioxidants (hydroxytyrosol and 3, 4-dihydroxyphenylglycol) on the quality of frozen-thawed ram sperm. *Cryobiology* 2019, 86, 33–39.
7. Baheg, R.; El-Bahrawy, K.; El-Azrak, K.; Samak, M.; Sallam, S. Effect of condensed tannins and saponin supplementation on reproductive performance in Barki ewes. *Egypt. J. Nutr. Feed.* 2017, 20, 197–210.
8. Balazi, A.; Sirotkin, A.V.; Foldesiova, M.; Makovicky, P.; Chrastinova, L.; Makovicky, P.; Chrenek, P. Green tea can suppress rabbit ovarian functions in vitro and in vivo. *Theriogenology* 2019, 127, 72–79, doi:10.1016/j.theriogenology.2019.01.010.
9. Basini, G.; Bussolati, S.; Baioni, L.; Grasselli, F. Gossypol, a polyphenolic aldehyde from cotton plant, interferes with swine granulosa cell function. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2009, 37, 30–36, doi:10.1016/j.domaniend.2009.01.005.

10. Biondi, C.; Pavan, B.; Dalpiaz, A.; Medici, S.; Lunghi, L.; Vesce, F. Expression and characterization of vitamin C transporter in the human trophoblast cell line HTR-8/SVneo: Effect of steroids, flavonoids and NSAIDs. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* 2007, 13, 77–83, doi:10.1093/molehr/gal092.
11. Blahova, L.; Kohoutek, J.; Prochazkova, T.; Prudikova, M.; Blaha, L. Phytoestrogens in milk: Overestimations caused by contamination of the hydrolytic enzyme used during sample extraction. *J. Dairy Sci.* 2016, 99, 6973–6982, doi:10.3168/jds.2016-10926.
12. Blesbois, E., I. Grasseau and D. Hermier (1999). Changes in lipid content of fowl spermatozoa after liquid storage at 2 to 5 degrees C. *Theriogenology* 52: 325-334.
13. Bramley PM, Elmadfa I, Kafatos A, Kelly FJ, Manios Y, Roxborough HE, Schuch W, Sheehy PJA, Wagner K-H. 2000. Review vitamin E. *J Sci Food Agric.* 80:913–938.
14. Bratt, K.; Sunnerheim, K.; Bryngelsson, S.; Fagerlund, A.; Engman, L.; Andersson, R.E.; Dimberg, L.H. Avenanthramides in oats (*Avena sativa* L.) and structure-antioxidant activity relationships. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 594-600.
15. Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr. Rev.* 1998, 56, 317-333.
16. Brouwers, M.M.; Van Der Zanden, L.F.; De Gier, R.P.; Barten, E.J.; Zielhuis, G.A.; Feitz, W.F.; Roeleveld, N. Hypospadias: Risk factor patterns and different phenotypes. *BJU Int.* 2010, 105, 254–262.
17. Chandrasekara, A.; Shahidi, F. Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 6706-6714.
18. Cheynier, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005, 81, 223S-229S.
19. Cipolletti, M.; Solar Fernandez, V.; Montalesi, E.; Marino, M.; Fiocchetti, M. Beyond the antioxidant activity of dietary polyphenols in cancer: The modulation of estrogen receptors (ers) signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 2624.
20. Clydesdale, F. M.; Francis, F. J. *Food Nutrition and Health*; Springer Science & Business Media, Netherlands: 1985.
21. Colitti, M.; Sgorlon, S.; Stradaoli, G.; Farinacci, M.; Gabai, G.; Stefanon, B. Grape polyphenols affect mRNA expression of PGHS-2, TIS11b and FOXO3 in endometrium of heifers under ACTH-induced stress. *Theriogenology* 2007, 68, 1022–1030, doi:10.1016/j.theriogenology.2007.07.018.

