

Med od kestena - izvor kinurenske kiseline

Strunje, Josip

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:806847>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



Sveučilište u Splitu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Odjel za kemiju

Josip Strunje

Med od kestena – izvor kinurenske kiseline

Završni rad

Split, 2024.

Ovaj završni rad izrađen je u okviru institucijskog znanstvenog projekta Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu naziva “Istraživanje kemijske raznolikosti i bioaktivnog potencijala prirodnih produkata”.



Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu

Završni rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za kemiju

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

Med od kestena – izvor kinurenske kiseline

Josip Strunje

U ovom radu je opisan med od kestena, njegov kemijski sastav i svojstva. Med od kestena se posebno ističe visokim sadržajem kinurenske kiseline u usporedbi s ostalim izvorima poput, ribe, rajčica i drugih prehrambenih proizvoda. Nadalje, sadržaj kinurenske kiseline u medu od kestena, uspoređen je i s drugim vrstama meda. Zbog svog visokog sadržaja u medu od kestena, kinurenska kiselina može poslužiti kao kemijski marker botaničkog podrijetla meda od kestena. Kinurenska kiselina je pronađena u *Castanea sativa* Mill., *Castanea spp.*, *Castanea crenata* Sieb vrstama meda. U radu je objašnjena biološka aktivnost kinurenske kiseline, kao i njen biološki značaj, uključujući utjecaj na živčani sustav. Opisana su i svojstva pojedinih međuprodukata kinureninskog puta.

Ključne riječi: alkaloid, kinurenska kiselina, triptofan, aminokiselina, kestenov med, med

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu.

Rad sadrži: 30 stranica, 1 grafički prikaz, 4 tablična prikaza, 7 slika

Mentor: Dr. sc. Marina Kranjac, docent

Ocjenjivači: Doc. dr. sc. Marina Kranjac

Doc. prof. dr. sc. Barbara Soldo, član

Martina Gudelj, član

Basic documentation card

University of Split

B. Sc. Thesis

Faculty of Science

Department of Chemistry

Ruđera Boškovića 33, 21 000 Split, Croatia

CHESTNUT HONEY – A SOURCE OF KYNURENIC ACID

Josip Strunje

This thesis describes chestnut honey, its chemical composition and its properties. Chestnut honey is particularly characterized by its high content of kynurenic acid compared to other sources such as fish, tomatoes and other foods. Furthermore, the content of kynurenic acid in chestnut honey is compared with other types of honey. Due to its high content in chestnut honey, kynurenic acid can serve as a chemical marker of the botanical origin of chestnut honey. Kynurenic acid was found in the honey varieties *Castanea sativa* Mill., *Castanea* spp. and *Castanea crenata* Sieb. The thesis explains the biological activity of kynurenic acid and its biological significance, including its influence on the nervous system. The properties of certain intermediates of the kynurenine pathway are also described.

Keywords: alkaloid, kynurenic acid, tryptophan, amino acid, honey, chestnut honey

Thesis deposited in the library of Faculty of Science, University of Split

Thesis consists of: 30 pages, 1 graph, 4 tables, 7 pictures

Mentor: dr. sc. Marina Kranjac, assistant professor

Reviewers: Assistant professor PhD. Marina Kranjac, president

Assistant professor PhD. Barbara Soldo, member

Martina Gudelj, member

Sadržaj:

1. UVOD.....	6
2. RAZRADA TEME.....	7
2.1. Med i kemijski sastav meda.....	7
2.2. Med od kestena.....	8
2.2.1. Botanički izvor i svojstva.....	8
2.3. Biološki aktivna svojstva meda od kestena.....	9
2.4. Kemijski sastav meda od kestena.....	11
3. KINURENSKA KISELINA.....	11
3.1. Biosinteza, kemijska i fizikalna svojstva.....	11
3.2. Kinureninski put triptofana.....	13
3.2.1. Biološka aktivnost i funkcije metabolita kinureninskog puta triptofana.....	14
3.3. Zastupljenost kinurenske kiseline.....	18
3.3.1. Kinurenska kiselina u medu od kestena.....	18
3.4. Zastupljenost kinurenske kiseline u ostaloj hrani i drugim pčelinjim proizvodima.....	19
4. METODE IZOLACIJE I ANALIZE KINURENSKE KISELINE.....	22
5. ZAKLJUČAK.....	24
Literatura:.....	25

1. UVOD

Med je od davnina poznat pčelinji proizvod koji se koristi kao zaslađivač, u medicinske svrhe, u proizvodnji alkoholnih pića i na brojne druge načine. Pčele odlažu nektar u saće gdje on dozrijeva djelovanjem enzima. Med se odlikuje ljepljivošću, viskoznošću te kristalizacijom prilikom stajanja [1].

Istraživanjima su dokazana antioksidacijska svojstva meda, što je pridonijelo shvaćanju njegove važnosti u prehrani zbog povećanog interesa za opskrbom organizma antioksidansima. Med sadrži spojeve koji posjeduju antioksidacijska svojstva poput fenolnih kiselina, flavonoida, derivata karotenoida, vitamina C, aminokiselina i proteina. Antioksidansi pridonose prevenciji mnogih bolesti poput neuroloških poremećaja, kardiovaskularnih oboljenja, upalnih procesa popraćenih zacjeljivanjem rana ili rezultata pretrpljene traume. Osim poznatih antioksidansa ističu se metaboliti kinureninskog puta aminokseline triptofan (Trp) sa značajnim učincima po ljudsko zdravlje. Jedan od produkata je kinurenska kiselina s brojnim zabilježenim blagotvornim djelovanjima, a među njenim različitim izvorima ističe se med kestena kao pčelinji proizvod s njenim najvećim sadržajem[1, 2, 3].

Cilj ovog rada je dati pregled literature te na temelju dosadašnjih objavljenih istraživanja i saznanja opisati karakteristike i svojstva meda od kestena, posebno ističući visok sadržaj kinurenske kiseline u njegovom sastavu kao njegovog specifičnog obilježja.

2. RAZRADA TEME

2.1. Med i kemijski sastav meda

Med je prehrambena namirnica kojeg proizvode pčele iz cvjetnog nektara. Pčele, uz izdvajanje vode, cvjetni nektar pohranjuju u saćama. Sastoji se uglavnom od šećera fruktoze, glukoze i maltoze. Osim šećera koji čine med, značajan je udio proteina, organskih kiselina, aminokiselina, raznih enzima i peluda [4,5]. S obzirom na konzistenciju, med može biti u tekućem stanju ili kristaliziran [4].

S obzirom na botaničko podrijetlo, razlikuje se monoflorni i poliflorni med. Prema Pravilniku o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda monoflorni med je onaj koji zadovoljava uvjet da u netopivom sediment sadrži najmanje 45 % zrnaca peluda iste biljne vrste, uz iznimke. Ako ne zadovoljava navedeni uvjet, med se svrstava u poliflorni med, odnosno miješanog je podrijetla, potječe iz različitih biljnih vrsta [5].

Med od kestena zadovoljava uvjet monoflornosti s 85% peludi vrste *Castanea sativa* (pitomi kesten), dok med od kadulje s 20% peludi iz te vrste (*Salvia sp.*) i med od lipe (*Tilia sp.*) s 25% peludi navedene vrste [5].

