Hepatoprotektivni učinak polifenola iz ekstrakta trnine na antioksidacijski status u miša

Paradžik, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:490655

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2016.

Ivona Paradžik

712/N

HEPATOPROTEKTIVNI UČINAK POLIFENOLA IZ EKSTRAKTA TRNINE NA ANTIOKSIDACIJSKI STATUS U MIŠA

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

Rad je izrađen je u Laboratoriju za kemiju i biokemiju hrane Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Irena Landeka Jurčević, izv. prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Prvenstveno bih se htjela zahvaliti svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ireni Landeka Jurčević, na ukazanoj prilici i povjerenju koje je rezultiralo izradom ovog diplomskog rada. Hvala na svoj pruženoj pomoći, osobito tijekom eksperimentalnog dijela kada se trema javila i ruke zakazale. Veliko hvala na srdačnosti, utjehi, mnogobrojnim savjetima i znanju koje je uspješno dijelila sa mnom i bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć. Hvala na utrošenom vremenu tijekom izvedbe istraživanja, obrađivanja rezultata, objašnjavanju svih nejasnoća i rješavanju poteškoća. Naposljetku, hvala na osjećaju sigurnosti, uspješnosti te na nezaboravnom iskustvu, što poslovnom, što životnom.

Također bih zahvalila i izv. prof. dr. sc. Domagoju Đikiću na pruženoj pomoći i savjetima tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada u Laboratoriju za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta.

Na kraju bih se htjela zahvaliti svojim roditeljima i sestri koji su mi nesebično pomagali tijekom cijelog studija te ujedno bili najveća potpora. Također bih se htjela zahvaliti i svim svojim prijateljima koji su sa mnom dijelili svaki uspjeh, svaki pad i uvijek bili uz mene. Članovi PBF familije, hvala što ste mi studiranje na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu učinili zabavnim, manje stresnim, nezaboravnim i neprocjenjivim.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za poznavanje i kontrolu sirovina i prehrambenih proizvoda
Laboratorij za kemiju i biokemiju hrane
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

HEPATOPROTEKTIVNI UČINAK POLIFENOLA IZ EKSTRAKTA TRNINE NA ANTIOKSIDACIJSKI STATUS U MIŠA

Ivona Paradžik, 712/N

SAŽETAK: Cilj ovog rada bio je ispitati antioksidativni utjecaj polifenola ekstrakta cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) i visoko-proteinske dijete (whey protein) na markere oksidacijskog stresa u jetri C57BL6 miša. Ispitivanje je provedeno kroz 30 dana, pri čemu su životinje bile podijeljene u 4 grupe, ovisno o vrsti tretmana: 1. grupa- kontrolna, 2. grupa- TC (tretirane ekstraktom cvijeta trnine), 3. grupa- WP (tretirane whey proteinom), 4. grupa- WP+TC. Karbonilirani proteini (PC), reducirani glutation (GSH), malondialdehid (MDA), superoksid dismutaza (SOD) te katalaza (CAT) su biomarkeri oksidacijskog stresa praćeni u ovom istraživanju. U odnosu na kontrolnu skupinu životinja, tretman s TC statistički je značajno (ANOVA, $p<0,05$) smanjio aktivnosti MDA i PC u jetri miša. Takav rezultat pripisuje se prisutnim polifenolima u ekstraktu cvijeta trnine. U odnosu na kontrolnu skupinu životinja, koncentracije SOD, GSH i CAT su u svim grupama životinja statistički značajno (ANOVA, $p<0,05$) povećane, što znači da se oksidacijski stres smanjio. Takav rezultat posljedica je antioksidacijskog učinka i ekstrakta trnine i whey proteina. Istraživanjem se utvrdilo da ekstrakt cvijeta trnine sadrži mnogo bioaktivnih spojeva koji, u kombinaciji sa primjenom visoko-proteinske dijete (whey protein), imaju povoljan utjecaj na smanjenje oksidacijskog stresa i povećanje aktivnosti endogenih antioksidacijskih enzima.

Ključne riječi: ekstrakt cvijeta trnine, lipidna peroksidacija, superoksid dismutaza, reducirani glutation
Rad sadrži: 51 stranica, 12 slika, 4 tablice, 96 reference
Jezik izvornika: hrvatski
Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb
Mentor: Izv. prof. dr. sc. Irena Landeka Jurčević
Pomoć pri izradi: Izv. prof. dr. sc. *Domagoj Đikić*
Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:
1. Izv. prof. dr. sc. *Ivana Kmetič*
2. Izv. prof. dr. sc. *Irena Landeka Jurčević*
3. Izv. prof. dr. sc. *Domagoj Đikić,* Prirodoslovno-matematički fakultet (PMF), Zagreb
4. Doc. dr. sc. *Danijela Bursać Kovačević*, (zamjena)

Datum obrane: 27. rujan 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Quality Control
Laboratory for Food Chemistry and Biochemistry
Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF POLYPHENOLS PRESENT IN BLACKTHORN EXTRACT ON ANTIOXIDATIVE STATUS IN MICE

Ivona Paradžik, 712/N

ABSTRACT: The aim of this study was to examine antioxidant effect of polyphenols from blackthorn (*Prunus spinosa* L.) extract and high-protein (whey protein) diet on markers of oxidative stress in the liver of C57BL6 mice. Testing obtained for 30 days and the animals were divided into 4 groups, depending on the type of treatment: group 1- control, group 2- TC (treated with blackthorn flower extract), group 3- WP (treated with whey protein) and group 4 - WP+TC. Carbonylated proteins (PC), reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were biomarkers of oxidative stress monitored in this study. Compared to the control group of animals, treatment with TC statistically significant (ANOVA, $p<0,05$) reduced the activity od MDA and PC in the liver of mice. The result is attributed to the polyphenols present in the extract of a blackthorn flower. Compared to the control group of animals, concentrations of SOD, CAT and GSH in all groups of animals were statistically significant (ANOVA, $p<0,05$) increased, which means that oxidative stress and it's damage has been reduced. This study found that blackthorn flower extract has many bioactive compounds, which in combination with using high-protein diet (whey protein) have positive effect in reducing oxidative stress and increasing the activity of endogenous antioxidant enzymes.

Key words: blackthorn flower extract, lipid peroxidation, superoxide dismutase, reduced glutathione
Thesis contains: 51 pages, 12 figures, 4 tables, 96 references
Original in: Croatian
Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology
Mentor: PhD. Irena Landeka Jurčević, Associate professor
Technical support and assistance: PhD. *Domagoj Đikić*, Associate professor
Reviewers:
1. PhD. *Ivana Kmetič,* Associate professor
2. PhD. *Irena Landeka Jurčević,* Associate professor
3. PhD. *Domagoj Đikić,* Associate professor, PMF, Zagreb
4. PhD. *Danijela Bursać Kovačević,* Assistant professor (substitute)

Thesis defended: September 27th 2016**.**

SADRŽAJ

1. UVOD **1**

2. TEORIJSKI DIO **2**
2.1. BOTANIČKI PODACI - TRNINA (*Prunus spinosa* L.) 2
2.2. BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI U CVIJETU TRNINE 3
2.2.1. Flavonoidi 4
2.3. OKSIDACIJSKI STRES I ANTIOKSIDANSI 5
2.3.1. Oksidacijski stres 5
2.3.2. Slobodni radikali 6
2.3.3. Antioksidansi i njihove funkcije 8
2.3.4. Lipidna peroksidacija 12
2.4. VISOKO-PROTEINSKA DIJETA 13
2.4.1. Proteini sirutke 13
2.5. JETRA 15
2.5.1. Funkcije jetre 16

3. EKSPERIMENTALNI DIO **18**
3.1. KEMIKALIJE 18
3.2. SASTAV WHEY PROTEINA 18
3.3. POKUSNE ŽIVOTINJE 19
3.3.1. Eksperimentalne grupe životinja 20
3.3.2. Priprema tkiva (jetra) za određivanje antioksidacijskih enzima 20
3.4. MJERENJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE (MDA) 21
3.5. AKTIVNOST KATALAZE (CAT) 22
3.6. AKTIVNOST REDUCIRANOG GLUTATIONA (GSH) 23
3.7. AKTIVNOST SUPEROKSID DISMUTAZE (SOD) 23
3.8. AKTIVNOST KARBONIL PROTEINA (PC) 24
3.9. ODREĐIVANJE PROTEINA METODOM PO LOWRYJU 25
3.10. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA 25

4. REZULTATI I RASPRAVA **27**
4.1 UTJECAJ POLIFENOLA IZ EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE I VISOKO-PROTEINSKE DIJETE NA KARBONILIRANE PROTEINE (PC) U HOMOGENATU TKIVA JETRE U C57BL6 MIŠA 28
4.2. HEPATOPROTEKTIVNI UČINAK BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE I VISOKO-PROTEINSKE DIJETE NA PARAMETRE OKSIDACIJSKOG STRESA U C57BL6 MIŠA 30
4.2.1. Utjecaj polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine i whey proteina na aktivnost GSH enzima u homogenatu tkiva jetre u miša 30
4.2.2. Utjecaj polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine i whey proteina na aktivnost SOD enzima u homogenatu tkiva jetre u miša 31
4.2.3. Utjecaj polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine i whey proteina na aktivnost CAT enzima u homogenatu tkiva jetre u miša 32
4.3. UTJECAJ POLIFENOLA IZ EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE I VISOKO-PROTEINSKE DIJETE NA LIPIDNU PEROKSIDACIJU U HOMOGENATU TKIVA JETRE U C57BL6 MIŠA 39
4.4. UTJECAJ POLIFENOLA IZ EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA AKTIVNOST OKSIDACIJSKIH ENZIMA GLAVNIH FAKTORA RIZIKA OD KARDIOVASKULARNIH BOLESTI (KVB) 42

5. ZAKLJUČCI **44**
6. LITERATURA **45**

1. UVOD

Trnina (*Prunus spinosa* L.) samonikla je biljka koja raste u gotovo svim dijelovima Europe. Narodna medicina odavno poznaje ljekovitost trnine, iako je u današnje vrijeme njezina upotreba zapostavljena. Cvijet trnine sadrži polifenolne spojeve kao što su rutin, kamferol i kvercetin za koje je poznato da imaju izrazito antioksidacijsko djelovanje te blagotvorni učinak na zdravlje, kako ljudi, tako i životinja. Antioksidacijska svojstva polifenolnih spojeva pripisuju se njihovom redoks svojstvu koje im omogućava da djeluju kao reducirajuće sredstvo, tj. kao donori vodika i hvatači kisika. Na taj način hvataju slobodne radikale i sprječavaju daljnju lančanu reakciju odnosno sprječavaju pojavu oksidacijskog stresa.

Oksidacijski stres nastaje kao posljedica promjene ravnoteže između stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) i antioksidacijske obrane organizma, a povezan je s mnogobrojim oštećenjima staničnih molekula, kao što su proteini, lipidi i nukleinske kiseline. Danas postoji više od pedeset raznih bolesti čiji se patofiziološki mehanizmi, uz ostalo, povezuju sa slobodnim radikalima i oksidacijskim stresom, a to su bolesti krvožilnog sustava, ateroskleroza, hipertenzija, katarakta, tumori, heredodegenerativne bolesti, reumatoidni artritis, vaskulitisi i moždani udar. Oksidacijski stres se u stanicama određuje mjerenjem aktivnosti i koncentracije antioksidacijskih enzima (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza) i koncentracije malondialdehida i karboniliranih proteina. Navedeni antioksidacijski enzimi predstavljaju zaštitne mehanizme uklanjanja reaktivnih kisikovih vrsta.

Smatra se da preporučeni dnevni unos proteina (0,8 g proteina po kilogramu tjelesne mase čovjeka), što čini 10-15 % preporučenog dnevnog unosa energije, ne može imati štetan utjecaj na zdravlje čovjeka. Prehrana u kojoj dnevni unos proteina iznosi 2-3 g po kilogramu tjelesne mase čovjeka naziva se visoko-proteinska prehrana ili dijeta te se pretpostavlja da takav visoki unos proteina može negativno utjecati na zdravlje, osobito na zdravlje jetre.

Cilj ovog rada bio je ispitati antioksidacijski utjecaj polifenola ekstrakta cvijeta trnine (*Prunus spinosa L.*) i visoko-proteinske dijete (whey protein) na markere oksidacijskog stresa u jetri C57BL6 miša.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BOTANIČKI PODACI O TRNINI (*Prunus spinosa* L.)

Trnina ili crni trn, ponekad i nazivana trnula, trnavka, trnjina, trn, crni trn ili divlja šljiva je vrsta roda šljiva (*Prunus)* porodice ruža *(Rosaceae).* Porijeklom je iz Europe i zapadne Azije, no može rasti i u sjeverozapadnoj Africi, istočnoj strani Sjeverne Amerike te je pronađena i na Novom Zelandu. Trnina raste kao veliki listopadni grm ili manje drvo koje može biti visoko od jednog do pet metara. Svijetlozeleni listovi trnine dugački su između 2 i 5 centimetara, jajolikog su oblika i oštro nazubljenog ruba, a nalaze se na kratkim peteljkama. Još prije listanja, tijekom ožujka i travnja, trnina cvate mnogobrojnim sitnim cvjetovima s pet bijelih latica i mnogo žutih prašnika. Cvjetovi trnine su ugodna i blaga mirisa na gorki badem. Mnogobrojni cvjetovi se najčešće javljaju na grančicama pojedinačno, rjeđe po 2-3 zajedno te prekrivaju gotovo cijeli grm (slika 1).