22. Cools, S.; Van den Broeck, W.; Vanhaecke, L.; Heyerick, A.; Bossaert, P.; Hostens, M.; Opsomer, G. Feeding soybean meal increases the blood level of isoflavones and reduces the steroidogenic capacity in bovine corpora lutea, without affecting peripheral progesterone concentrations. *Anim. Reprod. Sci.* 2014, 144, 79–89.
23. Cory H., Passarelli S., Szeto J., Tamez M. and Mattei J. (2018.): The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Front. Nutr.* 5:87.
24. Crowe KM, Francis C. Position of the academy of nutrition and dietetics: functional foods. *J Acad Nutr Diet.* (2013) 113:1096–103. doi: 10.1016/j.jand.2013.06.002
25. Doerge, D.R. Bioavailability of soy isoflavones through placental/lactational transfer and soy food. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2011, 254, 145–147, doi:10.1016/j.taap.2010.10.018.
26. doi:10.1016/j.aninu.2017.09.004.
27. Donoghue, A.M. and G.J. Wishart (2000). Storage of poultry semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 213-232.
28. Du, Y.; Guo, H.; Lou, H. Grape seed polyphenols protect cardiac cells from apoptosis via induction of endogenous antioxidant enzymes. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 1695-1701.
29. Durand D, Damon M, Gobert M. 2013. Oxidative stress in farm animals: general aspects. *Cah Nutr Diet* 48:218–224.
30. Duthie, G.G.; Brown, K.M. Reducing the risk of cardiovascular disease. In *Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*; Goldberg, I., Ed.; Chapman & Hall: New York, NY, USA, 1994; pp. 19-38.
31. Eustache, F.; Mondon, F.; Canivenc-Lavier, M.C.; Lesaffre, C.; Fulla, Y.; Berges, R.; Cravedi, J.P.; Vaiman, D.; Auger, J. Chronic Dietary Exposure to a Low-Dose Mixture of Genistein and Vinclozolin Modifies the Reproductive Axis, Testis Transcriptome, and Fertility. *Environ. Health Perspect.* 2009, 117, 1272–1279, doi:10.1289/ehp.0800158.
32. Evans, B.A.J.; Griffiths, K.; Morton, M. Inhibition of 5 $\alpha$ -reductase in genital skin fibroblasts and prostate tissue by dietary lignans and isoflavonoids. *J. Endocrinol.* 1995, 147, 295–302.
33. *Food Chem.* 50:5832–5836.



34. Foxcroft GR. 2012. Reproduction in farm animals in an era of rapid genetic change: will genetic change outpace our knowledge of physiology? *Reprod Dom Anim.* 47:313–319.
35. Frankic T, Salobir J. 2011. In vivo antioxidant potential of Sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) wood extract in young growing pigs exposed to n-3 PUFA-induced oxidative stress. *J Sci Food Agric.* 91:1432–1439.
36. Grayer, R.J.; Veitch, N.C. Flavanones and dihydroflavonols. In *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*; Anderson, O.M., Markham, K.R., Eds.; CRC Press/Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2006; pp. 918-1002.
37. Hadadi, M.; Mohammadi, G.; Erfani, N.; Fatemi, R. Effects Of Short And Long-Term Administration Of Alfalfa On Testicular Histomorphometry In Rats. *J. Pharm. Res. Int.* 2020, 10–17, doi:10.9734/jpri/2020/v32i1230555.
38. Halliwell, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch. Biochem. Biophys.* 2008, 476, 107-112.
39. Harborne, J.B.; Williams, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000, 55, 481-504.
40. Hashem, Nesrein & Gonzalez-Bulnes, Antonio & Simal-Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. *Antioxidants.* 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.
41. Hassan Rasouli, Mohammad Hosein Farzaei & Reza Khodarahmi (2017.): Polyphenols and their benefits: A review, *International Journal of Food Properties*, 20:sup2, 1700-1741.
42. Huang, Q.; Liu, X.; Zhao, G.; Hu, T.; Wang, Y. Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. *Anim. Nutr.* 2018, 4, 137–150.
43. Kallela, K.; Heinonen, K.; Saloniemi, H. Plant oestrogens; the cause of decreased fertility in cows. A case report. *Nord. Vet.* 1984, 36, 124–129.
44. Khurana, S.; Venkataraman, K.; Hollingsworth, A.; Piche, M.; Tai, T. Polyphenols: Benefits to the Cardiovascular System in Health and in Aging. *Nutrients.* 2013, 5(10), 3779–3827. 10.3390/nu5103779.
45. Kawaii, S.; Tomono, Y.; Katase, E.; Ogawa, K.; Yano, M. Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruits. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 3565-3571.