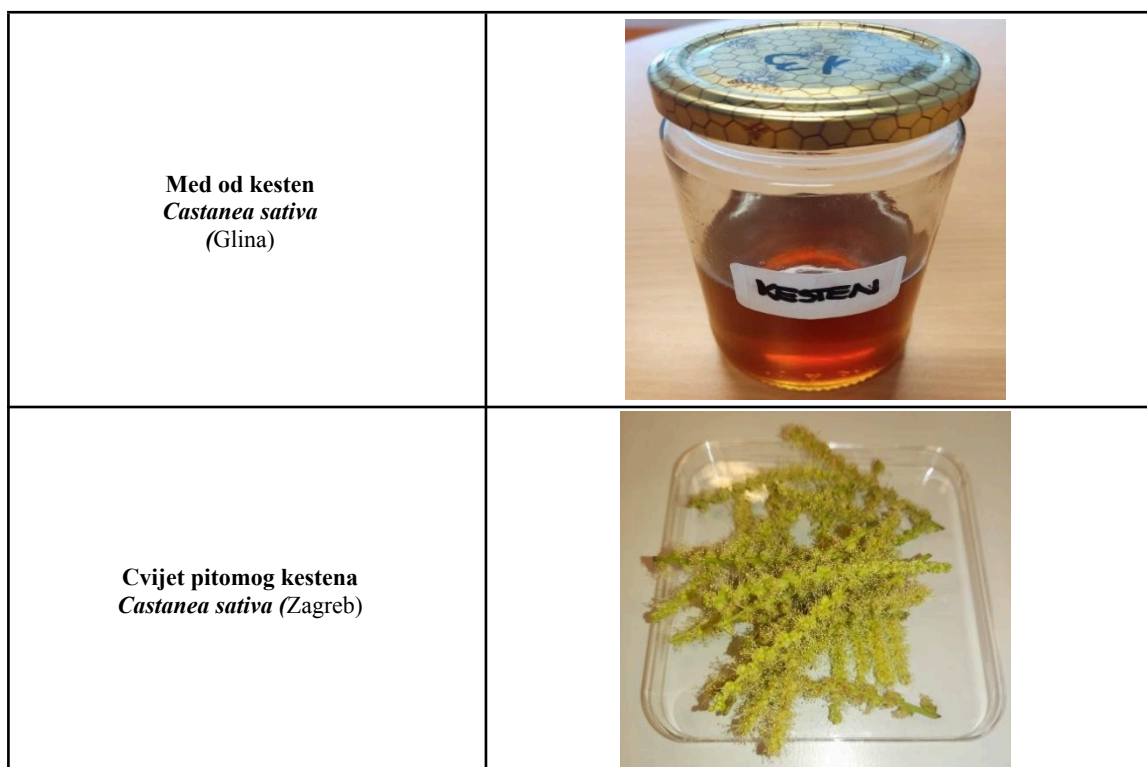
Med koji je namijenjen za prodaju i konzumaciju mora zadovoljavati određene uvjete: ne smije imati strane mirise i okuse, ne smiju se dodavati dodatni zaslađivači i umjetna bojila. Onečišćenja poput kukaca i njihovih ostataka i dijelova tijela također nisu dozvoljena [5]. Uz ostale karakteristike, važno je napomenuti brzo tamnjenje meda pri visokim temperaturama, budući da je boja meda jedna od karakteristika njegove kvalitete [6].

Kako bismo odredili botaničko porijeklo meda, često se poseže za kemijskim markerima kao jednom od metoda. Kemijski markeri pripadaju različitim skupinama kemijskih spojeva od kojih su najvećim dijelom organski spojevi poput aminokiselina, flavonoida, fenola i drugih.

2.2. Med od kestena

2.2.1. Botanički izvor i svojstva

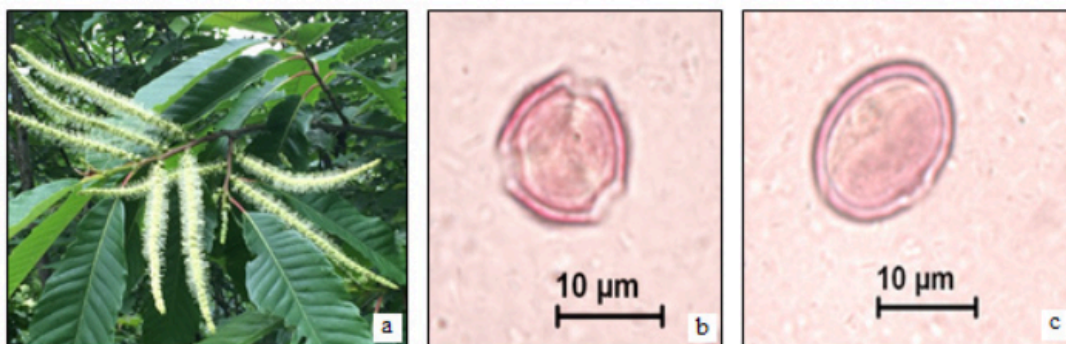
Stablo kestena je izuzetno cijenjeno u pčelarstvu zbog muških cvjetova koji obiluju nektarom koji se izlučuje na dnu filamenata prašnika [7]. Važno je za napomenuti da uz vrstu *Castanea sativa*, postoje i druge vrste kestena karakteristične za razna geografska područja poput *Castanea crenata*, *Castanea mollissima* i druge. Ono što je karakteristično za sam pelud kestena je antimikrobna i antioksidativna aktivnost koja potječe od mineralnih tvari koji se nalaze u sastavu peluda [7].



Slika 1. Uzorak meda od kestena, i cvijet pitomog kestena (*Castanea sativa* Mill.). Izvor: laboratorij Odjela za kemiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Splitu

Kao što je već spomenuto, ovisno o udjelu peluda iz iste ili različitih biljnih vrsta razlikujemo monoflorni i poliflorni med, a za samo otkrivanje izvora peluda analitičari posežu za melisopalintološkom analizom [5,8]. Metoda se provodi uz pomoć mikroskopa kako bi se odredila morfologija i botaničko porijeklo pojedinog peludnog zrna. Tijekom analize

znanstvenici se koriste bazama peluda koji pomažu identifikaciji vrsta koje produciraju pelud zastupljen u uzorku meda [6,8]. Kako bi se uspješno provela melisopalintološka analiza potrebno je provesti acetolizu peluda u svrhu dobivanja samo egzinske ovojnice [6].