Slika 1. Cvijet trnine (Anonymus 1, 2016)

Cvjetovi u obliku čaja su dobri protiv kašlja, bolesti organa za disanje i bolesti pluća te služe kao sredstvo za laki otvor i čišćenje krvi (Gelenčir, 1989). Također, cvjetovi trnine se koriste kao sredstvo koje umiruje, jača želudac te uklanja grčeve (Gelenčir i Gelenčir, 1991). Trnina se koristi u fitoterapiji za liječenje različitih vrsta kašlja (bilo suhog, bilo mokrog) te ima blago laksativno i diuretučko djelovanje (Veličković i sur., 2014). Također, trnina ima antiseptičko djelovanje (zahvaljujući sadržaju tanina) te pokazuje zaštitni učinak protiv upale

mukozne sluznice probavnog sustava (Borkowski i sur., 1994). Osim primjene u fitoterapiji, trnina se također koristi u prehrambenoj industriji za proizvodnju džemova i različitih napitaka kao što su likeri, vino, sokovi, kompoti i čaj (Veličković i sur., 2014). Unatoč tome što je trnina veoma raširena u Španjolskoj, njena etnobotanička upotreba je najpoznatija u Navarri, gdje se infuzije njenih grana koriste u liječenju hipertenzije (Calvo i Cavero, 2014), a macerirani plodovi za liječenje gastrointenstinalnih poremećaja te u proizvodnji tipa rakije pod nazivom "pacharan" (Calvo i sur., 2013).

Tablica 1. Klasifikacija Trnine (Anonymus 2, 2014)

Taksonomija trnine	
Carstvo	Plantae
Divizija	Magnoliophyta
Razred	Magnoliopsida
Nadred	Rosanae
Red	Rosales
Porodica	Rosaceae
Potporodica	Prunoideae
Rod	Prunus
Vrsta	Prunus spinosa

2.2. BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI U CVIJETU TRNINE

Iz cvjetova trnine izolirani su slijedeći flavonoidi: kampferol, kvercetin, kampferol 3-*O*-α-L-arabinofuranozid, kvercetin-3-*O*-α-D-ksilopiranozid, kampferol 3-*O*-α-arabinofuranozid-7-*O*-α-ramnopiranozid, tanin, organske kiseline (svega 2%) te voda (Burits i Bučar, 2000). Osim flavonoida, u cvjetovima trnine prisutni su i A-tip proantocijanidina (Kolodziej i sur., 1991), vitamin C i fenolne kiseline (Olszewska i Wolbis, 2000).

Polifenoli, kao sekundarni biljni metaboliti, čine raznoliku skupinu kemijskih spojeva koje možemo na temelju njihove strukture i sličnih kemijskih svojstava svrstati u nekoliko definiranih grupa. Zajedničko svojstvo svim polifenolima je njihova topljivost u vodi i

staničnom soku, a međusobno se razlikuju po kemijskoj strukturi i svojstvima (Pandey i Rizvi, 2009a).

Rezultati brojnih studija pokazali su kako konzumacija resveratrola tj. prehrana bogata ovim polifenolnim spojem ima zaštitni učinak na kardiovaskularne bolesti u ljudi (Orallo i sur., 2002; Das i Maulik, 2006). Mehanizmi zaštitnog djelovanja polifenola su smanjenje agregacije trombocita, proširenje krvnih žila, smanjenje lipidne peroksidacije te poboljšanje serumskog profila kolesterola (Baur i Sinclair, 2006). Njihov blagotvorni učinak na organizam proizlazi iz sposobnosti vezanja slobodnih radikala (antioksidacijsko djelovanje), sposobnosti keliranja metala (vezanje dvovalentnih kationa) te inaktivacije određenih enzima zbog čega im se pripisuju antibakterijska, antikancerogena, antialergijska i protuupalna svojstva (Valls i sur., 2009).

2.2.1. Flavonoidi

Flavonoidi su polifenolni spojevi koji obuhvaćaju petnaest ugljikovih atoma, raspoređenih unutar dva aromatska prstena povezana s piranskim prstenom. Nalaze se u mnogim biljkama gdje su koncentrirani u sjemenkama, koži ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću (Kazazić, 2004).

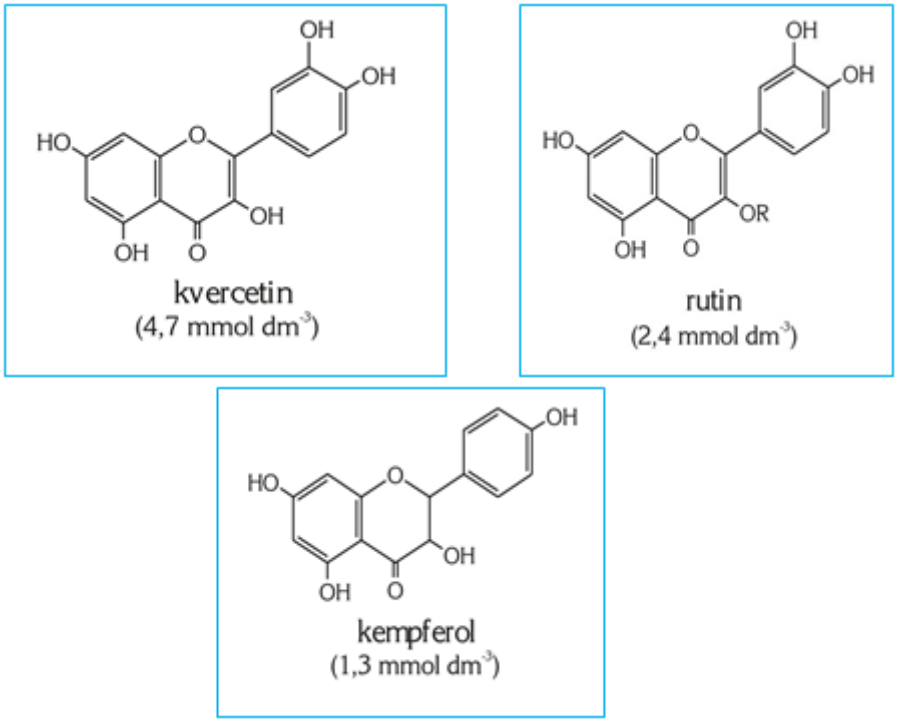
Flavonoidima se pripisuju mnoga terapijska djelovanja kao npr. antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno (Harborne i Baxter, 1999).

Osnovnu kemijsku strukturu flavonoida čine dva aromatska prstena (A i B) povezana trima ugljikovim atomima koji tvore oksigenirani heterocikl (C). Na temelju varijacija upravo tog heterocikla se flavonoidi dalje dijele na šest podskupina: flavonoli, flavoni, flavononi, flavanoli, antocijani i izoflavoni (Pandey i Rizvi, 2009a; Manach i sur., 2004), s time da se po nekim autorima tu još mogu pribrojiti i dodatne skupine halkona, dihidroalkona i dihidroflavonola. Najčešći predstavnici flavonoida u prehrani su kvercetin, miricetin, katehini i brojni drugi (Pandey i Rizvi, 2009a).

Do danas je identificirano više od 6400 flavonoida (Harborne i Baxter, 1999), a kvercetin, rutin i kemferol (prikazani na slici 2) su polifenoli prisutni u cvijetu trnine te se ubrajaju u skupinu flavonoida.

Razlike između pojedinih flavonoidnih podgrupa proizlaze iz varijacija u broju i rasporedu hidroksilnih skupina, kao i iz prirode i stupnja njihove alkilacije i/ili glikozidacije. Najčešće se javljaju flavoni i flavonoli s hidroksilnim skupinama u položajima 3'- i 4'- u

prstenu B, a rjeđe oni s hidroksilnom grupom samo u položaju 4'-. Glikozidacija kod flavonoida događa se najčešće u položaju 3-, a manje u položaju 7-. Šećer koji se najčešće javlja jest glukoza, no mogu se javiti i galaktoza, ramnoza i ksiloza (Kazazić, 2004).



Slika 2. Prikaz strukturnih formula kvercetina, kemferola i rutina (Kazazić, 2004)

2.3. OKSIDACIJSKI STRES I ANTIOKSIDANSI

2.3.1. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres se definira kao pomak ravnoteže u staničnim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Riječ je o stanju prekomjernog stvaranja slobodnih radikala pri čemu dolazi do gubitka ravnoteže između stvaranja slobodnih radikala i mogućnosti neke stanice da ih ukloni. Na taj način dolazi do remećenja staničnog metabolizma i njegove regulacije te se oštećuju brojne stanične komponente (Lushcak, 2011).

U stanjima oksidacijskog stresa dolazi do porasta reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u organizmu ili tkivima, što rezultira oštećenjem nukleinskih kiselina, proteina i lipida stanične membrane. Stoga se oksidacijski stres može definirati kao oštećenje tkiva uvjetovano poremećajem ravnoteže pro- i anti-oksidacijskog sustava.

Redoks stanje predstavlja važnu pozadinu brojnih poremećaja u radu jetre. Promjena ravnoteže redoks stanja može uzrokovati razne upalne, metaboličke i proliferacijske bolesti jetre. Reaktivni kisikovi spojevi (ROS) primarno se proizvode u mitohondriju i endoplazmatskom retikulumu hepatocita preko sustava enzima citokrom P450. Među prvim staničnim strukturama koje podliježu štetnom djelovanju reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta su hepatocitni proteini, lipidi i DNA. Proces štetnog djelovanja ovih vrsta rezultira pojavom strukturnih i funkcionalnih abnormalnosti jetre stoga oksidacijski stres treba istražiti zbog nekoliko razloga (Cichoz-Lach i Michalak, 2014). Prvi je što pojava oksidacijskog stresa može objasniti patogenezu raznih bolesti jetre. Osim toga, praćenjem oksidacijskih markera u hepatocitima može se dijagnosticirati stupanj oštećenja jetre i promatrati odgovor stanica jetre na farmakološke terapije.

2.3.2. Slobodni radikali

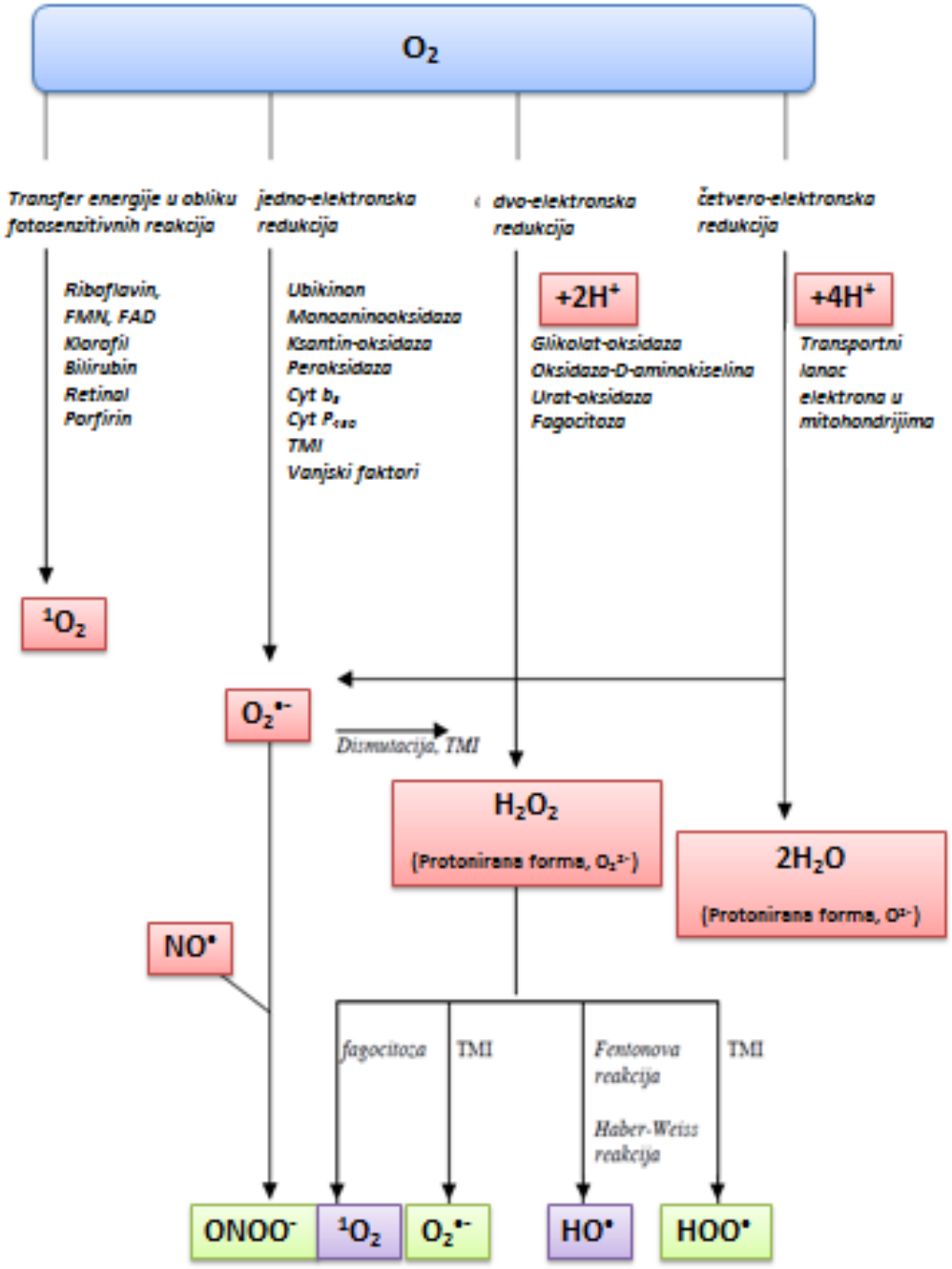
Slobodni radikal je bilo koji atom odnosno molekula koja sadrži jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj orbitali (Ghodbane i sur., 2013). Nastaje homolitičkim cijepanjem kovalentne veze, pri čemu svaki elektron ostaje vezan u susjednom atomu. Sve slobodne radikale karakterizira iznimno visoka reaktivnost što je rezultat njihova nastojanja da popune valentnu orbitalu, tj. spare nespareni elektron i time postignu stabilnu elektronsku konfirguraciju. Njihovo veoma važno obilježje je lančana rekacija, odnosno jedan radikal potiče stvaranje drugog stoga novonastali spojevi također imaju svojstva radikala (Gamulin i sur., 2005).

Biokemijski su najznačajniji reaktivni oblici kisika (engl. *reactive oxygen species*- ROS), što je zajednički naziv za radikale kisika (superoksidni, hidroksilni, peroksilni) kao i reaktivne neradikalne derivate kisika (vodikov peroksid, hipokloritna kiselina, singletni kisik) te reaktivni oblici dušika (engl. *reactive nitrogen species*- RNS), u koje ubrajamo slobodne radikale dušika (dušikov (II) oksid, dušikov (IV) oksid) i spojeve kao što su peroksinitrit i nitrozilni kation.