46. Kim, K.-H.; Tsao, R.; Yang R.; Cui, S.W. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chem.* 2006, 95, 466-473.
47. Krzysztof Lipiński, Zofia Antoszkiewicz, Magdalena Mazur-Kuśnerek, Daniel Korniewicz & Sylwia Kotlarczyk (2019.): The effect of polyphenols on the performance and antioxidant status of sows and piglets, *Italian Journal of Animal Science*, 18:1, 174-181.
48. Lu, C.; Zhu, W.; Shen, C.-L.; Gao, W. Green Tea Polyphenols Reduce Body Weight in Rats by Modulating Obesity-Related Genes. *PLoS ONE*. 2012, 7(6), e38332.
49. Lecour S, Lamont KT. Natural polyphenols and cardioprotection. *Mini Rev. Med Chem.* (2011) 11:1191–9. doi: 10.2174/13895575111091191
50. Liu, J.; Ando, R.; Shimizu, K.; Hashida, K.; Makino, R.; Ohara, S.; Kondo, R. Steroid 5 $\alpha$ -reductase inhibitory activity of condensed tannins from woody plants. *J. Wood Sci.* 2008, 54, 68–75, doi:10.1007/s10086-007-0905-9.
51. Lorand, T.; Vigh, E.; Garai, J. Hormonal action of plant derived and anthropogenic non-steroidal estrogenic compounds: Phytoestrogens and xenoestrogens. *Curr. Med. Chem.* 2010, 17, 3542–3574.
52. Lykkesfeldt J, Svendsen O. 2007. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J.* 173:502–511.
53. M. Gopi, P. V. Beulah, G. Prabakar and J. Mohan (2020.): POLYPHENOLS AS AN ANTIOXIDANT AGENT IMPROVES CHICKEN SPERM QUALITIES DURING COLD STORAGE; *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 30(6): 2020, Page: 1653-1658.
54. Macias-Cruz, U.; Vicente-Perez, R.; Lopez-Baca, M.A.; Gonzalez-Rios, H.; Correa-Calderon, A.; Arechiga, C.F.; Avendano-Reyes, L. Effects of dietary ferulic acid on reproductive function and metabolism of pre-pubertal hairbreed ewes during the anestrus season. *Theriogenology* 2018, 119, 220–224, doi:10.1016/j.theriogenology.2018.07.012.
55. Mazur, W.M.; Duke, J.A.; Wahala, K.; Rasku, S.; Adlercreutz, H. Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in Humans. *J. Nutr. Biochem.* 1998, 9, 193-200.
56. McCallum, J.L.; Yang, R.; Young, J.C.; Strommer, J.N.; Tsao, R. Improved high performance liquid chromatographic separation of anthocyanin compounds from

- grapes using a novel mixed-mode ion-exchange reversed-phase column. *J. Chromatogr. A* 2007, 1148, 38-45.
57. Milner, J.A. Reducing the risk of cancer. In *Functional Foods: Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*; Goldberg, I., Ed.; Chapman & Hall: New York, NY, USA, 1994; pp. 39-70.
58. Mueller-Harvey, I.; Bee, G.; Dohme-Meier, F.; Hoste, H.; Karonen, M.; Kölliker, R.; Lüscher, A.; Niderkorn, Leouifoudi, I.; Harnafi, H.; Ziad, A. Olive mill waste extracts: Polyphenols content, antioxidant, and antimicrobial activities. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2015, 2015, doi:10.1155/2015/714138.
59. Mustonen, E.; Taponen, S.; Andersson, M.; Sukura, A.; Katila, T.; Taponen, J. Fertility and growth of nulliparous ewes after feeding red clover silage with high phyto-oestrogen concentrations. *Animal* 2014, 8, 1699–1705, doi: 10.1017/S175173111400161X.
60. Nawab, A.; Tang, S.; Gao, W.; Li, G.; Xiao, M.; An, L.; Wu, J.; Liu, W. Tannin Supplementation in Animal Feeding; Mitigation Strategies to Overcome the Toxic Effects of Tannins on Animal Health: A Review. *J. Agric. Sci.* 2020, 12, 217, doi:10.5539/jas.v12n4p217.
61. Pinent, M.; Blay, M.; Serrano, J.; Ardévol, A. Effects of Flavanols on the Enteroendocrine System: Repercussions on Food Intake. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2015, (just-accepted), 00–00. 10.1080/10408398.2013.871221.
62. Pereira, D. M.; Valentão, P.; Pereira, J. A.; Andrade, P. B. Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules.* 2009, 14(6), 2202–2211.
63. Perez-Martinez, C.; Ferreras-Estrada, M.C.; Garcia-Iglesias, M.J.; Bravo-Moral, A.M.; Espinosa-Alvarez, J.; Escudero-Diez, A. Effects of in utero exposure to nonsteroidal estrogens on mouse testis. *Can. J. Vet. Res.* 1997, 61, 94.
64. Prater, M.R.; Laudermilch, C.L.; Liang, C.; Holladay, S.D. Placental Oxidative Stress Alters Expression of Murine Osteogenic Genes and Impairs Fetal Skeletal Formation. *Placenta* 2008, 29, 802–808, doi:10.1016/j.placenta.2008.06.010.
65. Prior, R.L.; Lazarus, S.A.; Cao, G.; Muccitelli, H.; Hammerstone, J.F. Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 1270-1276.