Slika 2. Pelud za melisopalintološku analizu. Preuzeto iz N. Mayda *et. al. J. Biol. & Chem.* **46** (2018) 135-145

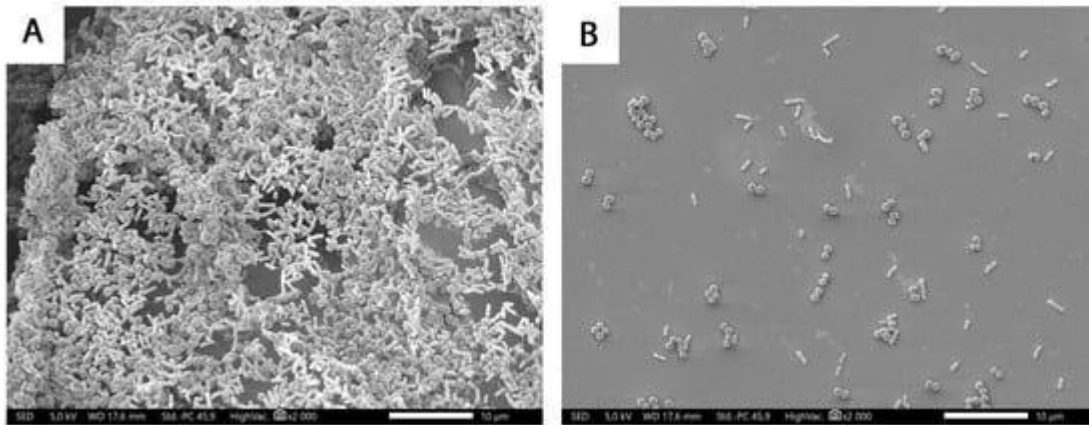
2.3. Biološki aktivna svojstva meda od kestena

Med kao namirnica nije sterilan - sadrži određen udio bakterija i gljivica, no njegova svojstva i sadržaj ograničavaju rast i razvoj mikroorganizama. Općenito je za sprječavanje mikrobne aktivnosti u medu zaslužna visoka osmolalnost, budući da je med 80% šećernog sastava. Uz visoku osmolalnost, na antimikrobnu aktivnost meda utječu i stvaranje hidrogen peroksida (H_2O_2), prisutnost antimikrobnih proteina i niska pH vrijednost [9]. Osim navedenih čimbenika, važna je i aktivnost flavinskog enzima koji sadrži flavin adenozin dinukleotid (FAD) kao prostetičku skupinu glukoza-oksidade koji katalizira pretvorbu glukoze u glukonolakton i vodikov peroksid s već spomenutom antimikrobnom aktivnošću zbog velike oksidacijske moći [9,10,11]. Enzim se luči iz hipofaringealne žlijezde (ovisno o genskoj ekspresiji) kod pčela u nektar [9].

Testovi provedeni na kulturama bakterija potvrđuju inhibicijsku moć meda od kestena. Veća antibakterijska aktivnost potvrđena je u kod kojih je pelud bio pohranjen u stanicama saća [9].

Uz značajna antibakterijska svojstva meda, veliku pažnju i interes zaokupljaju antioksidativna svojstva medova općenito, a tako i meda od kestena [12]. Spojevi poput

fenola, flavonoida i karotenoida koji sadrže određene pigmente karakteristično posjeduju antioksidativnim djelovanjima. Antioksidacijski učinak se pokazao većim kod medova veće pigmentacije, što upućuje da intenzitet obojenja ukazuje na veći potencijal antioksidativnog djelovanja meda [6]. Porijeklo nektara također igra važnu ulogu u antioksidativnim svojstvima meda zbog različitog sadržaja djelatnih tvari poput askorbinske kiseline koja je zastupljena u različitim koncentracijama u različitim vrstama biljaka [6].



Slika 3. SEM mikroskopski prikaz testa inhibicije bakterija *P. aeruginosa* i MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) nakon tretmana 6%-tnom otopinom meda kestena. Preuzeto iz R. Koloh *et al. Antibiotics* **13** (2024) 255

Određene vrste bakterija koje se mogu pronaći u medu proizvode baktericidne spojeve koji inhibiraju rast i razvijanje drugih bakterijskih vrsta što je dodatno suspregnuto spomenutim antimikrobnim spojevima u medu. Među Gram-pozitivnim bakterijama prisutnim u medu predstavnici su rodovi *Clostridium*, *Streptococcus*, *Bacillus*, a među Gram-negativnim bakterijama nalaze se predstavnici rodova *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* [9]. Navedeni rodovi dva odjeljka bakterija proizvode spore u medu koje su u stanju mirovanja te pokazuju mogućnost preživljavanja u uvjetima visoke osmolarnosti i niskih temperatura do jedne godine [9]. Uz mikroorganizme koji se prirodno nalaze u sastavu meda, drugi izvori istih mogu biti ljudi, vjetar, posude u kojem se med skladišti i alati pomoću kojih se obrađuje. Od navedenih uzroka kontaminacije, najgori uzrok je neadekvatan pristup pčelarstvu i loša pčelarska praksa [9].

2.4. Kemijski sastav meda od kestena

Med kestena izdvaja se od ostalih medova po najvećem sadržaju kinurenske kiseline. Karakterističan je po svom gorkom okusu, smeđe-crvenoj boji, mirisu koji podsjeća na karamel (pregoreni šećer), definiranom kemijskom sastavu i svojstvima peluda. Upotrebljava se u narodnoj medicini zbog svojih ljekovitih značajki, pa je stoga uvršten u popis medova s medicinskim svojstvima [9]. Kemijski sastav meda od iznimne je važnosti u praćenju geografskog podrijetla, što se radi na temelju proučavanja udjela različitih anorganskih iona (Ca^{2+} , K^+ , Mn^{2+} , ...) [9].

Premda su šećeri jedni od glavnih sastojaka svih medova, med kestena sadrži značajno visok udio fruktoze i glukoze, što ukazuje da nije podložan kristalizaciji (uobičajeno svojstvo prirodnih medova), stoga ostaje u tekućem agregatnom stanju. Među ostalim šećerima koji su prisutni su saharoza, rafinoza, maltoza, turanoza i neki drugi šećeri [9].

Kestenov med je također bogat fenolnim spojevima kao što su fenolne kiseline i flavonoidi s antioksidativnim djelovanjem. Među glavnim flavonoidima u medu kestena su oni dobiveni iz propolisa: krizin, galangin, kemferol i drugi [9].

Jedno od zanimljivijih svojstava meda od kestena je dobra električna provodljivost, visok sadržaj aminokiseline prolin te aktivnost enzima amilaze koji katalizira razgradnju škroba do maltoze [9,13].

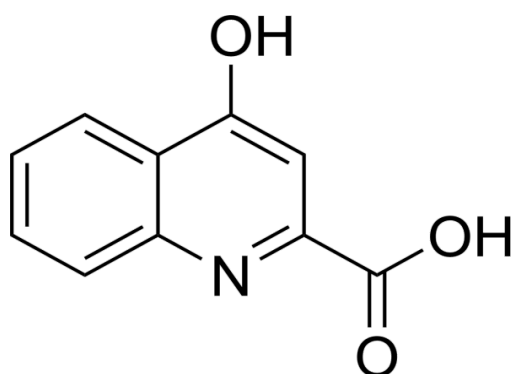
3. KINURENSKA KISELINA

3.1. Biosinteza, kemijska i fizikalna svojstva

Tablica 1. Fizikalna i kemijska svojstva kinurenske kiseline. Preuzeto i prilagođeno sa Sigma-Aldrich. Kynurenic Acid. <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sigma/k3375>.