Molekula kisika u osnovnome stanju ima dva nesparena elektrona te djeluje kao snažno oksidacijsko sredstvo. Primanjem jednog elektrona nastaje superoksidni radikal (O_2^-), a primanjem sljedećeg elektrona nastaje O_2^{2-} koji protoniranjem prelazi u vodikov peroskid (H_2O_2) (Štefan i sur., 2007).

Molekule sposobne da izvrše prijenos energije na molekulu kisika i izazovu njegovu ekscitaciju su riboflavin i njegovi derivati (flavin-mononukleotid i flavin-adenin-dinukleotid),

klorofil, bilirubin, retinal i razni porfirini, bilo slobodni ili vezani za proteine (Halliwell i Guteridge, 1999) (slika 3).



Slika 3. Produkcija reaktivnih kisikovih vrsta. FMN- flavin-mononukleotid; FAD- flavin-adenin-dinukleotid; cyt- citokrom; TMI- ioni prijelaznih metala. Za H_2O_2 i $ONOO^-$ pokazano je da stanična membrana ne predstavlja barijeru za difuziju ovih vrsta unutar stanice ili među stanicama (Groves, 1999), što znači da te vrste mogu inducirati oksidacijski stres praktično bilo gdje u stanici.

Reaktivne kisikove vrste uključuju niz kemijski reaktivnih molekula nastalih metabolizmom kisika (tablica 2).

Tablica 2. Reaktivni kisikovi spojevi (Štefan i sur., 2007)

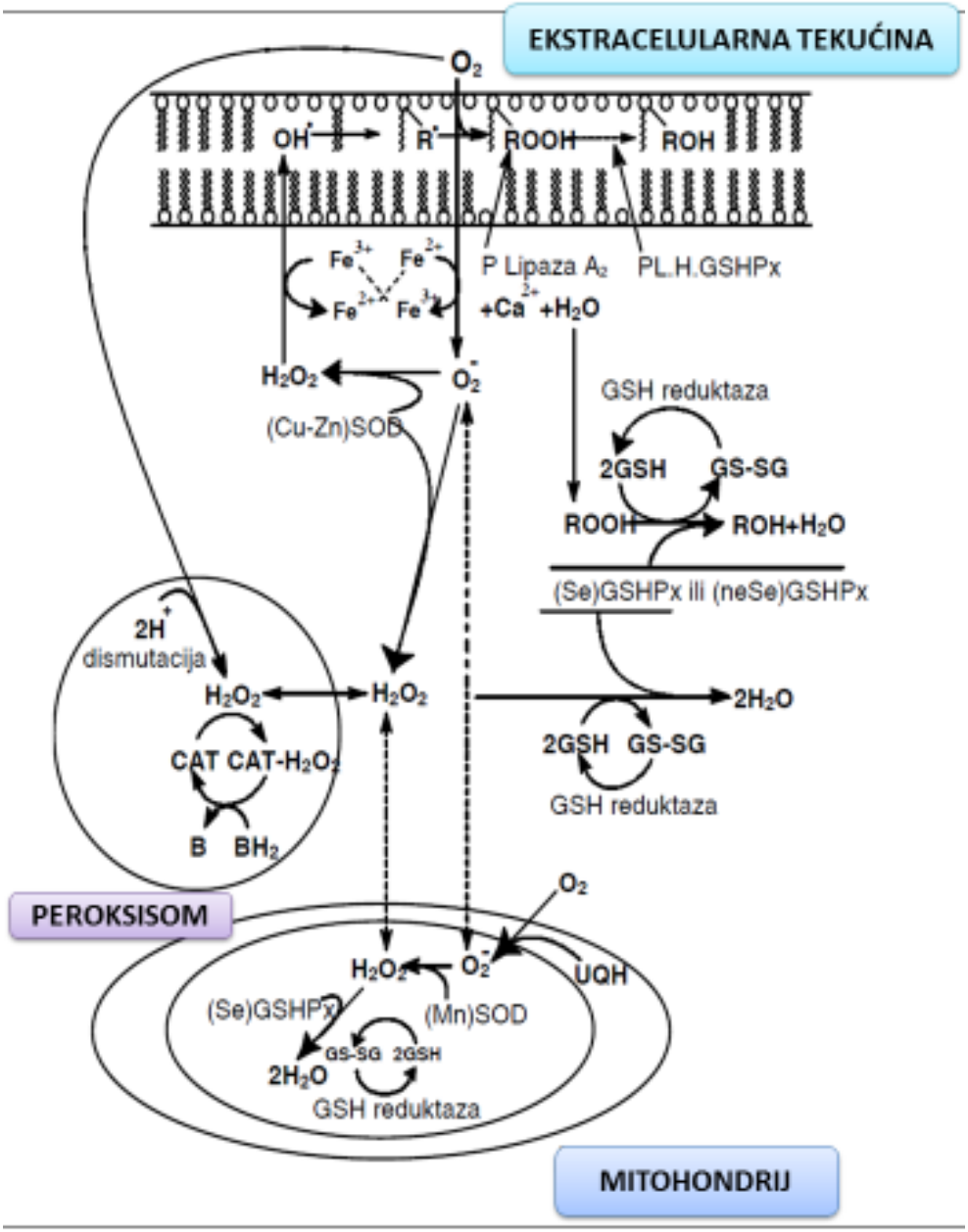
Slobodni radikali		**Čestice koje nisu slobodni radikali**	
Superoksidni,	$O_2^{\bullet -}$	Vodikov peroksid,	H_2O_2
Peroksidni,	ROO^-	Hipokloritna kiselina,	HClO
Hidroksilni,	$OH^\bullet$	Ozon,	O_3
Alkoksilni,	$RO^\bullet$	Singletni kisik,	$^1O_2$
Hidroperoksilni,	HO_2^-		

2.3.3. Antioksidansi i njihove funkcije

Antioksidans je tvar koja uklanja prooksidans na način da stvara produkte koji nisu toksični i ne uzrokuju oštećenja stanice. Prooksidans je tvar koja inducira razna oksidacijska oštećenja bioloških komponenti kao što su nukleinske kiseline, proteini i lipidi. Antioksidansi štite organizam od prooksidacijskog djelovanja na više načina: inhibicijom stvaranja ROS/RNS, smanjenjem oksidacijske sposobnosti prooksidansa, keliranjem s metalnim ionima te inhibicijom oksidacijskih enzima (Magalhaes i sur., 2007).

Iako u organizmu postoji neprekidna produkcija slobodnih radikala, do poremećaja homeostaze ne dolazi sve dok postoji ravnoteža između produkcije ROS i mehanizama antioksidacijske zaštite koji su prisutni u svim stanicama i sudjeluju u "hvatanju" i neutralizaciji reaktivnih oblika kisika, svodeći oštećenja stanica i prisutnih biomolekula na minimum. Mehanizmi antioksidacijske zaštite aerobnih organizama mogu se razdvojiti u dva nivoa: primarna i sekundarna antioksidacijska zaštita.

Primarnu antioksidacijsku zaštitu čini nekoliko enzimskih sustava od kojih su najznačajniji: superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GSHPx) i katalaza (CAT) (slika 4).



Slika 4. Osnovne uloge superoksid dismutaze, glutation peroksidaze i katalaze. (Cu-Zn)SOD-bakar-cink superoksid dismutaza; (Mn)SOD-mangan superoksid dismutaza; (Se)/(neSe)-GSHPx-selen ovisna/selen neovisna glutation peroksidaza; CAT-katalaza; UQH-ubikinon radikal; PL.H.GSHPx-fosfolipid vodik peroksid glutation peroksidaza; GS-SG/GSH reducirani/oksidirani glutation; B i BH_2-donori vodika specifični za katalazu (npr. etanol).

- **Superoksid dismutaza (SOD)** katalizira dismutacije između superoksid aniona radikalima uz produkciju H_2O_2 i kisika. Neutralizaciju nastalog H_2O_2 vrše glutation peroksidaza ili katalaza.

- **Glutation peroksidaza (GSHPx)** reducira H_2O_2 i hidroperokside masnih kiselina. Ovaj enzim je prisutan u citosolu gdje štiti fosfo- i sfingolipide membrana od oksidacijske destrukcije.
- **Katalaza (CAT)** katalizira razgradnju nastalog H_2O_2, dok peroksidaza katalizira oksidaciju različitih supstrata pomoću H_2O.

Pored ovih enzima, postoji i niz drugih sa sličnom funkcijom kao što su selen-neovisna GSHPx, glutation reduktaza, reducirani glutation (GSH) i glukoza-6-fosfat dehidrogenaza. U sustav primarne antioksidacijske zaštite ubrajaju se i proteini transferin i ceruloplazmin koji imaju bitnu ulogu u transportu metalnih iona, albumina i bilirubina (Primiano i sur., 1997). Svi navedeni primarni antioksidansi čine koordiniranu obranu organizma od reaktivnih slobodnih radikala.

Sustav sekundarne antioksidacijske zaštite čine brojni niskomolekularni spojevi različitog porijekla i karaktera kao što su ubikinon, L-askorbinska kiselina, tokoferoli, karotenoidi, fenoli i njihove kiseline, flavonoidi, derivati hidroksicinamata i drugi (Draper i sur., 2000).

Kako je struktura ovih spojeva vrlo raznovrsna, tako su različiti i mehanizmi kojima oni ostvaruju svoju aktivnost u sustavu antioksidacijske zaštite. Najčešće djeluju kao hvatači slobodnih radikala, donori protona, inhibitori enzimskih sustava te kelatori iona prijelaznih metala (Lebeau i sur., 2000).

U sustav sekundarne antioksidacijske zaštite mogu se ubrojiti i enzimi koji aktivno sudjeluju u otklanjanju oksidacijskih oštećenja nukleinskih kiselina, lipida i proteina kao što su: endo- i egzonukleaze, DNA polimeraze i ligaze, fosfolipaza A2, GSHPx i fosfolipid-ovisna GSHPx, glikozilaze te brojni proteolitički enzimi. Ovi enzimi popravljaju oštećene molekule DNA, uklanjaju oksidirane masne kiseline membranskih lipida i kroz procese resinteze obnavljaju oksidirane aminokiseline i proteine.

Funkcija antioksidansa je neutralizacija slobodnih radikala i zaštita stanice od njihovog toksičnog djelovanja čime se sprječava pojava i razvoj bolesti vezanih uz oksidacijski stres. Antioksidansi nastaju u stanici ili se u organizam unose hranom ili putem suplemenata. Djeluju tako da onemogućuju stvaranje novih slobodnih radikala u organizmu, uništavaju u organizmu već stvorene radikale ili popravljaju oštećenja u stanici nastala njihovim djelovanjem (Wootton-Beard i Ryan, 2011). U tablici 3 prikazana je podjela antioksidansa, kao i njihova funkcija u organizmu.

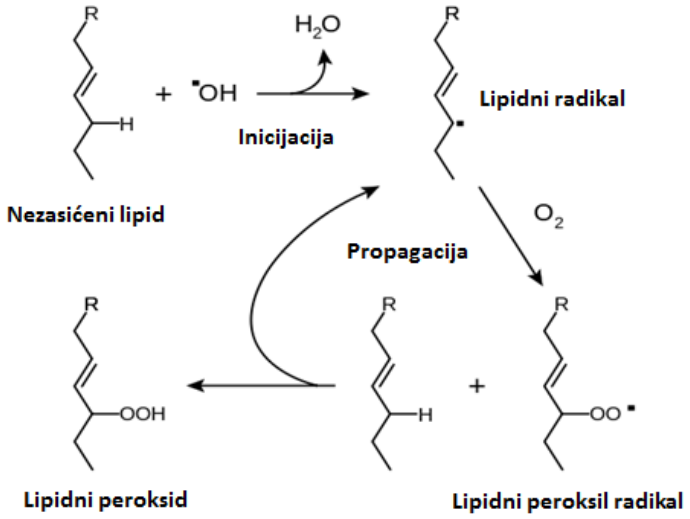
Tablica 3. Podjela antioksidansa (Štefan i sur., 2007)

VRSTA ANTIOKSIDANSA	IME ANTIOKSIDANSA	FUNKCIJA ANTIOKSIDANSA
Unutarstanični antioksidansi	Superoksid dismutaza	Katalitički uklanja $O_2^{\cdot-}$
	Katalaza	Uklanja H_2O_2 kada je prisutan u velikim koncentracijama
	Glutation peroksidaza	Uklanja H_2O_2 kada ju prisutan u malim koncentacijama, uklanja organske hidroperokside
	Citokrom oksidaza	Sprječavaju oslobađanje aktivnih kisikovih spojeva tijekom redukcije O_2 u H_2O_2
Membranski antioksidansi	Vitamin E	Antioksidacijsko djelovanje ostvaruje kidanjem lanca
	Beta karoten	Ima sposobnost uklanjanja singletnog kisika i slobodnih radikala
	Koenzim Q	Ima antioksidacijsko djelovanje u respiratornom lancu
Izvanstanični antioksidansi	Transferin	Veže ione željeza
	Laktoferin	Veže željezo pri nižim vrijednostima pH
	Haptoglobin	Veže hemoglobin
	Albumin	Veže hem
	Ceruloplazmin	Veže ione bakra, koristi vodikov peroksid za reoksidaciju bakra
	Bilirubin	Uklanja peroksilne radikale
	Urati	Uklanjaju radikale I vežu metale
	Glukoza	Uklanja $HO^{\cdot}$
	Izvanstanična superoksid dismutaza	Katalitički uklanja superoksidni anion
	Izvanstanična glutation peroksidaza	Katalitički uklanja hidroperokside

2.3.4. Lipidna peroksidacija

Proces lipidne peroksidacije započinje djelovanjem slobodnih radikala. Oni izazivaju oksidaciju na višestruko nezasićenim masnim kiselinama koje sadrže visoko reaktivne dvostruke veze.

Proces lipidne peroksidacije obilježuju tri stupnja: inicijacija, propagacija i terminacija. Fazu inicijacije najćešće pokreće hidroksilni radikal pri čemu nastaje lipidni radikal, koji može brzo reagirati s kisikom te nastaje peroksilni radikal. Zatim oduzimanjem vodika iz druge nezasićene masne kiseline, peroksilni radikal stvara lipidni hidroperoksid (LOOH) koji stvara nove radikale pa dolazi do lančane reakcije i nastaje novi lipidni radikal. U fazi terminacije, djelovanjem antioksidansa, završava proces lipidne peroksidacije (Štefan i sur., 2007).