66. Rahman, S.U., Y. Huang, L. Zhu, S. Feng, I.M. Khan, J. Wu, Y. Li and X. Wang (2018). Therapeutic role of green tea polyphenols in improving fertility: A review. *Nutrients*. 10: 834.
67. Ramírez-Restrepo, C.A.; Barry, T.N.; López-Villalobos, N.; Kemp, P.D.; Harvey, T.G. Use of *Lotus corniculatus* containing condensed tannins to increase reproductive efficiency in ewes under commercial dryland farming conditions. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2005, 121, 23–43, doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.02.006.
68. Reed, K. Fertility of Herbivores Consuming Phytoestrogen-containing *Medicago* and *Trifolium* Species. *Agriculture* 2016, 6, 35, doi:10.3390/agriculture6030035.
69. Reed, K. Fertility of Herbivores Consuming Phytoestrogen-containing *Medicago* and *Trifolium* Species. *Agriculture* 2016, 6, 35, doi:10.3390/agriculture6030035.
70. Rendeiro, C.; Vauzour, D.; Rattray, M.; Waffo-Tégou, P.; Mérillon, J. M.; Butler, L. T.; Williams, C. M.; Spencer, J. P. Dietary Levels of Pure Flavonoids Improve Spatial Memory Performance and Increase Hippocampal Brain-Derived Neurotrophic Factor. *PLoS ONE*. 2013, 8(5), e63535.
71. Roselli, C.E.; Stormshak, F. The ovine sexually dimorphic nucleus, aromatase, and sexual partner preferences in sheep. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2010, 118, 252–256.
72. Setchell, K.D.; Clerici, C.; Lephart, E.D.; Cole, S.J.; Heenan, C.; Castellani, D.; Wolfe, B.E.; Nechemias-Zimmer, L.; Brown, N.M.; Lund, T.D. S-equol, a potent ligand for estrogen receptor  $\beta$ , is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005, 81, 1072–1079.
73. Si, W.; Gong, J.; Tsao, R.; Kalab, M.; Yang, R.; Yin, Y. Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *J. Chromatogr. A* 2006, 1125, 204-210.
74. Singh, C.K.; Kumar, A.; LaVoie, H.A.; DiPette, D.J.; Singh, U.S. Diabetic complications in pregnancy: Is resveratrol a solution? *Exp. Biol. Med.* 2013, 238, 482–490, doi:10.1177/1535370212473704.
75. Spinaci, M.; Bucci, D.; Muccilli, V.; Cardullo, N.; Nerozzi, C.; Galeati, G. A polyphenol-rich extract from an oenological oak-derived tannin influences in vitro maturation of porcine oocytes. *Theriogenology* 2019, 129, 82–89, doi:10.1016/j.theriogenology.2019.02.017.