Fizičko stanje	Prah
Boja	Bež
Točka taljenja	275°C
Oksidirajuća svojstva	Nema oksidirajućih svojstava

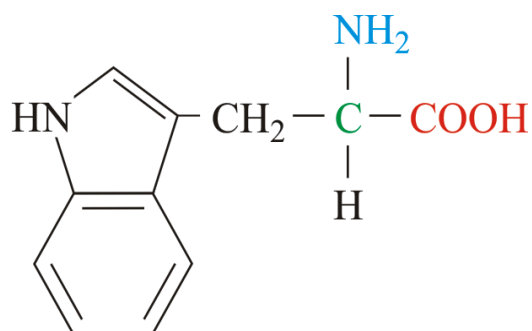
Kinurenska kiselina (4-hidroksikinolin-2-karboksilna kiselina) je produkt metabolizma triptofana, esencijalne aminokiseline koja ima sposobnost regulacije sinteze nekih hormona (sinteza melatonina) i održavanja ravnoteže hormona [14,15,16]. Spada u skupinu alkaloida, organskih spojeva koji sadrže dušik u svojoj strukturi [17,18]. Alkaloidi su poznata skupina spojeva koji utječu na stezanje krvnih žila i stimuliranje rada srca [18]. Kinurenska kiselina se unosi u organizam putem hrane, iako se manja količina može sintetizirati u crijevnom mikrobiomu. Njezina prisutnost je dokazana i u mnogim životinjskim organima i tkivima kao što su bubreg, jetra i mozak. Pronađena je u kvascu *Saccharomyces cerevisiae* (pekarski kvasac), međutim tu nema pokazatelja o postojanju analognog kinureninskog puta iz triptofana kojeg biljke provode [16,19]. Kod biljaka je dokazan utjecaj kinurenske kiseline na inhibiciju biosinteze auksina, regulatora biljnog rasta. Biosinteza auksina je ključna za razvoj biljke jer je njihovo djelovanje povezano s gotovo svim stadijima rasta (dioba stanica, diferencijacija, opadanje lišća, odumiranje biljnih organa,...) [16,20]. Sadržaj kinurenske kiseline u hrani je nizak i čini svega 1-3% dnevnog izlučivanja, uz iznimku meda kestena koji ima najveći udio kinurenske kiseline u usporedbi s drugim namirnicama. Sama kinurenska kiselina ima svojstvo dobre apsorpcije iz gastrointestinalnog trakta i izlučivanja putem mokraćnog sustava (uglavnom putem urina) [21]. Proučavanje uloge kinurenske kiseline u raznim patološkim stanjima omogućuje njeno posjedovanje definiranih molekularnih ciljeva [21]. U svojoj strukturi sadrži jednu hidroksilnu skupinu vezanu direktno na kinolinski prsten, a drugu u sastavu karboksilne skupine [22].



Slika 4. Kemijska struktura kinurenske kiseline. Preuzeto sa SciFinder Database.
<https://www.cas.org/>

3.2. Kinureninski put triptofana

Triptofan je esencijalna aromatska aminokiselina s ulogom izgradnje proteinskog lanca. Potrebna je za održavanje ravnoteže dušika kod odraslih osoba i za normalan rast dojenčadi. Važna je za produkciju melatonina, hormona koji doprinosi snu i serotonina, hormona koji igra važnu ulogu kod raspoloženja ljudi, a koji se kolokvijalno naziva “hormonom sreće” [10,23,24,25,26]. Kinureninski put triptofana po prvi put je istražen 1853. godine analizom izlučenih produkata životinja kojima je davana hrana bogata aminokiselinom triptofan. Otkrićem analognih kinureninskih puteva kod bakterijskih vrsta, aktivnost pojedinih enzima kinureninskog puta koji spadaju u grupu enzima kinurenin aminotransferaza mogla se izučavati na molekularnoj razini [15,24].



Slika 5. Strukturna formula triptofana. Preuzeto s Kemijskog rječnika. <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=triptofan>.

Kinureninski put započinje djelovanjem enzima triptofan-2,3-dioksigenaze (TDO) i indol-2,3-dioksigenaze (IDO). Triptofan-2,3-dioksigenaza i indol-2,3-dioksigenaza su jetreni enzimi, iako indol-2,3-dioksigenazu možemo pronaći i u drugim tkivima, stoga zaključujemo da je riječ o manje tkivno specifičnom enzimu od triptofan-2,3-dioksigenaze [15].

Istraživanja o prisutnosti kinurenske kiseline u urinu dovela su do spoznaje da se kinurenska kiselina može metabolizirati do kinaldinske kiseline. Godine 1955. pronađena je vrlo mala količina kinaldinske kiseline u količinama od 4,6-6,9 $\mu\text{mol/dan}$ u urinu čovjeka. Također je utvrđeno da se unosom aminokiseline triptofan količina kinaldinske kiseline u urinu znatno povećava. Kinaldinska kiselina potvrđena je i u urinu psa, isto tako nakon konzumacije hrane s povećanim udjelom triptofana. Osim urinom, ekskrecija kinurenske kiseline se može odvijati putem znoja i putem fecesa, ali u mnogo manjim koncentracijama. Može se apsorbirati iz gastrointestinalnog sustava, a neapsorbirana kinurenska kiselina se izlučuje fecesom van tijela [21].

Tablica 2. Količina izlučene kinurenske kiseline na dnevnoj bazi kod odrasle osobe. Preuzeto i prilagođeno iz M. Turska *et al. Nutrients* **14** (2022) 4182

Ekskrecija kinurenske kiseline		
	Minimum (mg/dan)	Maksimum (mg/dan)
Znoj	0,00069	0,00503
Urin	1,14	6,29
Feces	0,010	0,707

Ukupno	1,15	7,00
---------------	------	------

3.2.1. Biološka aktivnost i funkcije metabolita kinureninskog puta triptofana

Kinurenska kiselina utječe na razna stanja i veže se s mnogim bolestima jer inhibira proliferaciju T-stanica te smanjuje aktivnost dendritičnih stanica, što pojačava simptome kod određenih psihijatrijskih stanja [15]. Također, metabolizam aminokiseline triptofana sadrži poveznice s upalnim procesima i kardiovaskularnim oboljenjima. Metaboliti kinureninskog puta triptofana imaju negativan ili pozitivan biološki značaj za organizam (Tablica 2.) [15].

Visoki omjeri koncentracije triptofana i kinurenske kiseline povezani su s patološkim stanjima poput infekcija i bolestima poput koronarne bolesti uzrokovane začepljenjem koronarnih arterija, što ima za posljedicu nedovoljnu opskrbu srčanog mišića s kisikom [15,27]. Zanimljivo je da stanice crijeva u stanju raka proizvode veće količine kinurenske kiseline od normalnih stanica crijeva. Među svim metabolitima kinureninskog puta, kinurenska kiselina je metabolit koji je najviše privukao pažnju istraživača, uglavnom zbog svog antagonističkog djelovanja prema glutamatnim receptorima i humanim aril-ugljikovodičnim receptorima [15]. Kod ljudi se on proizvodi u glija stanicama čija je uloga održavanje neurona stvaranjem mijelinske ovojnice koja ih omata i ima ulogu električnog izolatora. Među glija stanice ubrajamo astrocite, oligodendrocite, mikroglija stanice i neuroglija stanice [15,28,29,30].