Slika 5. Lipidna peroksidacija (Gutteridge, 1988)

U većini slučajeva za istraživanje lipidne peroksidacije koristi se mjerenje produkta lipidne peroksidacije- malondialdehida (MDA) kao mjere oksidacijskog stresa. Kada dođe do nakupljanja slobodnih radikala u velikim količinama, oni mogu "napasti" nezasićene masne kiseline dovodeći do već spomenute lančane reakcije- lipidne peroksidacije (Sheu i sur., 2003). Najviše MDA nalazi se u mikrosomima jetre.

2.4. VISOKO-PROTEINSKA DIJETA

Tijelo konstantno razgrađuje i gubi proteine te ne može pohraniti aminokiseline. Da bi se ti gubici nadoknadili potrebno je unositi proteine hranom iz dva razloga: ti su proteini jedini izvor esencijalnih aminokiselina i materijala za sintezu neesencijalnih aminokiselina i drugih tvari s dušikom. Dnevni preporučeni unos (engl. *daily recommended intake*- DRI) proteina za odraslu osobu je 0,8 g po kilogramu tjelesne mase dnevno (Trumbo i sur., 2002).

Preporuka je da se proteini unose u umjerenim količinama- u rasponu od DRI vrijednosti do dvostruke DRI vrijednosti energije. Visoko-proteinska dijeta (više od 2-3 grama proteina po kilogramu tjelesne mase) često se preporuča kao dijeta koja se koristi za redukciju tjelesne mase i održavanje dobrog zdravlja (Santesso i sur., 2012).

Rezultati različitih provedenih studija (Journel i sur., 2012; Kinsey-Jones i sur., 2015) pokazuju da povećanje proteina u prehrani smanjuje ukupan unos energije, što dovodi do redukcije tjelesne mase.

Maksimalan dnevni unos proteina nije definiran, ali Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*- WHO) i Organizacija za prehranu i poljoprivredu (engl. *Food and Agriculture Organization*- FAO) smatraju da unos koji je veći od 2-3 grama proteina po kilogramu tjelesne mase može uzrokovati zdravstvene probleme. Nekoliko studija pokazalo je nepovoljan utjecaj visoko-proteinske dijete na kardiovaskularno zdravlje, pretilost kao i na opterećenje bubrega (Lagiou i sur., 2012; Marckmann i sur., 2015; Vergnaud i sur., 2013).

Pretpostavlja se da učinak visoko-proteinske dijete ovisi o sastavu proteina u svakodnevnoj prehrani. Studije na životinjama pokazale su kako crveno meso ima lošiji učinak na organizam nego što to imaju mliječni proteini (Badger i sur., 2001; Belobrajdic i sur., 2003). Belobrajdic i suradnici su 2004. godine ustanovili kako primjena visoko-proteinske dijete, koja se sastoji od mliječnih proteina, utječe na smanjenje debljine, poboljšava lipidni profil i povećava osjetljivost na inzulin (Belobrajdic i sur., 2004).

2.4.1. Proteini sirutke

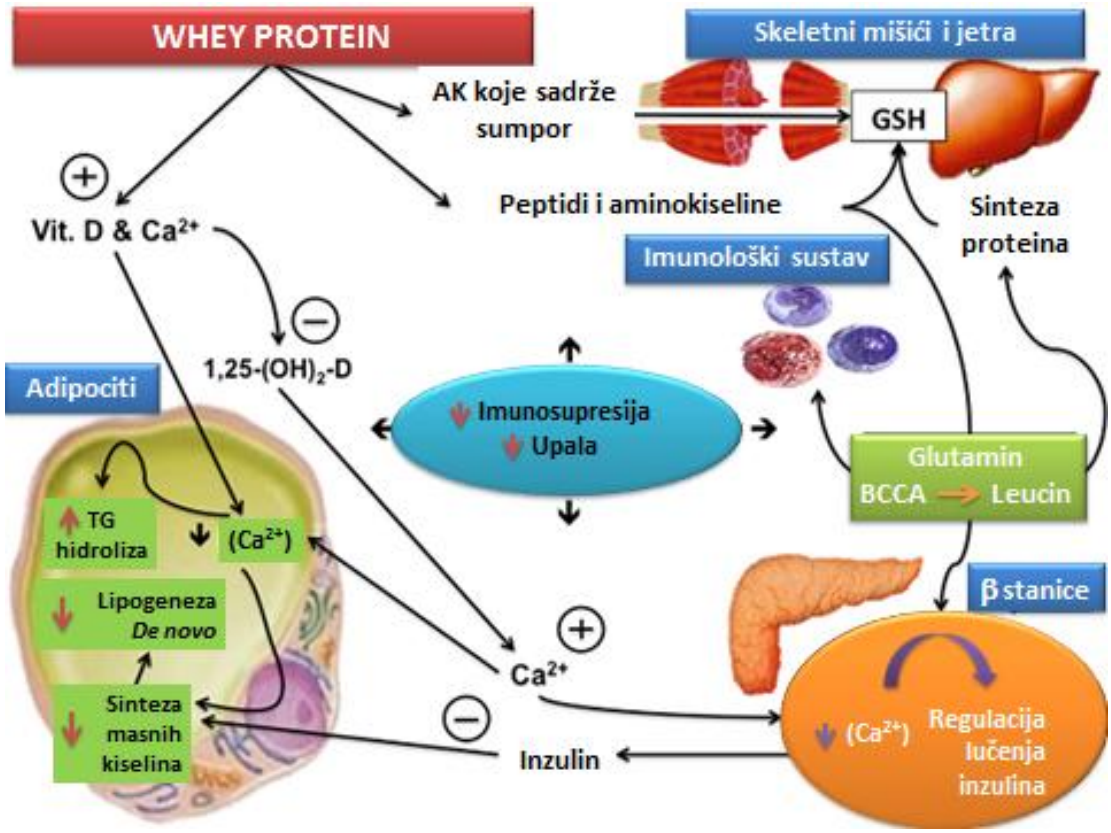
Proteini sirutke (whey proteini) čine približno 18-20 % ukupnih proteina mlijeka. Proteine sirutke najvećim dijelom čine β-laktoglobulini i α-laktalbumini koji su genski proizvodi mliječne žlijezde. Tada slijede proteoze- peptoni (koji djelomično potječu i od hidrolize β-kazeina), imunoglobulini, albumin krvnog seruma te manji peptidi poput

laktoperoksidaze, lizozima, glikoproteina, krvnog transferina i laktorferina (Damodaran, 1997.)

Najveća je biološka vrijednost izolata proteina sirutke, zatim koncentrata proteina sirutke, peptida proteina sirutke, intaktnog proteina i na kraju slobodnih aminokiselina (Herceg i Režek, 2006).

Veća biološka vrijednost proteina sirutke u odnosu na proteine mlijeka potječe od velikog udjela lizina (40 % više u sirutki nego u mlijeku) te cisteina i metionina (2,5 puta više) (Tratnik, 1998).

Prednost whey proteina u odnosu na druge proteine je u brzoj apsorpciji u crijevima, što u konačnici rezultira sintezom proteina koji izgrađuju mišiće (Mansour i sur., 2015). Jedan od najznačajnijih efekata koje proteini sirutke izazivaju u organizmu je njihova sposobnost da podižu razinu glutationa (GSH), koji je najvažniji u vodi topljiv antioksidans koji se nalazi u tijelu. Na slici 8 prikazani su mehanizmi koji uključuju proteine sirutke kao izvor različitih imunonutrijenata.



Slika 6. Proteini sirutke uz pomoć glutationa (GSH) mogu utjecati na metabolizam masti, sintezu proteina mišića, antioksidacijski sustav (Cruzat i sur., 2014)

Sve je više studija koje ukazuju na potencijalnu snagu sirutkinih proteina u redukciji pojave raka, u borbi s HIV-om, djelovanju na poboljšanju imuniteta, u redukciji utjecaja stresa i smanjenju kortizola, povećanju razine serotina u mozgu, poboljšanju funkcija jetre u osoba koje boluju od nekih oblika hepatitisa, smanjenju krvnog tlaka i povećanju performansi kod sportaša (Herceg i Režek, 2006).

Istraživanja su pokazala da visoko-proteinska dijeta u kojoj su korišteni proteini sirutke smanjuje oksidacijski stres u životinja i povećava mitohondrijsku aktivnost u mozgu (Shertzer i sur., 2013).

Proteini sirutke djeluju antibakterijsko, antitumorsko, antivirusno, antioksidacijsko te djeluju protiv hipertenzije i hiperlipidemije (Bounous, 2000; Low i sur., 2003). Također, istraživanje je pokazalo da korištenje visokih doza proteina sirutke ima hepatoprotektivni učinak (Hesham i sur., 2014).

Tijekom intenzivnog vježbanja, visok udio aminokiselina donatora sulfidrilnih skupina može reducirati intracelularne koncentracije GSH. Unos proteina sirutke ne samo da može usporiti oksidacijski stres induciran vježbanjem, nego i može pomoći u održavanju redoks statusa u imunološkim stanicama budući da one mogu biti osjetljive na razine unutarstaničnih sulfhidrilnih spojeva, GSH i cisteina. Učinak ovog mehanizma potvrđen je eksperimentalnim dokazima (Marshall, 2004).

Proteini sirutke imaju mnoge pozitivne učinke na organizam, kao što su kontrola metabolizma glukoze u zdravih osoba, regulacija prekomjerne tjelesne težine, hipertenzije i oksidacijskog stresa. Osim toga, proteini sirutke osiguravaju veću sitost. Ovaj efekt je uključen u modulaciju nekoliko crijevnih hormona koji se odnose na smanjenje unosa hrane, s povećanim otpuštanjem hormona za mršavljenje. Također, dolazi do smanjenog lučenja hormona neuropeptida Y i povećanja pro-opiomelanokortina u centralnom živčanom sustavu (CNS). Osim toga, dolazi do smanjenja ekspresije upalnih i oksidacijskih markera stresa, kao i do smanjenja krvnog tlaka (Sousa i sur., 2012).

2.5. JETRA

Jetra (grč. *hepar*) je veliki parenhimatozni organ koji se nalazi u trbušnoj šupljini, više s desne strane, ispod rebara i dijafragme. Gornjom stranom je vezana za dijafragmu, a donjom naliježe na neke organe čija se udebljanja jasno primjećuju na donjem reljefu jetre. Najveća je žlijezda u organizmu dužine 15-18 cm i prosječne težine kod odraslog čovjeka do 1500 grama. Jetra posjeduje dvostruki krvožilni sustav. Oko 80 % krvi ulazi u jetru portalnim

krvotokom kroz venu porte, a oko 20 % kroz arteriju hepatiku. Jetra je na taj način bogato opskrbljena krvlju, a optok iznosi oko 1,5 litara u minuti. Hepatičnom arterijom jetra dobiva hranu i kisik, dok portalnim krvotokom u jetru dospijevaju hranjive tvari i ostali sastojci koji su apsorbirani u probavnom sustavu (u tankom i debelom crijevu) te se u jetri uglavnom i metaboliziraju (Štulhofer, 1992).

2.5.1. Funkcije jetre

Jetra je najveća žlijezda u ljudskom organizmu, a služi za skladištenje hranjivih tvari te neutraliziranje štetnih. Jetra ima vrlo važnu ulogu u nizu metaboličkih, kako kataboličkih tako i anaboličkih procesa pa se stoga naziva „centralnim laboratorijem" organizma. U njoj se odvija veliki dio metabolizma ugljikohidrata, lipida, proteina i drugih dušikovih tvari. U jetri se također vrši proces detoksikacije, konjugacije i esterifikacije (Guyton, 1999).

Uloga krvožilnog sustava jetre- Krvožilni sustav jetre služi kao dodatni spremnik krvi u kojem se uobičajeno nalazi oko 500 mL krvi, a dodatno može primiti do 1 litre krvi. U limfnim žilama jetre stvara se 50 % ukupne limfe u tijelu, dok Kuppferove stanice uklanjaju bakterije koje se iz probavnog sustava apsorbiraju zajedno s hranjivim tvarima.

Uloga jetre u metabolizmu ugljikohidrata- U jetri se odvijaju važni procesi u metabolizmu ugljikohidrata kao što su: glukoneogeneza - stvaranje glukoze iz aminokiselina i glicerola, održavanje normalne koncentracije glukoze u krvi između obroka pohranjivanjem i otpuštanjem glikogena te pretvorba fruktoze i galaktoze u glukozu.

Uloga jetre u metabolizmu masti- U jetri se stvara većina lipoproteina, ugljikohidrati i proteini se pretvaraju u masti, sintetizira se velika količina kolesterola, iskorištavaju se masti za dobivanje acetil koenzima A koji se dalje u ostalim stanicama tijela koristi za dobivanje energije u ciklusu limunske kiseline. U tom se organu vrši sinteza masnih kiselina, fosfolipida, kolesterola i lipoproteina. Također se u jetri vrši metabolička razgradnja masnih kiselina, esterifikacija kolesterola te dolazi do stvaranja žučnih kiselina i ketonskih tijela.

Uloga jetre u metabolizmu proteina- Najvažniji dio metaboličke funkcije jetre se odnosi na metabolizam proteina. U jetri se odvijaju reakcije u kojima iz amonijaka nastaje karbamid, stvaraju se brojni proteini plazme te se odvijaju reakcije u kojima iz jednih aminokiselina nastaju druge.