76. Surai, P.F., N. Fujihara, B.K. Speake, J.P. Brillard, G.J. Wishart and N.H.C. Sparks (2001). Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen review. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 14(7): 1024-1050.
77. Swelum, A.A.-A.; Hashem, N.M.; Abo-Ahmed, A.I.; Abd El-Hack, M.E.; Abdo, M. The Role of Heat Shock Proteins in Reproductive Functions. In *Heat Shock Proteins*; Springer: Dordrecht, the Netherlands, 2020.
78. Tsao R. (2010.): Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols: A review, *Nutrients* 2010, 2, 1231-1246.
79. Tsao, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2010, 2, 1231–1246.
80. Tsao, R.; McCallum, J. Chemistry of Flavonoids. In *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability*; de la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G., Eds.; Blackwell Publishing: Ames, IA, USA, 2009; Chapter 5, pp. 131-153.
81. Urso, M. and P.M. Clarkson (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicol.* 189: 41-54.
82. Visioli, F.; Lastra, C. A. D. L.; Andres-Lacueva, C.; Aviram, M.; Calhau, C.; Cassano, A.; D'Archivio, M.; Faria, A.; Favé, G.; Fogliano, V. Polyphenols and Human Health: A Prospectus. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2011, 51(6), 524–546. 10.1080/10408391003698677.
83. Wang, H.; Murphy, P.A. Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.* 1994, 42, 1666-1673.
84. Wang, Z.; Fu, C.; Yu, S. Effects of green tea polyphenols, insulin-like growth factor I and glucose on developmental competence of bovine oocytes. *Rev. Bras. Zootec.* 2012, 41, 2418–2423.
85. Watzková, J.; Křížová, L.; Pavlík, A.; Schulzová, V.; Hajšlová, J.; Lojza, J. The Effect of Soybean-Derived Phytoestrogens on Concentrations of Plasma Isoflavones, 15-keto-13, 14-dihydroprostaglandin F 2 $\alpha$  and Progesterone in Dairy Cows. *Acta Vet. Brno* 2011, 79, 525–532.
86. Wegener, G. 'Let Food Be Thy Medicine, and Medicine Be Thy Food': Hippocrates Revisited. *Acta Neuropsychiatr.* 2014, 26(01), 1–3. 10.1017/neu.2014.3.
87. Wen, F.; Li, Y.; Feng, T.; Du, Y.; Ren, F.; Zhang, L.; Han, N.; Ma, S.; Li, F.; Wang, P. Grape Seed Procyanidin Extract (GSPE) Improves Goat Sperm Quality When Preserved at 4 °C. *Animals* 2019, 9, 810.

88. Woclawek-Potocka, I.; Mannelli, C.; Boruszewska, D.; Kowalczyk-Zieba, I.; Wasniewski, T.; Skarzynski, D.J. Diverse effects of phytoestrogens on the reproductive performance: Cow as a model. *Int. J. Endocrinol.* 2013, 2013, 650984, doi:10.1155/2013/650984.
89. Xiao, J. Phytochemicals in Food and Nutrition. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2016, 56(1), S1 S3.
90. Yousif, A.N. Effect of Flaxseed on some hormonal profile and genomic DNA concentration in Karadi lambs. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 2019, 388, 012035, doi:10.1088/1755-1315/388/1/012035.
91. Yue, W.; Ming, Q.-L.; Lin, B.; Rahman, K.; Zheng, C.-J.; Han, T.; Qin, L.-P. Medicinal Plant Cell Suspension Cultures: Pharmaceutical Applications and High-Yielding Strategies for the Desired Secondary Metabolites. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2016, 36(2), 215–232. 10.3109/07388551.2014.923986.
92. Zhang, H.; Tsao, R. Dietary Polyphenols. Oxidative Stress Antioxidant Anti-Inflammatory Effects. *Cur. Opinion Food Sci.* 2016, 8, 33–42.
93. Zhao, J.; Jin, Y.; Du, M.; Liu, W.; Ren, Y.; Zhang, C.; Zhang, J. The effect of dietary grape pomace supplementation on epididymal sperm quality and testicular antioxidant ability in ram lambs. *Theriogenology* 2017, 97, 50–56.

### 13. SAŽETAK

Polifenoli pripadaju najvećoj skupini fitokemikalija, a mnogi od njih pronađeni su u biljnoj hrani. Prehrana bogata polifenolima povezana je s mnogim zdravstvenim prednostima. Reprodukcijski je složen proces na koji u znatnoj mjeri utječu okolišni čimbenici, posebno hrana / hranidba i njezini sastojci. Domaće životinje, kao biljojedi, izloženi su velikim količinama polifenola prisutnih u njihovom prirodnom sustavu hranjenja, u alternativnim resursima hrane (grmlje, drveće i agroindustrijski nusproizvodi) i u aditivima obogaćenim polifenolima. Takva se izloženost povećala zbog dobro poznatih antioksidativnih svojstava polifenola. Međutim, do danas je diskutabilna argumentacija oko utjecaja polifenola na reproduktivne događaje. U skladu s tim, intenzivno uključivanje polifenola u hranidbu rasplodnih životinja te medija za pomoćne reproduktivne tehnike zahtijeva daljnja istraživanja, izbjegavajući bilo koji izvor reproduktivnog otpada i postižući maksimalne koristi. Ovaj rad ilustrira nedavna otkrića koja povezuju hranidbu s polifenolima iz različitih izvora (konvencionalne i nekonvencionalne hrane) s reproduktivnim svojstvima domaćih životinja, potkrijepljenih nalazima *in vitro* istraživanja na ovom polju. Ovo ažuriranje podataka u radu pomoći će u formuliranju pravilne hranidbe, optimizaciji uvođenja novih biljnih vrsta i dodataka hrani za poboljšanje reproduktivne funkcije, izbjegavanje mogućeg reproduktivnog otpada i maksimiziranje mogućih koristi.