Tablica 3. Prikaz pozitivnih i negativnih učinaka metabolita kinureninskog puta na zdravlje
Preuzeto i prilagođeno iz I. Sadok i K. Jędruchiewicz, *Int. J. Mol. Sci.* **24** (2023) 163

Fiziološki odgovor	Metabolit kinureninskog puta
Vazodilatator u endotelnim stanicama	KYN
Transkripcijski faktor	KYN
Imunosupresivno sredstvo	CA, KYN
Regulator oksidativnog stresa	3HAA, 3HKyn, KYN
Antimikrobna svojstva	CA, PIC, KYN, KYNA

Antioksidativna svojstva	XA, AA, 3HKyn, KYNA
Smanjenje peroksidacije lipida	KYNA
Oksidativna svojstva	QA, 3HKyn
Poticaaj na grčenje	QA
Neuroprotektivna svojstva	KYNA
Neurotoksičnost	QA, 3HKyn
Antivirusna svojstva	PIC
Supresori grčenja	KYNA, PIC
Protuupalna svojstva	3HKyn, 3HAA

Tumač kratica metabolita kinureninskog puta: KYNA (kinurenska kiselina), PIC (pikolinska kiselina), KYN (kinurenin), CA (cinabarinska kiselina), 3HAA (3-hidroksiantranilna kiselina), 3HKyn (3-hidroksikinurenin), QA (kinolinska kiselina), XA (ksanturenska kiselina), AA (antranilna kiselina).

Kinolinska kiselina (QA) je neurotoksin koji nastaje u mozgu te ima potencijal neuroprotektivnog djelovanja pri niskim koncentracijama. Povećanje koncentracije kinolinske kiseline u organizmu dovodi do zasićenja kataboličkog sustava što rezultira stanjem toksikoze. Kinolinska kiselina u visokim koncentracijama aktivira NMDA receptore, čija nestabilnost može dovesti do neurodegenerativnih poremećaja poput Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti, Huntingtonove bolesti, epileptičkih napada i drugih psiho-fizičkih poremećaja [15].

Cinabarinska (CA) i ksanturenska kiselina (XA) reguliraju mGlu (metabotropni glutamatni receptori). Cinabarinska kiselina pokazuje dobra antimikrobna svojstva. Ljudi oboljeli od shizofrenije pokazuju smanjenu koncentraciju ksanturenske kiseline, koja ima anitoksidativna svojstva, u krvnom serumu [15,31].

3HKyn i 3HAA doprinose stvaranju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), što izaziva oksidativni stres u organizmu. Važni su donori elektrona, a pri visokim koncentracijama pridonose neurodegenerativnim poremećajima [15].

Jedan od zanimljivijih metabolita kinureninskog puta triptofana je antranilna kiselina (AA) postoji u tri forme (*orto*, *meta* i *para*). Kod pacijenata sa shizofrenijom, stvara zaštitu od

hidroksilnih radikala koji uzrokuju oksidativni stres. Djeluje kao kelirajući agens Cu^{2+} iona [15,32].

Pikolinska kiselina (PIC) zbog svojih antivirusnih i antitumorskih svojstava koristi se za proizvodnju anestetika i antiseptika. Djeluje kao kelirajući agens za bakar, željezo, cink i molibden [15].

KYNA se ističe neuroprotektivnim, antikolvuzijskim djelovanjem, protivnik je ionotropnih receptora glutamata što ima utjecaj na kardiovaskularni i imunološki sustav, a također djeluje i na adipocite koji imaju važnu ulogu u skladištenju energije u obliku masnih kiselina. Značajan je njezin utjecaj i na neuronske nikotinske acetilkolinске receptore, koji djeluju na endogeni acetilkolin tako što reguliraju otpuštanje ekscitatornih ili inhibitornih neurotransmitera [19,33].

Istraživanja o biološkom djelovanju kinurenske kiseline započela su kasnijih godina prošlog stoljeća. Predložene su razne hipoteze o molekularnim mjestima djelovanja kinurenske kiseline i otkrivene su mogućnosti utjecaja kinurenske kiseline na receptor hidroksikarboksilne kiseline 3 (HCAR3) i adrenoreceptor alfa 2B (ADRA2B) [21]. Gen *HCAR3* kodira protein koji sudjeluje u regulaciji negativne povratne sprege lipolize adipocita kako bi se suprotstavio utjecajima fiziološkog i patološkog uvećanja beta oksidacije. Osim toga, djeluje kao receptor za nikotinsku kiselinu [34]. Gen *ADRA2B* kodira transmembranski protein koji je srodan G proteinu s regulacijom oslobađanja neuroprijenosnika iz simpatičkih živaca [35]. Dokazan je i njen inhibicijski utjecaj u aktivnosti cAMP.[36].

Kinurenska kiselina je vrlo dobro ustanovljena kao kompetitivni antagonist glutamatnih receptora pri visokim koncentracijama [37]. Glutamatni receptori, obavljaju važnu ulogu u brzom ekscitacijskom sinaptičkom prijenosu unutar središnjeg živčanog sustava te reguliraju mnoge biološke radnje u mozgu, leđnoj moždini, mrežnici oka i perifernom živčanom sustavu [38].

Jedna od podjedinica jest GPR35, vezana za G-protein tipa A čija je aktivnost povezana s Na/K pumpom (regulator ionske ravnoteže u gotovo svim stanicama organizma koji održava elektrogena svojstva membrane stanice). Kod ljudi se pojavljuje u dvije varijante: GPR35a i GPR35b, a razlikuju se u duljini aminokiselinskog lanca - GPR35a sastoji se od 309 aminokiselinskih ostataka, a GPR35b od 340 aminokiselinskih ostataka. Kinurenska kiselina

aktivira GPR35 kao endogeni ligand, a osim kinurenske kiseline isto djelovanje na GPR35 ima lizofosfatidna kiselina [21,39].

Usprkos utjecaju na receptore, kinurenska kiselina djeluje i na središnji živčani sustav s afinitetom vezanja na receptor NR1, na koji se veže NR1 NMDAR s antidepressivnim učincima. Djelovanje kinurenske kiseline na više različitih receptora ukazuje na opasnost izazivanja poremećaja homeostaze pri značajnom povišenju, odnosno smanjenju koncentracije kinurenske kiseline. S obzirom na utjecaj na središnji živčani sustav, kinurenska kiselina posjeduje potencijal za prevenciju mogućih neuroloških i psiholoških poremećaja [38,40].

Dobrotvoran učinak kinurenske kiseline pokazao se u liječenju pacijenata s Huntingtonovom bolešću, izazvanom mutacijom u genu *HTT* koji kodira za protein huntingtin (HTT). Ispitivanja na ljudskim pacijentima ukazuju na povećanu koncentraciju indol-2,3-dioksigenaze i kinurenske kiseline. Povećane razine kinurenske kiseline rezultiraju smanjenjem korteksa i likvora, što je pokazatelj korisnosti primjene kinurenske kiseline kod oboljelih od Huntingtonove bolesti [38,41]. Ostale bolesti na koje kinurenska kiselina ima terapijski učinak su Parkinsonova bolest, Alzheimerova bolest, multipla skleroza, depresivni poremećaji i neke druge [38].