Funkcija jetre u konjugaciji i detoksikaciji- Razne toksične i organizmu strane tvari konjugiraju se u jetri s glukuronskom ili sumpornom kiselinom ili glicinom i time se prevode u netoksične i bolje topive spojeve koji se zatim izlučuju iz tijela. Tako se indol apsorbiran iz crijeva oksidira u jetri u indoksil i konjugira s glukuronatom ili sulfatom i kao takav izlučuje urinom kao indikan. Osim indola se i salicilna kiselina, mentol, kamfor, fenol te druge tvari i lijekovi vežu u glukuronide ili sulfate. Na taj način jetra vrši detoksikaciju, iako možda taj izraz nije sasvim dobar jer se mnogi spojevi, koji se stvaraju u organizmu i nisu toksični, kao npr. bilirubin i neki hormoni, također konjugiraju i izlučuju kao glukuronidi ili sulfati. Osim s glukuronatom ili sulfatom, jetra vrši konjugaciju i s glicinom pa se tako salicilna, nikotinska ili benzojeva kiselina mogu vezati s glicinom u salicilurnu, nikotinurnu i hipurnu kiselinu (Zeuzem, 2007).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. KEMIKALIJE

- NaH_2PO_4- Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Na_2HPO_4- Kemika, Zagreb, Hrvatska
- HCl- Kemika, Zagreb, Hrvatska
- SDS- Merck, Darmstadt, Njemačka
- Octena kiselina- Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Tiobarbiturna kiselina (TBA)- Sigma, St. Louis, SAD
- 1,1,3,3-tetrametoksipropan (TMP)- Sigma, St. Louis, SAD
- NaOH- Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Etanol (99,9%)- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- DTNB (Ellman-ov reagens)- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- NDPH- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- Glutation reduktaza- Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka
- KH_2PO_4- Kemika, Zagreb, Hrvatska
- EDTA- Sigma, St. Louis, SAD
- Citokrom C- Sigma, St. Louis, SAD
- Ksantin- Sigma, St. Louis, SAD
- Ksantin oksidaza- Sigma, St. Louis, SAD
- SOD iz goveđih eritrocita- Sigma, St. Louis, SAD
- H_2O_2- Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Albumin goveđeg seruma- Armour Pharmaceutical Co. Ltd. Eastborne, SAD

3.2. SASTAV WHEY PROTEINA

Whey proteini su bogati izvori koncentrata proteina sirutke koji sadrže najvišu biološku vrijednost (BV), višu od bilo kojeg drugog proteina. Također, koncentrat proteina sirutke ima visoku razinu esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina. Proizvodni proces uključuje jedinstvenu kombinaciju tehnologije membranske filtracije i sušenja pri niskoj temperaturi i pritisku što osigurava precizno odvajanje i koncentraciju proteina te očuvanje prirodne funkcije i visoke prehrambene vrijednosti. Na 100 g praha (suhe tvari), whey protein

sadrži 82 g proteina, nizak udio laktoze te je bogat kalcijem. Whey protein je izvrstan izvor esencijalnih aminokiselina i sadrži najviše proporcije BCAA koje možemo naći u prirodnom proteinu. Frakcije proteina su: 44 % β-laktoglobulina, 17 % α-laktalbumina, 1,5 % BSA, 8 % imunoglobulina, 0,5 % laktoferina te 26 % glikomakropeptida. Energetska vrijednost u 25 g proizvoda iznosi 103 kcal, tj. 435 kJ, 21 g proteina, 1,9 g masti, 1,0 g ugljikohidrata te 125 mg kalcija.

Tablica 4. Udio pojedine aminokiseline u koncentratu proteina sirutke (Sindayikengera i Xia, 2006)

AMINOKISELINA	mg AK / g proteina
Izoleucin	49,7-57,3
Leucin	79,8-106,6
Valin	18,4-59,3
Lizin	76,1-88,1
Metionin i cistein (kombinacija)	oko 79,7 (otprilike jednak omjer)
Fenilalanin i tirozin (kombinacija)	oko 58,2 (otprilike jednak omjer)
Treonin	61,1-68,7
Triptofan	oko 17,3
Histidin	7,8-18,7
Alanin	42,1-55,5
Arginin	22,0-27,1
Glutamin	141,4-158,4
Glicin	13,8-53,2
Prolin	46,7-66,6
Serin	38,8-53,0
Aspartat	oko 94,1

3.3. POKUSNE ŽIVOTINJE

Eksperimentalni pokusi provedeni su na životinjama iz jedinice za uzgoj laboratorijskih životinja Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Pokusne životinje bili su C57BL6 miševi, starosne dobi 3 mjeseca. Životinje su hranjene tijekom 30 dana, pri čemu je po pet životinja bilo smješteno u kavezu na temperaturi od 22 °C, uz neograničen pristup hrani i vodi.

Pokusne su životinje hranjene komercijalno dostupnom hranom, koja im je bila dostupna *ad libitum*. Uvjeti u kojima su životinje držane su 12 sati svijetla i 12 sati tame pri 22 °C i 60 % vlažnosti. Hrana kojim su miševi hranjeni je standardna hrana za miševe 4RF21 (Mucedola, Italija, oblik 12 mm), a koja sadrži pšenicu, soju, kukuruz, sojino ulje, kvasac, ljuske lješnjaka, riblji ekstrakt, natrijev klorid, kalcijev karbonat i dikalcijev fosfat.

Održavanje i njega svih pokusnih životinja provedena je u skladu sa smjernicama koje su na snazi u Republici Hrvatskoj (Zakon o dobrobiti životinja, NN #135, 2006 i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u pokusima ili druge znanstvene svrhe, NN #47, 2011), a provodi se u skladu s Uputama za njegu i korištenja laboratorijskih životinja, DHHS Publ. #(NIH) 86-123.

3.3.1. Eksperimentalne grupe životinja

Eksperimentalne grupe činile su četiri grupe životinja (miševa):

- KO- kontrolna grupa (0,3 mL fiziološke otopine)
- TC- ekstrakt cvijeta trnine (100 mg kg^{-1} na dan)
- WP- whey protein (40 % koncentracija proteina; 400 g kg^{-1} na dan)
- WP + TC- ekstrakt cvijeta trnine + whey protein

Tridesetog dana pokusa životinje su žrtvovane te su organi jetre uzeti za daljnju analizu. Životinje su anestezirane eterom te iskrvarene punkcijom iz srca bez antikoagulansa. Jetra je izolirana iz životinja odmah nakon skupljanja uzoraka krvi. Slijedilo je vaganje i zabilježavanje mase jetre te su potom uzorci pohranjeni na -80 °C za daljnju analizu. Sve analize vezane uz jetru su nakon ovog koraka rađene isključivo na ledu i u roku od tjedan dana nakon prikupljanja svih uzoraka.

3.3.2. Priprema tkiva (jetra) za određivanje antioksidacijskih enzima

Svježe tkivo homogenizira se u 50 mM fosfatnom puferu pH 7 u omjeru 1 : 10 (w/v). Fosfatni pufer (50 mM, pH=7): pripremi se otopina (a) 0,2 M NaH_2PO_4 x 2 H_2O i otopina (b) 0,2 M Na_2HPO_4 x 7 H_2O; 17 ml otopine (a) pomiješa se s 183 ml otopine (b), uskladi pH i doda H_2O do 800 ml. Organi se potom homogeniziraju na ultrazvučnom homogenizatoru u 3 ciklusa od po 30 sekundi uz stanku od 10 sekundi između ciklusa. Uzorke je potrebno cijelo

vrijeme držati na ledu. Homogenate bubrega i jetre potom je potrebno centrifugirati pri 20 000 x g tijekom 15 min na 4 °C.

3.4. MJERENJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE (MDA)

Prisutnost lipidne peroksidacije u uzorku jetre određivana je modificiranom metodom koju su 2008. godine opisali Jayakumar i suradnici. Metoda se temelji na mjerenju koncentracije malondialdehida (MDA) koji je jedan od glavnih produkata lipidne peroksidacije. Malondialdehid reagira s tiobarbiturnom kiselinom pri čemu nastaje kromogen koji se može spektrofotometrijski izmjeriti.

Priprema otopina:

1,15 g HCl-a razrijedi se u 100 ml H_2O; 0,81 g natrij dodecil sulfata (SDS) razrijedi se u 10 mL dH_2O; 20 mL octene kiseline i 2,31 mL HCl pomiješa se i dopuni do 50 mL s dH_2O. pH vrijednost se podesi na 3,5 dodavanjem 17 mL 5M NaOH i dopuni se s dH_2O do konačnog volumena od 100 mL. 0,8 % TBA priprema se otapanjem 0,4 g TBA-e u 40 mL dH_2O uz zagrijavanje. Na taj volumen dodaje se 500 µl 5M NaOH i dopuni do konačnog volumena od 50 mL s dH_2O. Otopina treba biti svježe pripremljena na dan pokusa.

Postupak:

Uzorcima jetre mase 100 g dodaje se 1 mL 50mM fosfatnog pufera (pH 7,0) nakon čega se uzorci homogeniziraju ultrazvučnim homogenizatorom Bandelin Sonoplus HD2070 (Bandelin, Njemačka) upotrebom sonde MS73 (Bandelin, Njemačka), snagom od 10 %. Zatim se homogenati centrifugiraju centrifugom Mikro 200R (Hettich, Njemačka) 15 minuta pri brzini od 10 000 rpm.

200 µL supernatanta se pomiješa sa 200 µL 8,1 %-tne vodene otopine SDS-a, 1,5 mL 20 %-tne vodene otopine octene kiseline (pH=3,5) i 1,5 mL 0,81 %-tne vodene otopine tiobarbiturne kiseline. Zatim se smjesa zagrijava 60 minuta pri temperaturi od 95 °C. Nakon 60 minuta se uzorci ohlade te im se mjeri apsorbancija pomoću spektrofotometra Libro S22 (Biochrom, Ujedinjeno kraljevstvo) pri 532 nm i 600 nm. Ukupna apsorbancija određuje se prema formuli $A_{uk}=A_{532} - A_{600}$. Koncentracija se izračuna prema formuli:

$$C\ (MDA)= A \times V_{uzorka}\ (mL) / \varepsilon \times V_{reakcijske\ smjese}\ (mL) \times C_{proteina}\ (mg\ mL^{-1}) \qquad [1]$$

gdje: ε iznosi $1,56x10^5$ $M^{-1}cm^{-1}$, a duljina kivete *l* iznosi 1 cm.
Koncentracija lipidnih peroksida izražava se kao nmol MDA mg^{-1} proteina.

3.5. AKTIVNOST KATALAZE (CAT)

Katalaza je enzim čija je osnovna uloga razgradnja vodikovog peroksida (H_2O_2). Katalazna aktivnost očituje se tek pri većim koncentracijama vodikovog peroksida, što govori da je katalaza isključivo odgovorna za razgradnju peroksida u uvjetima oksidacijskog stresa. Aktivnost enzima katalaze u supernatantu jetre određuje se spektrofotometrijski metodom po Aebiju (1984).

Priprema otopina:

Fosfatni pufer pH 7,0- pripremi se otopina (a) 50 mM KH_2PO_4 i otopina (b) 45,6 mM Na_2HPO_4 x 2 H_2O; 1 L otopine (a) pomiješa se sa 1,5 L otopine (b).
H_2O_2- 0,34 mL 30% H_2O_2 se razrijedi fosfatnim puferom do 100 mL (otopina je stabilna pri 4 °C dva tjedna)

Postupak:

U kvarcnu kivetu se doda 2 mL već razrijeđenog uzorka i 1 mL fosfatnog pufera, što predstavlja slijepu probu. U drugu kvarcnu kivetu se doda 2 mL već razrijeđenog uzorka i 1 mL supstrata (30 mM H_2O_2), čime započinje enzimska reakcija.
Enzimska aktivnost se mjeri pri valnoj duljini 240 nm. Pad u apsorbanciji u jedinici vremena je mjera katalazne aktivnosti koja se definira kao količina enzima koja razgrađuje 1 µmol H_2O_2 u jedinici vremena (min) kod pH=7,0 pri 25 °C, gdje koncentracija pada od 10,3 do 9,2 mM. Koncentracija se računa prema formuli:

$$C = \Delta A \times V_{uzorka}\ (mL) / \varepsilon \times V_{reakcijske\ smjese}\ (mL) \times C_{proteina}\ (mg\ mL^{-1}) \qquad [2]$$

gdje: ε (H_2O_2) iznosi 43,6 $M^{-1}cm^{-1}$, a duljina kivete *l* iznosi 1 cm.
Koncentracija proteina u uzorku izmjerena je medotom po Lowryju (Lowry i sur., 1951). Aktivnost katalaze izražena je kao U mg^{-1} proteina.

3.6. AKTIVNOST REDUCIRANOG GLUTATIONA (GSH)

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

$$C = \Delta A \times V_{uzorka}\ (mL) / \varepsilon \times V_{reakcijske\ smjese}\ (mL) \times C_{proteina}\ (mg\ mL^{-1}) \qquad [3]$$

gdje ε (DTNB) iznosi 8,22 $mM^{-1}cm^{-1}$, a duljina kivete *l* iznosi 0,6 cm.
Koncentracija proteina u uzorku izmjerena je medotom po Lowryju (Lowry i sur., 1951). Aktivnost enzima reduciranog glutationa (GSH) izražena je kao mU mg^{-1} proteina (nmol/min/mg proteina).

3.7. AKTIVNOST SUPEROKSID DISMUTAZE (SOD)

Superoksid dismutaza je enzim koji katalizira dismutaciju superoksidnih radikala (O_2^*) u vodikov peroksid (H_2O_2), pri čemu se jedna molekula H_2O_2 oksidira u O_2, a druga reducira u H_2O_2. Aktivnost SOD-a je u supernatantima homogenata jetre određena inhibicijom redukcije citokroma C u sustavu ksantin/ksantin oksidaza prema modificiranoj metodi Flohé i Ötting (1984).

Priprema otopina:

Otopina A: 1,5 mg 1 mM ksantina otopljen je u 9,86 mL 1 mM NaOH i tome je dodano 12,96 mg 0,05 mM citokroma C otopljenog u 85 mL 50 mM fosfatnog pufera pH=7,8 koji sadržava 0,1 mM EDTA-e.

Otopina B: 1500 μL otopine svježe pripremljene ksantin oksidaze u 50 mM fosfatnom puferu pH=7,8 koji sadržava 0,1 mM EDTA-e, konačne aktivnosti od 0,2 U mL^{-1}.

Osnovna otopina SOD-a iz goveđih eritrocita u koncentraciji 1 mg/mL se razrjeđuje do koncentracije 1000 ng/100 µL; ta se koncentracija namjesti na koncentraciju 500 ng/50 µL kojom se rade serije razrjeđenja u rasponu od 100 ng/50 µL do 500 ng/50 µL.