**Ključne riječi:** polifenoli; antioksidans; reprodukcija; domaće životinje

## 14. SUMMARY

Polyphenols belong to the largest group of phytochemicals, and many of them have been found in plant - based foods. Polyphenol - rich diets have been linked to many health benefits. Reproduction is a complex process that is substantially affected by environmental factors, specifically feed / diet and its components. Farm animals as herbivorous animals are exposed to a large amount of polyphenols present in their natural feeding system, in alternative feed resources (shrubs, trees, and agro-industrial byproducts), and in polyphenol-enriched additives. Such exposure has increased because of the well-known antioxidant properties of polyphenols. However, to date, the argumentation around the impacts of polyphenols on reproductive events is debatable. Accordingly, the intensive inclusion of polyphenols in the diets of breeding animals and in media for assisted reproductive techniques needs further investigation, avoiding any source of reproductive waste and achieving maximum benefits. This thesis illustrates recent findings connecting dietary polyphenols consumption from different sources (conventional and unconventional feeds) with the reproductive performance of farm animals, underpinned by the findings of *in vitro* studies in this field. This update will help in formulating proper diets, optimizing the introduction of new plant species, and feed additives for improving reproductive function, avoiding possible reproductive wastes and maximizing possible benefits.

**Keywords:** polyphenols; antioxidant; reproduction; farm animals



## 15. POPIS SLIKA

**Slika 1.** Tipične fenolne kiseline u hrani: lijevo, benzojeve kiseline; desno, cimetne kiseline.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

**Slika 2.** Osnovne flavonoidne strukture.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

**Slika 3.** Tipični izoflavoni, neoflavoni i halkoni koji se nalaze u hrani.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

**Slika 4.** Flavoni, flavonoli, flavanoni i flavanonoli.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

**Slika 5.** Flavanoli i procijanidini.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

**Slika 6.** Tipični dimeri procijanidina, trimeri i theaflavin.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

**Slika 7.** Glavni antocijanidini.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

**Slika 8.** Polifenoli amidi.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

**Slika 9.** Ostali važni polifenoli.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

**Slika 10.** Učinci polifenola na funkcije reproduktivnih organa i njegove posljedice.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

## 16. POPIS TABLICA

**Tablica 1.** Izvori polifenolnih spojeva u sastojcima hrane za domaće životinje.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

**Tablica 2.** Sažetak nedavnih *in vivo* istraživanja o učincima polifenola na reproduktivne performanse kod mužjaka domaćih životinja. IVF = *in vitro* oplodnja.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

**Tablica 3.** Sažetak nedavnih *in vivo* istraživanja o učincima polifenola na reproduktivne sposobnosti kod ženki domaćih životinja.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

**Tablica 4.** Sažetak nedavnih *in vitro* istraživanja o učincima polifenola na rezultate nekih potpomognutih reproduktivnih tehnika (ART) kod mužjaka domaćih životinja.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

**Tablica 5.** Sažetak nedavnih *in vitro* istraživanja o učincima polifenola na rezultate nekih potpomognutih reproduktivnih tehnika (ART) kod ženki domaćih životinja.

(Izvor: Hashem, Nesrein & Gonzalez - Bulnes, Antonio & Simal - Gandara, Jesus. (2020). Polyphenols in Farm Animals: Source of Reproductive Gain or Waste?. Antioxidants. 9. 1023. 10.3390/antiox9101023.)