3.3. Zastupljenost kinurenske kiseline

3.3.1. Kinurenska kiselina u medu od kestena

Kinurenska kiselina je jedan od kemijskih markera botaničkog podrijetla meda od kestena zbog njegovog visokog sadržaja u istom. Kinurenska kiselina je identificirana kao marker botaničkog podrijetla *Castanea sativa* Mill., *Castanea* spp., *Castanea crenata* Sieb meda od kestena, te medljikovcu *Salix* spp. [42]. Za dokazivanje prisustva kemijskih markera u medu od kestena, analizirani su uzorci nektara. Među spojevima poput estera i terpena, istakli su se 4-kinolin-2-karboksilna kiselina i kinurenska kiselina. Od velike su važnosti jer nisu detektirani u niti jednoj drugoj skupini monoflornih medova, a ostali markeri poput estera, terpena i drugih organskih spojeva sadrže i razni drugi medovi [43].

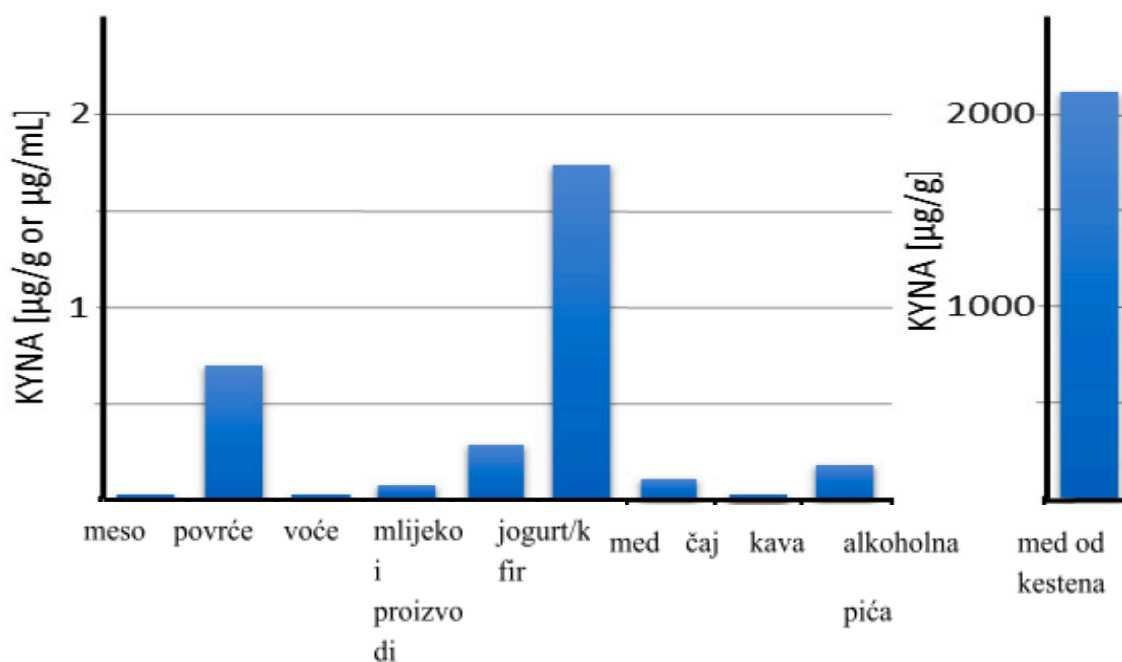
Zbog visoke razine kinurenske kiseline i aminokiseline prolina, u medu kestena dolazi do sinteze dodatne kinurenske kiseline u vidu derivata poput 3-pirolidin kinurenske kiseline i njezinog γ -laktona. Potencijalno ljekovito djelovanje derivata kinurenske kiseline u vidu 3-pirolidin kinurenske kiseline i γ -laktona nije detaljno razrađeno te je i dalje slabo poznato [9].

3.4. Zastupljenost kinurenske kiseline u ostaloj hrani i drugim pčelinjim proizvodima

Ispitivanjem različitih uzoraka pčelinjih proizvoda i drugih namirnica kod kojih je utvrđena prisutnost kinurenske kiseline, pčelinji proizvodi kao što su propolis, med i polen su se istakli po najvećem udjelu kinurenske kiseline naspram ostalih uzoraka. Istraživanja su pokazala i da termička obrada hrane smanjuje koncentraciju kinurenske kiseline, primjerice pola sata kuhanja mrkve, brokule i cvjetače dovelo je do smanjenje koncentracije za 63%, 19% i 12% [9,19]. Među metodama koje se upotrebljavaju za određivanje proteinskih, organskih i drugih komponenti istakla se kromatografija, pa tako za određivanje sadržaja kinurenske kiseline u hrani analitičari su posegnuli za upravo tom analitičkom metodom određivanja [16]. Propolis se posebno istaknuo među pčelinjim proizvodima kada je u pitanju kinurenska kiselina sadržavajući čak 8,6 nmol/g, a visoke količine kinurenske kiseline utvrđene su i u multiflornom medu (4,6 nmol/g) i polenu (3,4 nmol/g) [19].

Tablica 4. Količina kinurenske kiseline u pčelinjim proizvodima i ostaloj hrani. Preuzeto i prilagođeno iz M. Turska *et al. Nutrients* **14** (2022), 4182 [19]

Pčelinji proizvodi/ostala hrana	Kinurenska kiselina (pmol/g)
Propolis	8572,8
Polen	3415,2
Multiflorni med	4642
Heljdin med	958,6
Krumpir	688,3
Luk	120,8
Mlijeko	92,1
Jogurt	90,1
Kefir	56,8
Brašno	44,3
Riža	29,8
Mrkva	38,6
Rajčica	31,1
Jaje	23,9
Svinjsko meso	19,4
Svinjska jetra	48,3
Riba	7,5
Ječam	51,8
Kukuruz	84,7
Suncokretovo ulje	14,3
Tvrđi sir	44,4
Ulje repice	10,9
Grašak	46,7
Majčino (ljudsko) mlijeko	136,0



Slika 6. Grafički prikaz sadržaja kinurenske kiseline u različitim ispitivanim uzorcima hrane. Preuzeto i prilagođeno iz M. Turska *et. al. Nutrients*. **14** (2022) 4182

Prema podacima prikazanim u tablici propolis kao prehrambena namirnica i pčelinji proizvod dominira u sadržaju kinurenske kiseline, a heljdin med, multiflorni med i ostale namirnice poput krumpira i luka također se ističu visokim sadržajem. Vidljivo je kako majčino mlijeko ima znatnu količinu kinurenske kiseline, što dodatno objašnjava njegove blagotvorne i preventivne učinke prema određenim genetičkim i neurološkim poremećajima.

Pavlin i suradnici (2023.) su u svom radu razvili i primjenili brzu i jednostavnu HPLC-MS/MS metodu za određivanje kinurenske kiseline u 7 različitih vrsta meda i odredili najveću koncentraciju u medu od kestena (682 mg/g) u usporedbi s ostalim istraživanim vrstama meda [44].