Postupak:

U staklenu kivetu s 1,45 mL otopine A se doda 25 µL uzorka (po potrebi razrijeđenog fosfatnim puferom pH=7,8 bez EDTA-e) i reakcija započinje dodatkom 25 µL otopine B. Vrijeme reakcije mjeri se 3 minute na valnoj duljini 550 nm. Svaki uzorak je termostatiran na 25 ºC. Kako aktivnost ksantin-oksidaze može varirati od pokusa do pokusa, nužno je uskladiti koncentraciju tog enzima tako da brzina redukcije citokroma C bude analogna porastu apsorbancije od 0,025 po minuti u kontrolnoj reakciji bez superoksid dismutaze. Jedinica SOD-a definirana je kao količina enzima potrebnog za 50 %-tnu inhibiciju redukcije citokroma C u baždarnom pravcu s poznatim koncentracijama SOD-a.
Aktivnost SOD-a izražena je kao U mg^{-1} proteina.

3.8. AKTIVNOST KARBONIL PROTEINA (PC)

Za utvrđivanje količine oštećenja proteina korištena je metoda po Levine i suradnicima (1994), a određuje se kao sadržaj karbonilnih skupina u proteinskom uzorku. Karbonilne skupine proteinskog lanca reagiraju s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) otopljenim u HCl-u te daju 2,4-dinitrofenilhidrazon.

Volumenu od 200 µL homogenata uzorka dodano je 300 µL 10 mM DNPH u 2M HCl. Tako pripremljeni uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi tijekom jednog sata uz povremeno miješanje. Proteini su precipitirani s 10 % (w/v) TCA na -20 °C tijekom 5 minuta te nakon toga centrifugirani na 4 °C pri 12000 g 10 minuta.

Supernatant je bačen, a precipitat resuspendiran u mješavini etanola i etil acetata u omjeru 1:1 i centrifugiran pri istim uvjetima. Postupak ispiranja peleta je ponovljen sve dok se sav nevezani DNPH nije isprao. Nakon toga je precipitat otopljen u 6M gvanidin HCl u kupelji na 35 °C. Dobivena otopina je korištena za mjerenje apsorbancije na 370 nm.

Koncentracija proteinskih karbonilnih skupina je izračunata korištenjem molarnog ekstincijskog koeficijenta ε= 0,022 $mM^{-1}cm^{-1}$ te prikazana kao omjer količine karbonila i koncentracije proteina i izražena kao nmol mg^{-1} proteina.

3.9. ODREĐIVANJE PROTEINA METODOM PO Lowry-ju

Sadržaj proteina u homogenatu jetre određen je metodom po Lowryju (1951), a izražen je u miligramima proteina po mililitru (mg mL^{-1}). Metoda se zasniva na reakciji peptidnih veza s ionima bakra (Cu^{2+}) u alkalnoj sredini (biuretska reakcija) i redukciji fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline (Folin-Ciocalteau reagens) s aromatičnim aminokiselinama proteina.

Priprema otopina:

Reagens A: 2% Na_2CO_3 u 0.1 M NaOH; reagens B: 0.5 % $CuSO_4$ x $5H_2O$ u 1 % K,Na-tartaratu; reagens C: 50 ml reagensa A + 1 ml reagensa B; Folin-Ciocalteu reagens: komercijalni reagens razrijeđen s destiliranom vodom u omjeru 1:2.

Postupak:

Kako bi se mogla odrediti koncentracija proteina, potrebno je konstruirati baždarni dijagram, tj. dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina. Prema niže opisanom postupku provest će se mjerenje s različitim koncentracijama proteina u rasponu od 5 do 100 mg ml^{-1}.

U epruvete je potrebno dodati 0,1 mL otopine proteina s 2 mL reagensa C i promiješati protresivanjem, zatim inkubirati na sobnoj temperaturi 10 do 15 minuta. Nakon završenog previđenog vremena, potrebno je naglo dodati 0,2 mL Folin-Ciocalteu reagensa uz snažno miješanje (vortex) te inkubirati na sobnoj tempperaturi 40 do 60 minuta. Slijepa proba umjesto otopine proteina sadrži 0,1 mL destilirane vode.

Nakon što se izmjeri vrijednost A= 740 nm, koncentracija proteina se odredi pomoću baždarnog dijagrama.

3.10. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti $(\bar{x})$ uzoraka u skupini:

$$\bar{x} = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N} x_i \qquad [4]$$

s pripadajućim standardnim pogreškama $S_{\bar{x}}$:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}} \qquad [5]$$

N= ukupan broj uzoraka u skupini

x_i= pojedinačne vrijednosti uzoraka

Statistički značajnim vrijednostima smatrane su razlike između skupina za koje je stupanj vjerojatnosti $p<0,05$. Statstička analiza podataka napravljena je korištenjem programa Microsoft Excel 2011 (Redmond, Sjedinjene Američke Države) i StatSoft Statistica 7.0 (Tuzla, Sjedinjene Američke Države). Dobiveni podaci izražavani su u obliku srednja vrijednost ± standardna devijacija srednje vrijednosti. Višestruka usporedba kontrolne skupine i tretiranih skupina miševa izvršena je ANOVA analizom varijance, pri čemu je interval pouzdanosti namješten na $p\leq0,05$.

Post-hoc analiza izvršena je koristeći Newman-Keuls test (Newman, 1939; Keuls, 1952) kako bi se ustanovila razlika između pokusnih grupa.

4. REZULTATI I RASPRAVA

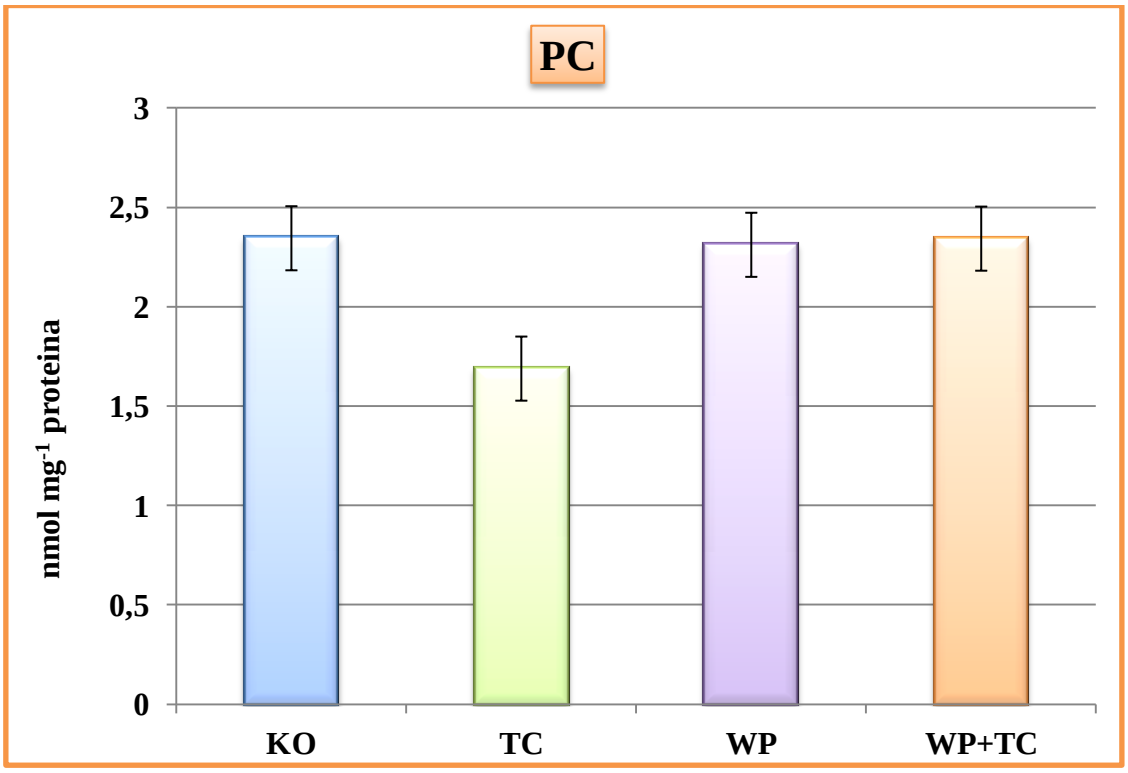
Cilj ovog istraživanja bila je procjena učinka polifenola izoliranih iz cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) i visoko-proteinske dijete na različite parametre oksidacijskog stresa u jetri miša. Oksidacijski stres je stanje promijenjene ravnoteže u oksidacijsko/antioksidacijskom statusu organizma u korist oksidacijskog stanja, koje može rezultirati oštećenjem tkiva i organa. Stanični sustav je sposoban neutralizirati nastale reaktivne oksidacijske čestice pri normalnim fiziološkim uvjetima. Mehanizmi uklanjanja uključuju katalitičko uklanjanje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS-a) djelovanjem antioksidacijskih enzima ili neutralizacijom slobodnih radikala pomoću antioksidansa (koji djeluju kao "hvatači" slobodnih radikala).

U ovom istraživanju je korišten whey protein (WP), koncentrat proteina sirutke koji sadrži 82 % proteina u suhoj tvari. Proteini sirutke imaju visok udio aminokiselina razgranatog lanca, a prednost whey proteina, u odnosu na druge proteine, je vrlo brza apsorpcija u crijevima. Antioksidacijsko djelovanje whey proteina temelji se na visokom sadržaju i bioiskoristivosti aminokiseline cistein, koja pomaže u sintezi glutationa (GSH). Glutation je moćan unutarstanični antioksidans, izuzetno važan ne samo u ljudskom tijelu, već u svim biološkim organizmima izloženim oksidacijskom stresu i toksinima. Aminokiselina cistein sadrži tiolnu grupu koja služi kao aktivni agens u sprječavanju oksidacije i posljedično, oštećenja tkiva.

Tijekom 30 dana tretmana istraženo je djelovanje visoko-proteinske dijete (HPD) i polifenola izoliranih iz cvijeta trnine na laboratorijskim životinjama (C57BL6 miš). Istraživani biomarkeri oksidacijskog stresa u homogenatu jetre bili su karbonilirani proteini (PC), reducirani glutation (GSH), superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i malonildialdehid (MDA).

4.1. UTJECAJ POLIFENOLA IZ EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE I VISOKO-PROTEINSKE DIJETE NA KARBONILIRANE PROTEINE (PC) U HOMOGENATU TKIVA JETRE U C57BL6 MIŠA

Rezultati utjecaja na karbonilirane proteine kontrolne skupine i tretiranih skupina životinja u homogenatu tkiva jetre nakon 30 dana tretmana su prikazani na slici 7.



Slika 7. Koncentracija PC (nmol mg^{-1} proteina) u homogenatima tkiva jetre kod kontrolne i tretiranih skupina životinja u odnosu na kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD. $p<0,05$ (ANOVA)

Statistički značajno smanjenje (ANOVA, $p<0,05$) PC je zabilježeno kod uzorka TC (1,688 ± 0,24 nmol mg^{-1} proteina) u odnosu na kontrolnu grupu (2,344 ± 0,22 nmol mg^{-1} proteina). Također, smanjenje karboniliranih proteina je zabilježeno i u grupama koje su tretirane s whey proteinima (2,311 ± 0,20 nmol mg^{-1} proteina), kao i WP+TC (2,341 ± 0,18 nmol mg^{-1} proteina) u odnosu na kontrolnu grupu.

Derivati karbonila nastaju direktnim oksidacijama metalima kataliziranim reakcijama (eng. *metalcatalyzed oxidation*, MCO) bočnih aminokiselinskih lanaca prolina, arginina, lizina i treonina. Nadalje, karbonilni derivati lizina, cisteina i histidina mogu nastati u

sekundarnim reakcijama s reaktivnim karbonilnim komponentama na ugljikohidratima (produkti glikooksidacije), lipidima i krajnjim produktima glikacije/lipoksidacije. U usporedbi s drugim oksidacijskim modifikacijama, nastanak karbonila relativno je teško inducirati te je u odnosu na npr. formiranje metionin sulfoksida i disulfidne veze cisteina taj oksidacijski proces ireverzibilan (Dalle-Donne i sur., 2003).

Pandey i Rizvi su 2009. godine istraživali utjecaj resveratrola na biomarkere oksidacijskog stresa humanih eritrocita. Sam oksidacijski stres uzrokovan je *in vitro*, inkubacijom s 10^{-5} mol L^{-1} tert-butilhidroperoksidom (t-BHP) tijekom 60 min na 37 ^{o}C. Kako bi se ispitao zaštitni učinak resveratrola, ponovljen je isti postupak, samo što su uzorci sadržavali i t-BHP i resveratrol. Mjereni parametri bili su malondialdehid (MDA) i karbonilirani proteini (PC). Rezultati su pokazali kako prisutnost mikromolarne koncetracije resveratrola štiti eritrocite od oksidacijskog stresa, što i potvrđuju smanjene koncentracije MDA i PC (Pandey i Rizvi, 2009b).

Çoban i suradnici su 2015. godine istraživali utjecaj ekstrakta borovnice na biomarkere oksidacijskog stresa u štakora. Štakori su uzimali 300 mg kg^{-1} D-galaktoze koja uzrokuje starenje i oksidacijski stres u organizmu. Mjereni parametri bili su malondialdehid (MDA), karbonilirani proteini (PC), superoksid dismutaza (SOD) te reducirani glutation (GSH). Koncentracije SOD i GSH su se povećale, a koncentracije MDA i PC smanjile što ukazuje na zaštitni, antioksidacijski učinak ekstrakta borovnice (Çoban i sur., 2015).

U ovom istraživanju došlo je do statistički značajnog (ANOVA, $p<0,05$) smanjenja vrijednosti karbonil proteina (PC) kod grupe životinja koje su tretirane s ekstraktom cvijeta trnine u homogenatu tkiva jetre u odnosu na kontrolnu skupinu. Smanjenje vrijednosti pripisuje se flavonoidima prisutnim u cvijetu trnine, prvenstveno kamferolu i kvercetinu. Vrijednost karbonililiranih proteina u grupi životinja tretiranim whey proteinom (WP), tj. kombiniranom dijetom whey proteina i ekstrakta cvijeta trnine (WP+TC) dosegnule su vrijednosti proteina kontrolne grupe, što je vidljivo na slici 7. Može se zaključiti da visoko-proteinska dijeta nije uzrokovala oksidacijski stres u jetri miša budući da su vrijednosti karboniliranih proteina ostale na razini kontrolne grupe životinja.