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Diplomski rad

Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Sveučilišni diplomski studij, smjer Specijalna zootehnika

Utjecaj polifenola na reproduktivne pokazatelje domaćih životinja

Gloria Došlić

**Sažetak:** Polifenoli pripadaju najvećoj skupini fitokemikalija, a mnogi od njih pronađeni su u biljnoj hrani. Prehrana bogata polifenolima povezana je s mnogim zdravstvenim prednostima. Reprodukcijski je složen proces na koji u znatnoj mjeri utječu okolišni čimbenici, posebno hrana / hranidba i njezini sastojci. Domaće životinje, kao biljojedi, izloženi su velikim količinama polifenola prisutnih u njihovom prirodnom sustavu hranjenja, u alternativnim resursima hrane (grmlje, drveće i agroindustrijski nusproizvodi) i u aditivima obogaćenim polifenolima. Takva se izloženost povećala zbog dobro poznatih antioksidativnih svojstava polifenola. Međutim, do danas je diskutabilna argumentacija oko utjecaja polifenola na reproduktivne događaje. U skladu s tim, intenzivno uključivanje polifenola u prehranu rasplodnih životinja te medija za pomoćne reproduktivne tehnike zahtijeva daljnja istraživanja, izbjegavajući bilo koji izvor reproduktivnog otpada i postižući maksimalne koristi. Ovaj rad ilustrira nedavna otkrića koja povezuju hranidbu s polifenolima iz različitih izvora (konvencionalne i nekonvencionalne hrane) s reproduktivnim svojstvima domaćih životinja, potkrijepljenih nalazima *in vitro* istraživanja na ovom polju. Ovo ažuriranje podataka u radu pomoći će u formuliranju pravilne hranidbe, optimizaciji uvođenja novih biljnih vrsta i dodataka hrani za poboljšanje reproduktivne funkcije, izbjegavanje mogućeg reproduktivnog otpada i maksimiziranje mogućih koristi.

**Rad je izrađen pri:** Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Drago Bešlo

**Broj stranica:** 70

**Broj slika:** 10

**Broj tablica:** 5

**Broj grafikona:** -

**Broj literaturnih navoda:** 93

**Broj priloga:** -

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** polifenoli; antioksidansi; reprodukcija; domaće životinje

**Datum obrane:**

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. prof. dr. sc. Marcela Šperanda, predsjednik

2. izv. prof. dr. sc. Drago Bešlo, mentor

3. doc. dr. Dejan Agić, član

**Rad je pohranjen u:** Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Vladimira Preloga 1.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Graduate thesis

Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

University Graduate Studies, Zootechnics, course Special zootechnics

Influence of polyphenols on reproductive indicators of domestic animals

Gloria Došlić

**Abstract:** Polyphenols belong to the largest group of phytochemicals, and many of them have been found in plant - based foods. Polyphenol - rich diets have been linked to many health benefits. Reproduction is a complex process that is substantially affected by environmental factors, specifically feed / diet and its components. Farm animals as herbivorous animals are exposed to a large amount of polyphenols present in their natural feeding system, in alternative feed resources (shrubs, trees, and agro-industrial byproducts), and in polyphenol-enriched additives. Such exposure has increased because of the well-known antioxidant properties of polyphenols. However, to date, the argumentation around the impacts of polyphenols on reproductive events is debatable. Accordingly, the intensive inclusion of polyphenols in the diets of breeding animals and in media for assisted reproductive techniques needs further investigation, avoiding any source of reproductive waste and achieving maximum benefits. This thesis illustrates recent findings connecting dietary polyphenols consumption from different sources (conventional and unconventional feeds) with the reproductive performance of farm animals, underpinned by the findings of *in vitro* studies in this field. This update will help in formulating proper diets, optimizing the introduction of new plant species, and feed additives for improving reproductive function, avoiding possible reproductive wastes and maximizing possible benefits.

**Thesis performed at:** Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

**Mentor:** assoc.prof. dr. sc. Drago Bešlo

**Number of pages:** 70

**Number of figures:** 10

**Number of tables:** 5

**Number of charts:** -

**Number of references:** 93

**Number of appendices:** -

**Key words:** polyphenols; antioxidant; reproduction; farm animals

**Thesis defended on date:**

**Reviewers:**

1. prof. dr. sc. Marcela Šperanda, president
2. assoc. prof. dr. sc. Drago Bešlo, mentor
3. doc. dr. Dejan Agić, member

**Thesis deposited at:** Library, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, J.J. Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1.