Povrće sadrži oveću količinu kinurenske kiseline, uz napomenu da to ovisi o pojedinim sortama [14,21]. Usporedbom dvije sorte krumpira (žute i ljubičaste) Ismena (0,226 µg/g mokre mase) i Provita (0,683 µg/g mokre mase) uočena je tri puta veća razlika u sadržaju kinurenske kiseline. Sadržaj kinurenske kiseline u biljnim sortama ovisi i o tlu na kojima su

uzgajane, budući da nema svako tlo jednaku količinu kinurenske kiseline u sebi. Tlo siromašno kinurenskom kiselinom može se oplemeniti gnojidbom ovisno koliki sadržaj kiseline želimo u plodovima[21]. Što se tiče voća, jedino voće koje je bilo ispitivano na sadržaj kinurenske kiseline je jabuka s 0,0023 $\mu\text{g/g}$ mokre mase [21].

Fermentirani proizvodi sadrže značajan udio kinurenske kiseline. Alkoholna pića poput piva i vina mogu sadržavati različite udjele kinurenske kiseline što upućuje da bi mikroorganizmi koji su odgovorni za procese fermentacije koji se odvijaju u takvim pićima mogli biti odgovorni za njezino prisustvo [21].

Visok udio kinurenske kiseline utvrđen je u ljekovitom i začinskom bilju poput bosiljka, metvice, koprive, breze, metvice i majčine dušice. Treba pak obratiti pažnju na komercijalno sušenje začinskog i ljekovitog bilja, jer sama obrada bilja na suhom zraku i pri visokim temperaturama dovodi do varijacija u udjelu kinurenske kiseline u usporedbi sa svježim biljkama [21].

Osim u komercijalnoj hrani, kao što je već spomenuto, kinurenska kiselina je pronađena u majčinom mlijeku, uz zanimljivost da se sadržaj kinurenske kiseline povećava u majčinom mlijeku 14 puta tijekom dojenja djeteta, s početnim sadržajem od 0,004 $\mu\text{g/ml}$ [21].

Hrana za životinje varira u sadržaju kinurenske kiseline. Ispitivanja su provedena na hrani za kućne ljubimce (za mačke, pse i akvarijske ribe) i na hrani za stočni uzgoj životinja. Pokazalo se da hrana za stoku ima visok sadržaj kinurenske kiseline - od 0,198 $\mu\text{g/g}$ do 0,414 $\mu\text{g/g}$ svježe mase [21].

4. METODE IZOLACIJE I ANALIZE KINURENSKE KISELINE

Među brzim metodama kojima detektiramo kinurensku kiselinu zbog njene metaboličke važnosti ističe se HPLC-MS/MS (High performance liquid chromatography - mass spectrometry) postupak. Prednost HPLC-MS/MS metode je brza analiza bez posebnih obrada uzorka u vidu ekstrakcije. Istraživanje je provedeno na različitim uzorcima meda uključujući i med kestena koji se, kao što je već rečeno, ističe po visokom sadržaju kinurenske kiseline [44].



Slika 7. HPLC-MS sustav za analizu. Preuzeto s Biodiscovery Institute. <https://bdi.unt.edu/bioanalytical-facility/about/instrumentation>.

Metode koje su danas razvijene zahtijevaju prethodnu obradu uzorka za analizu u svrhu čišćenja potencijalnih interferencija pomoću raznih tehnika kao što su centrifugiranje, homogenizacija te različith vrsta ekstrakcija [44]. Primjerice, za određivanje sadržaja kinurenske kiseline u prehrambenim namirnicama kao što su krumpir i brašno potrebno je upotrijebiti centrifugiranje i homogenizaciju kako bi se uklonile nečistoće koje nastaju pri berbi krumpira, odnosno mljevenju i obradi brašna [44]. Nakon obrade kinurenska kiselina je izolirana iz supernatanta metodom ekstrakcije kao što je SPE metoda (Solid Phase Extraction) uz pomoć kationske izmjenjivačke smole. Idenična metoda se koristi za određivanje kinurenske kiseline u medu kestena i ostalim vrstama meda [44].

Kinurenska kiselina je također analizirana, primjenom direktnog fluorimetrijskog mjerenja. Tehnike NMR (Nuclear Magnetic Resonance) i tandemске masene spektrometrije su u manjoj uporabi za njeno određivanje [45].

Studija provedena na Sveučilištu u Ljubljani potvrdila je slabu topljivost kinurenske kiseline u acetonitrilu kao nepolarnom otapalu i alkoholu metanolu. Najbolje otapalo potvrđeno testiranjima je 0,1% otopina amonijaka. Riječ je o lužnatom otapalu koje dobro otapa i povećava stabilnost kinurenske kiseline [44].

5. ZAKLJUČAK

Pregledom literature može se zaključiti da se pčelinji proizvodi kao što su propolis, med i polen ističu najvećem udjelu kinurenske kiseline naspram ostalih prehrambenih proizvoda (npr. brokula, svinjsko meso,...).

U istraživanju sadržaja kinurenske kiseline u 7 različitih vrsta meda, najveća koncentracija je određena u medu od kestena (682 mg/g).

Kinurenska kiselina je jedan od kemijskih markera botaničkog podrijetlameda od kestena zbog njegovog visokog sadržaja.

Kinurenska kiselina je identificirana kao marker botaničkog podrijetla *Castanea sativa*, *Castanea spp*, *Castanea crenata* Sieb meda od kestena.

S obzirom na utjecaj na središnji živčani sustav, kinurenska kiselina posjeduje potencijal za prevenciju mogućih neuroloških i psiholoških poremećaja.

Literatura:

1. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Med. <https://www.enciklopedija.hr/clanak/med>. (pristupljeno 11. 08. 2024).
2. B. Olas: Honey and Its Phenolic Compounds as an Effective Natural Medicine for Cardiovascular Diseases in Humans? *Nutrients* **12** (2020) 283
3. M. I. Khalil, S. A. Sulaiman, L. Boukraa: Antioxidant Properties of Honey and Its Role in Preventing Health Disorder. *The Open Nutraceuticals Journal* **3** (2016), 6-16
4. Narodne novine. Pravilnik o medu. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2015_05_53_1029.html. (pristupljeno 15. 09. 2024.)
5. Narodne novine. Pravilnik o kakvoći meda i drugih pčelinjih proizvoda. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2000_02_20_280.html (pristupljeno 15. 09. 2024.)
6. K. Selvaraju, P. Vikram, J. Mei Soon, K. Thevan Krishnan, A. Mohammed: Melissopalynological, physicochemical and antioxidant properties of honey from West Coast of Malaysia. *J. Food Sci. Technol.* **56** (2019) 2508-2521
7. V. Horčinová Sedláčková, O. Grygorieva, Katarína Fatrcová Šramková, O. Shepelova, I. Goncharovska, Erika Mňahončáková: The chemical composition of pollen, staminate catkins, and honey of *Castanea sativa* Mill. *Potr. S. J. F. Sci.* **15** (2021) 433-444
8. O. Tesfaye, A. Desalegn, D. Muleta: Melissopalynological analysis and microbiological safety of fresh and market honey (*Apis mellifera* L. and *Meliponulabeccarii* L.) from Western Oromia, Ethiopia. *Heliyon* **10** (2024) e28185
9. J. Božič, J. Bertoncej, D. Drobne, G. Glavan, N. Gunde Cimerman, A. Leonardi, R. Kopinč, A. Jemec Kokalj, S. Novak, M. Korošec, I. Križaj, B. Podrižnik, M. Turk, A. Zabret: The quality of Slovenian chestnut honey and its specific properties relevant for medical application and functional nutrition. *ABS* **63** (2020) 31-44.
10. L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb 1991.