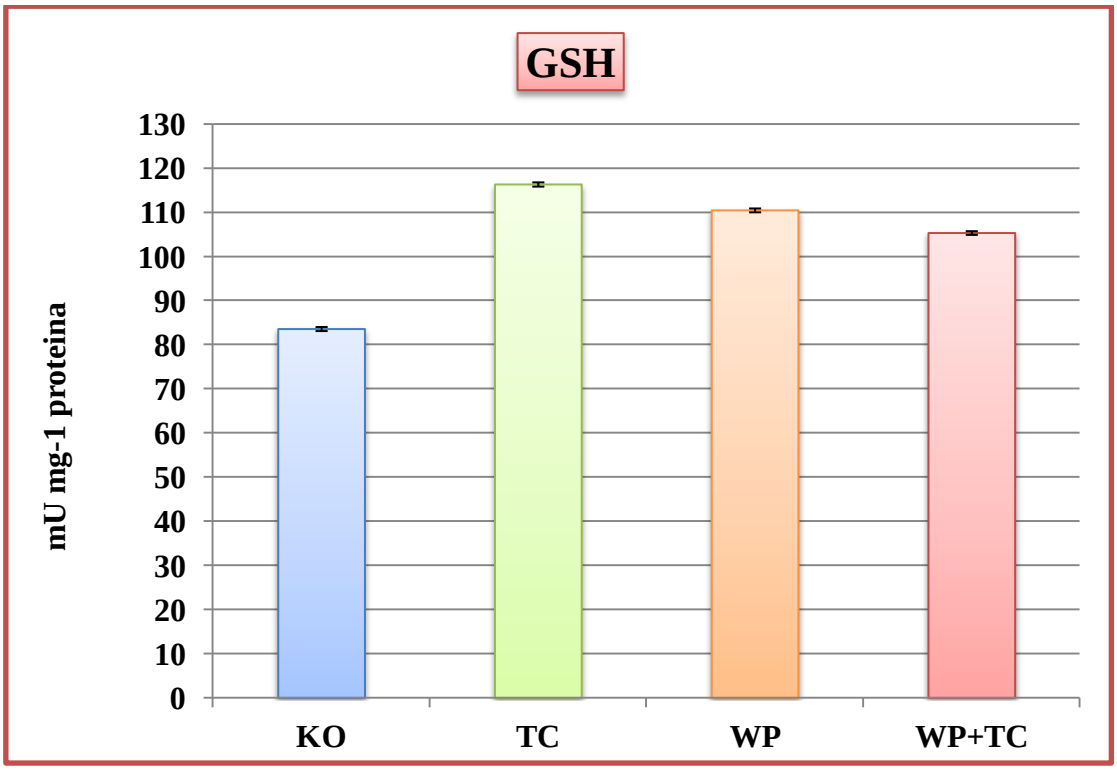
4.2. HEPATOPROTEKTIVNI UČINAK BIOAKTIVNIH SPOJEVA IZ EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE I VISOKO-PROTEINSKE DIJETE NA PARAMETRE OKSIDACIJSKOG STRESA U C57BL6 MIŠA

Reaktivni spojevi kisika predstavljaju skupinu vrlo reaktivnih spojeva koji se stvaraju u organizmu tijekom fizioloških i patoloških metaboličkih procesa (Halliwell, 1995). Reaktivne kisikove vrste (ROS) mogu izazvati oksidacijski stres i različita oštećenja na svim vrstama molekula (Dröge, 2002). Uklanjanjem reaktivnih spojeva kisika i dušika, unutarstanični i izvanstanični antioksidansi smanjuju mogućnost oksidacijskoga oštećenja lipidnih molekula i drugih spojeva. Enzimska kataliza jest najučinkovitiji postupak uklanjanja reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). U organizmu postoji nekoliko skupina antioksidacijskih enzima uključujući katalazu (CAT), superoksid dismutazu (SOD) za uklanjanje superoksidnoga radikala te glutation peroksidazu (GSPHx) za uklanjanje vodikova peroksida i organskih peroksida (Štefan i sur., 2007). Polifenolni spojevi, koji se javljaju u izobilju u prehrambenim izvorima kao što su voće, povrće, čaj i vino, mogu imati važnu ulogu u jačanju antioksidacijskog djelovanja (Rizvi i sur., 2005; Pandey i sur., 2009).

4.2.1. Utjecaj polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine i whey proteina na aktivnost GSH enzima u homogenatu tkiva jetre miša

Na slici 8 su prikazani rezultati utjecaja polifenola i whey proteina na koncentraciju reduciranog glutationa u jetri tretiranih životinja nakon 30 dana tretmana.

Statistički značajno povećanje (ANOVA, $p<0,05$) aktivnosti GSH je zabilježeno kod svih grupa životinja. Najveće povećanje zabilježeno je kod uzorka ekstrakta cvijeta trnine u homogenatu tkiva jetre (116,33 ± 0,48 mU mg^{-1} proteina) u odnosu na kontrolnu grupu (83,58 ± 0,46 mU mg^{-1} proteina). Također, statistički značajno povećanje zabilježeno je u grupama koje su tretirane s whey proteinima (110,46 ± 0,44 mU mg^{-1} proteina), kao i WP+TC (105,33 ± 0,42 mU mg^{-1} proteina).

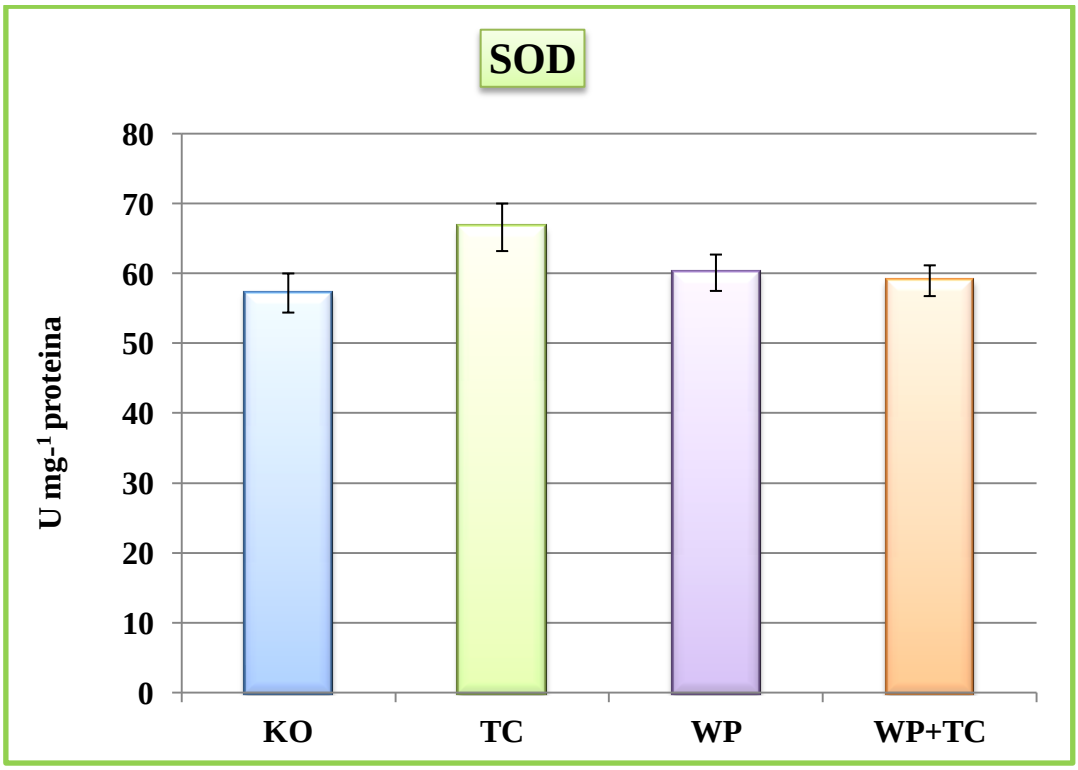


Slika 8. Koncentracija GSH (mU mg^{-1} proteina) u homogenatima tkiva jetre kod kontrolne i tretiranih skupina životinja u odnosu na kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD. $p<0,05$ (ANOVA)

4.2.2. Utjecaj polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine i whey proteina na aktivnost SOD enzima u homogenatu tkiva jetre miša

Rezultati utjecaja na aktivnost SOD enzima kontrolne skupine i tretiranih skupina životinja u homogenatu tkiva jetre nakon 30 dana tretmana su prikazani na slici 9.

U ovom istraživanju došlo je do statistički značajnog povećanja (ANOVA, $p<0,05$) aktivnosti SOD kod uzorka TC u homogenatu tkiva jetre (66,62 ± 3,4 U mg^{-1} proteina) u odnosu na kontrolnu grupu (57,22 ± 2,8 U mg^{-1} proteina), dok je blago povećanje zabilježeno i u grupama koje su primale WP (60,12 ± 2,6 U mg^{-1} proteina) i WP+TC (58,98 ± 2,2 U mg^{-1} proteina) u odnosu na kontrolnu grupu životinja.

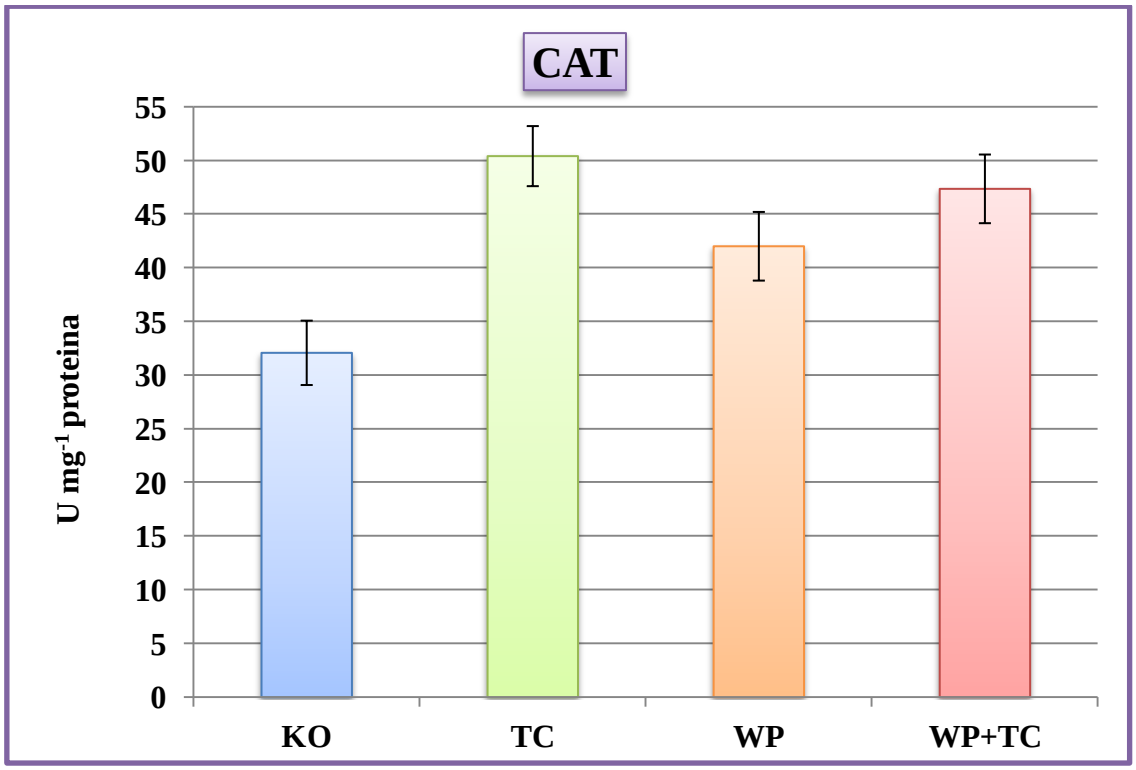


Slika 9. Koncentracija SOD (U mg^{-1} proteina) u homogenatima tkiva jetre kod kontrolne i tretiranih skupina životinja u odnosu na kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD. $p<0,05$ (ANOVA)

4.2.3. Utjecaj polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine i whey proteina na aktivnost CAT enzima u homogenatu tkiva jetre miša

Na slici 10 su prikazani rezultati utjecaja na aktivnost katalaze u jetri tretiranih životinja nakon 30 dana tretmana.

Statistički značajno povećanje (ANOVA, $p<0,05$) aktivnosti CAT zabilježeno je kod uzorka TC (50,42 ± 2,8 U mg^{-1} proteina) u odnosu na kontrolnu grupu (32,09 ± 3,0 U mg^{-1} proteina). Statistički značajno povećanje zabilježeno je i u grupama koje su tretirane s WP (42,02 ± 3,2 U mg^{-1} proteina) i WP+TC (47,367 ± 3,2 U mg^{-1} proteina) u odnosu na kontrolnu grupu.



Slika 10. Koncentracija CAT (U mg^{-1} proteina) u homogenatima tkiva jetre kod kontrolne i tretiranih skupina životinja u odnosu na kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD. $p<0,05$ (ANOVA)

Oksidacijski stres nastaje kao posljedica prekomjerne produkcije reaktivnih spojeva kisika (oksidansi, radikali) uslijed poremećaja u ravnoteži oksidacijsko-redukcijskih procesa u biološkim sustavima. U biokemijskim sustavima oksidansi imaju sposobnost predaje elektrona, dok antioksidansi (reducensi) imaju sposobnost primanja elektrona. Zbog prekomjernog stvaranja slobodnih radikala nastaje oksidacijski stres koji je uzrok i karakteristika brojnih bolesti i zdravstvenih poremećaja (Puljak i sur., 2004).

Danas je svijet suočen s epidemijom kroničnih nezaraznih bolesti koje su glavni uzrok u gotovo svim zemljama svijeta, a ugrožavaju život, zdravlje ljudi i gospodarski razvoj. Prema procjenama Svjestske zdravstvene organizacije, 68 % smrti u svijetu u 2012. godini je uzrokovano kroničnim bolestima. Među njima se posebno ističu kardiovaskularne i zloćudne bolesti, dijabetes i kronične respiratorne bolesti povezane s najvažnijim čimbenicima rizika, a to su tjelesna neaktivnost i nepravilna prehrana (Kralj i sur., 2015).