11. Science Direct. Glucose Oxidase. <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/glucose-oxidase> (pristupljeno 11. 08. 2024.).
12. N. Mayda, A. Özkök, K. Sorkun: Some Characteristic Properties of Chestnut and Rhododendron Honeys in Turkey. *J. Biol. & Chem.* **46** (2018) 135-145
13. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Amilaza. <https://www.enciklopedija.hr/clanak/amilaza> (pristupljeno 11. 08. 2024)
14. M. P. Turski, S. Chwil, M. Turska, M. Chwil, T. Kocki, G. Rajtar, J. Parada-Turska: An exceptionally high content of kynurenic acid in chestnut honey and flowers of chestnut tree. *J. Food Compos. Anal.* **48** (2016) 67-72
15. I. Sadok, K. Jędruchniewicz: Dietary Kynurenine Pathway Metabolites - Source, Fate, and Chromatographic Determinations. *Int. J. Mol. Sci.* **24** (2023) 16304
16. M. Wróbel-Kwiatkowska, W. Turski, G. Silska, M. Rakicka-Pustułka, L. Dymińska, W. Rymowicz: Determination of Bioactive Compound Kynurenic Acid in *Linum usitatissimum* L. *Molecules* **29** (2024) 1702.
17. G. Vistoli, E. Caneva, C. Anselmi, R. Maffei Facino: Structure elucidation and NMR assignments of two new pirrolidinyll quinoline alkaloids from chestnut honey. *Magn. Reson. Chem.* **47** (2009) 456-459
18. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Alkaloidi. <https://www.enciklopedija.hr/clanak/alkaloidi>. (pristupljeno 15. 09. 2024.)
19. M. P. Turski, M. Turska, W. Zgrajka, D. Kuc, W. A. Turski: Presence of kynurenic acid in food and honeybee products. *Amino Acids* **36** (2009) 75-80
20. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Auksini. <https://www.enciklopedija.hr/clanak/auksini> (pristupljeno 11. 08. 2024.)
21. M. Turska, P. Paluszkiwicz, W. A. Turski, J. Parada-Turska: A Review of the Health Benefits of Food Enriched with Kynurenic Acid. *Nutrients* **14** (2022) 4182.
22. Britannica. Hydroxyl group. <https://www.britannica.com/science/hydroxyl-group> (pristupljeno 11. 08. 2024.)

23. Science Direct. Tryptophan. <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/tryptophan> (pristupljeno 11. 08. 2024.).
24. I. Davis, A. Liu: What is the tryptophan kynurenine pathway and why is it important to neurotherapeutics? *Expert Rev Neurother* **15** (2015) 719-721
25. Medline Plus. Tryptophan. <https://medlineplus.gov/ency/article/002332.htm> (pristupljeno 11. 08. 2024.).
26. D. Dfarhud, M. Malmir, M. Khanahmadi: Happiness & Health: The Biological Factors- Systematic Review Article. *Iran J Public Health* **43** (2014) 1468-1477.
27. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Koronarna bolest srca. <https://www.enciklopedija.hr/clanak/koronarna-bolest-srca> (pristupljeno 11. 08. 2024.)
28. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Mijelin. <https://www.enciklopedija.hr/clanak/mijelin> (pristupljeno 11. 08. 2024.)
29. Physiopedia. Glial Cells. https://www.physio-pedia.com/Glial_Cells (pristupljeno 11. 08. 2024.)
30. National Cancer Institute. Glial cell. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/glial-cell> (pristupljeno 11. 08. 2024.)
31. S. Sinha Dutta. Medical News. What are NMDA Receptors? <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-are-NMDA-Receptors.aspx> (pristupljeno 11. 08. 2024.)
32. Proleksis enciklopedija. Aminobenzojeva kiselina. <https://proleksis.lzmk.hr/7269/> (pristupljeno 11. 08. 2024.).
33. M. Zoli, S. Pucci, A. Vilella, C. Gotti: Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Curr Neuropharmacol* **16** (2018) 338-349

34. Gene Cards: The Human Gene Database. HCAR3 Gene – Hydroxycarboxylic Acid Receptor 3. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HCAR3> (pristupljeno 11. 08. 2024.)
35. Gene Cards: The Human Gene Database. ADRA2B Gene – Adrenoceptor Alpha 2B. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ADRA2B&keywords=ADRA2B> (pristupljeno 11. 08. 2024.)
36. D. Cussac, S. Schaak, C. Gales, C. Flordellis, C. Denis, H. Paris H: alpha(2B)-Adrenergic receptors activate MAPK and modulate proliferation of primary cultured proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* **282** (2002) 943-952.
37. R. Schwarcz, T. W. Stone: The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises. *Neuropharmacology* **112** (2017) 237–247.
38. F. Tóth, E. K. Cseh, L. Vécsei: Natural Molecules and Neuroprotection: Kynurenic Acid, Pantethine and α -Lipoic Acid. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (2021) 403
39. Y. Pirahanchi, R. Jessu, N. R. Aeddula/National Library of Medicine. Physiology, Sodium Potassium Pump. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537088/> (pristupljeno 11. 08. 2024.)
40. F. Tóth, E. K. Cseh, L. Vécsei: Natural Molecules and Neuroprotection: Kynurenic Acid, Pantethine and α -Lipoic Acid. *Int J Mol Sci.* **22** (2021) 403.
41. Medline Plus. HTT gene. <https://medlineplus.gov/genetics/gene/htt/> (pristupljeno 11. 08. 2024.)
42. M. Kranjac, *Bioorgansko istraživanje kemijskih profila i markera odabranih vrsta meda*, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2018.
43. P. Truchado, I. Martos, L. Bortolotti, A. G. Sabattini, F. Ferreres, F. A. Tomas-Barberan: Use of Quinoline Alkaloids as Markers of the Floral Origin of Chestnut Honey. *J. Agric. Food Chem.* **57** (2009) 5680-5686
44. A. Pavlin, M. Pompe, D. Kočar: Direct Determination of Kynurenic Acid with HPLC-MS/MS Method in Honey. *Acta Chim. Slov.* **70** (2023) 274-280

45. M. E. Soto, A. M. Ares, J. Bernal, M. J. Nazal, J. L. Bernal: Simultaneous determination of tryptophan, kynurenine, kynurenic acid and xanthurenic acids in honey by liquid chromatography with diode array, fluorescence and tandem mass spectrometry detection, *J. Chromatogr. A* **442** (2011) 7592-7600