Razvitkom znanosti o prehrani danas nema jelovnika koji u svojim obrocima ne uključuje barem jednu namirnicu biljnog porijekla koje su bogate biološki aktivnim tvarima poput polifenola. Poznato je da polifenoli štite stanice od oštećenja uzrokovanih djelovanjem slobodnih radikala zahvaljujući jakim antioksidacijskim svojstvima te na taj način smanjuju rizik od nastanka raznih kroničnih nezaraznih bolesti.

Slobodni radikali koji nastaju u organizmu zbog vanjskih utjecaja izazivaju oksidacijski stres. Zaštitni mehanizmi uklanjanja reaktivnih kisikovih vrsta uključuju enzime kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GSPHx) i neenzimske spojeve poput glutationa (GSH), polifenola, tokoferola, vitamina E, beta-karotena i askorbata (Edeas i sur., 2010; Mao i sur., 2011).

Glutation (GSH) je glavni topljivi antioksidans u stanicama te je prisutan u velikim količinama u citosolu (1-11 mM), mitohondrijima (5-11 mM) i jezgrama (3-15 mM) (Flohe, 2001).

Glutation je izuzetno važan unutarstanični neenzimski antioksidans zahvaljujući aminokiselini cistein koja sadrži tiolnu skupinu. Sadržaj glutationa ovisi o okolišnim čimbenicima i funkcionira kao ravnoteža između sinteze glutationa i njegova iskorištenja. Povećanjem brzine sinteze GSH, kao posljedica izlaganja reaktivnim spojevima kisika/spojevima koji stvaraju ROS, može se povećati sadržaj glutationa (Valko i sur., 2006).

Glutation sudjeluje u prijenosu aminokiselina kroz plazmatsku membranu, izravno čisti singletni kisik i hidroksilni radikal te time detoksificira vodikov peroksid i lipidne perokside katalitičim djelovanjem glutation peroksidaze (GSPHx).

Prehrambeni antioksidansi, posebice polifenoli, korisni su u zaštiti protiv štetnog djelovanja reaktivnih kisikovih vrsta te u sprječavanju raznih bolesti povezanih s oksidacijskim stresom kao što su rak, starenje i neurodegenerativne bolesti (Sanchez-Rodriguez i sur., 2016). Rezultati studije koju su proveli Sanchez-Rodriguez i suradnici pokazuju statistički značajno povećanje aktivnosti superoksid dismutaze i glutation peroksidaze nakon tretmana polifenolima u štakora. Također, tretman polifenolima smanjio je razine ROS, RNS i superoksidnih aniona.

Kadmij je vrlo otrovan okolišni i industrijski zagađivač koji negativno utječe na mnoge organe, posebice jetru. Hamden i suradnici proveli su studiju koja je osmišljena kako bi se procijenio antioksidacijski učinak polifenola zelenog čaja na kadmijem induciranu jetrenu disfunkciju i oksidacijski stres u štakora. Odraslim štakorima oralno je davan kadmij svaka 3 dana tijekom 6 mjeseci. Rezultati studije pokazali su statistički značajni ($p<0,05$) porast lipidne peroksidacije i pad funkcije jetre i aktivnosti jetrenih enzima u štakora tretiranih

kadmijem u odnosu na kontrolnu grupu štakora. Također, aktivnost antioksidacijskih enzima kao što su superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GSPHx) te katalaza bila je značajno ($p<0,05$) smanjena u jetri štakora tretiranih kadmijem. Oralna primjena 5 % vodenog esktrakta zelenog čaja, uz oralnu primjenu kadmija tijekom šest mjeseci, izazvala je statistički značajan porast aktivnosti enzimskih biljega jetrene disfukncije (LDH, GGT, PAC, PAL, razina bilirubina) što ukazuje na smanjenje toksičnosti izazvane kadmijem. Također, ekstrakt zelenog čaja rezultirao je statistički značajnim porastom aktivnosti antioksidacijskih enzima (SOD, CAT, GSPHx). Može se zaključiti kako je oralna konzumacija polifenola zelenog čaja, uz konzumaciju kadmija, značajno poboljšala kadmijem induciranu jetrenu disfukncijU i smanjila štetne učinke oksidacijskog stresa (Hamden i sur., 2008).

Gu i suradnici su proveli studiju kako bi se procijenili učinci visoko-proteinske dijete na ravnotežu proizvodnje slobodnih radikala i antioksidacijskog statusa u probavnim organima C57BL6 miša. Miševi su podijeljeni u dvije skupine: skupina koja je imala normalni unos proteina (20 %) te druga skupina s visokim unosom proteina (60 %), uz dodatak 0,06 g/kg cisteina. Nakon dva tjedna, miševima su izmjereni oksidacijski i antioksidacijski parametri u dvanaesniku, jetri i gušterači. Rezultati pokazuju kako se konzumacijom visoko-proteinske prehrane značajno povećala koncentracija MDA i superoksidnog aniona, smanjila aktivnost SOD, glutation peroksidaze i katalaze te smanjio sadržaj reduciranog glutationa (GSH). U skupini hranjenoj visoko-proteinskom dijetom uz dodatak cisteina je pojava oksidacijskog stresa ublažena. Rezultati studije pokazuju da konzumacija visoko-proteinske dijete može dovesti do promjene oksidacijsko/antioksidacijske ravnoteže i tako izazvati oksidacijski stres u probavnim organima miševa (Gu i sur., 2008).

Visoko-proteinska dijeta je u posljednjih nekoliko godina vrlo popularna i istraživana tema. Tako su Ho i suradnici istraživali utjecaj visoko-proteinske dijete na rast stanica raka. Autori su proučavali učinak nisko-ugljikohidratne i visoko-proteinske dijete na brzinu rasta tumora kod miševa jer se smatra da stanice raka više ovise o glukozi nego normalne stanice u organizmu. Rezultati pokazuju da karcinom puno sporije raste provođenjem visoko-proteinske dijete nego što bi rastao provođenjem uobičajne prehrane, i kod miševa i kod ljudi (Ho i sur., 2011).

Journel i suradnici su 2012. godine promatrali utjecaj visoko-proteinske dijete na mozak, tj. kako utječe na sitost. Naime, oni smatraju kako prehranom bogatom proteinima postajemo brže i ostajemo dulje siti nego što je to nakon konzumacije obroka bogatim drugim makronutrijentima (mastima i ugljikohidratima). Nakon konzumacije proteina se iz gastrointestinalnog trakta otpuštaju peptidni hormoni. Oni kontroliraju unos hrane tako što

djeluju na područje mozga koji je uključen u homeostazu energije i šalju mozgu informacije o stanju energije. Rezultati su pokazali kako konzumacija visoko-proteinske dijete dovodi do veće aktivacije peptidnih hormona nego što bi dovela konzumacija dijete s normalnim unosom proteina. Na temelju dobivenih rezultata, autori smatraju kako dugotrajnom konzumacijom visoko-proteinske dijete dolazi do smanjenja unosa hrane i tjelesne mase kod laboratorijskih životinja, upravo zbog važne uloge proteina u osjećaju sitosti (Journel i sur., 2012).

U studiji koju su proveli Petzke i suradnici ispitivan je utjecaj visokog unosa proteina na povećanje oksidacijskog stresa u štakora. Ispitivane životinje bile su podijeljene u 4 skupine: skupina koja je primala visok unos proteina (51,3 %), skupina koja je imala srednji unos proteina (25,7 %), skupina koja je imala adekvatan unos proteina (13,8 %) te skupina koja je imala visok unos proteina, ali pritom nije primala tokoferol acetat. Nakon 15 tjedana, skupinama su izmjerene koncentracije malonildialdehida (MDA), karboniliranih proteina (PC), GSH i leucin kinetika. U usporedbi sa skupinom koja je konzumirala srednji i visoki unos proteina, u skupini koja je imala adekvatan unos proteina je pronađena povišena koncentracija karboniliranih proteina. Između navedenih skupina se koncentracija GSH u plazmi nije značajno razlikovala, dok je koncentracija GSH u jetri bila značajno niža u skupini koja je imala adekvatan unos proteina. Autori su zaključili kako dugotrajna konzumacija visokog unosa proteina nije utjecala na povećanje markera oksidacijskog stresa (Petzke i sur., 2000).

Proteini sirutke sporedni su proizvod pri proizvodnji sira i za sada su nedovoljno iskorišteni u ljudskoj prehrani. Uslijed svoje iznimne nutritivne vrijednosti (velikog udjela esencijalnih aminokiselina, aminokiselina koje sadrže sumpor te aminokiselina razgranatog lanca) i poželjnih funkcionalnih svojstava, proteini sirutke se sve više koriste u proizvodnji različitih, tradicionalno pripremljenih proizvoda, ali i novostvorenih prehrambenih proizvoda (Brnčić i sur., 2008). Kako imaju aminokiselinski sastav blizu biološkog optimuma, smatraju se nutritivno najvrjednijim proteinima stoga ne iznenađuje porast interesa i provedenih istraživanja o djelovanju proteina sirutke.

Djelovanje proteina sirutke (100-200 mg kg^{-1}) na štakore kojima je inducirana hepatotoksičnost primjenom alkohola (5 mg kg^{-1}) i paracetamola (500 mg kg^{-1}) su proučavali Hesham i suradnici. Utjecaj je ispitivan tijekom dva i četiri tjedna, nakon čega su prikupljeni i analizirani tkivo jetre i plazma. Rezultati su pokazali kako su alkohol i paracetamol povisili jetrene enzime (AST i ALT), no primjenom visoke doze proteina sirutke došlo je do smanjenja serumskih enzima (AST i ALT) i MDA, dok su markeri oksidacijskog stresa GSH i

SOD porasli. Na temelju dobivenih rezultata izveden je zaključak kako je oralna primjena proteina sirutke poboljšala induciranu hepatotoksičnost u štakora (Hesham i sur., 2014).

Terapeutski (anti-upalni, anti-fibrozni te anti-apoptotski) učinak izolata proteina sirutke na endotoksemijom induciranu hepatotoksičnost u štakora su proučavali Mansour i suradnici. Endotoksemija je inducirana intraperitonealnom injekcijom lipopolisaharida bakterije *E. coli*. Ispitivao se utjecaj izolata na djelovanje enzima superoksid dismutaze, ukupni kapacitet antioksidansa, faktor tumorske nekroze te imunohistokemijsko ispitivanje kaspaze-3. Nakon provedenog eksperimenta su uzorci tkiva jetre i serum poslani na biokemijsku procjenu koja je ustanovila kako je endotoksemija značajno doprinjela smanjenju aktivnosti SOD i smanjenju kapaciteta ukupnih antioksidansa te povećanju faktora tumorske nekroze (Mansour i sur., 2015).

Shertzer i suradnici su proučavali utjecaj izolata proteina sirutke na povećanje metabolizma energije u mozgu miša. Miševi su bili hranjeni izolatom proteina sirutke te su vrijednosti markera oksidacijskog stresa MDA i 4-hidroksialkena bili 40% niži, a proizvodnja vodikovog peroksida i superoksida je bila 25-35 % manja u mitohondrijima mozga. Na temelju rezultata su autori zaključili kako primjena izolata proteina sirutke smanjuje oksidacijski stres i povećava fukncju odnosno mitohondrijsku aktivnost u mozgu miša. Također, autori smatraju kako primjena izolata proteina sirutke kao dodataka prehrani može biti korisna u liječenju stanja povezanog s oksidacijskim stresom (Shertzer i sur., 2013).

Lipopolisaharidi (LPS), poznati i kao lipoglikani su velike molekule koje se sastoje od lipida i polisaharida. Nalaze se u vanjskim membranama gram-negativnih bakterija i izazivaju snažan imunosni odgovor kod životinja, tj. stimuliraju sintezu i lučenje reaktivnih kisikovih vrsta i citokina. U studiji koju su proveli Mansour i suradnici ispitivan je učinak izolata proteina sirutke na lipopolisaharidom inducirani oksidacijski stres i akutno oštećenje jetre u štakora. Nakon izlaganja štakora LPS, rezultati su pokazali veliko oštećenje jetre, tj. došlo je do porasta serumskih razina jetrenih enzima - alanin aminotransferaze (ALT) i aspartat aminotransferaze (AST). Izlaganje lipopolisaharidu rezultirao je povećanjem razine MDA, markera lipidne peroksidacije i povećanjem razine nitrita u hepatocitima te smanjenjem koncentracije glutationa (GSH) u hepatocitima. Tretman proteinima sirutke, nakon oksidacijskog stresa izazvanog LPS, rezultirao je poboljšanim funkcijama jetre što pokazuje pad serumskih razina jetrenih enzima AST i ALT. Također, izolati proteina sirutke smanjili su razinu nitrita i peroksidaciju lipida te povećali koncentraciju GSH u tkivu jetre. Autori su zaključili kako proteini sirutke mogu biti korisno farmakološko sredstvo za modulaciju oštećenja nastalih oksidacijskim stresom i akutnom ozljedom jetre (Mansour i sur., 2013).

U studiji koju su proveli Tranberg i suradnici istraživan je utjecaj proteina sirutke na promjenu mikrobiote u miša. Tijekom 14 tjedana su miševi hranjeni proteinima sirutke, pri čemu se izmet sakupljao 0., 7. i 13. tjedan te se analizirala fekalna mikrobiota. Nakon završenog perioda od 14 tjedana, prikupljeni su uzorci plazme te se ispitivao udio glukoze, inzulina i lipida. Rezultati su pokazali kako je konzumacija proteina sirutke značajno utjecala na smanjenje dobitka tjelesne težine tijekom prva 4 tjedna. Iako je utjecaj na povećanje tjelesne mase prestao, sirutka ublažava intoleranciju glukoze, poboljšava osjetljivost na inzulin i smanjuje kolesterol u plazmi (Tranberg i sur., 2013).

U ovom se istraživanju promatrao učinak polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine i visoko-proteinske dijete u homogenatu tkiva jetre. Zbog visokog sadržaja feonlnih spojeva, trnina je biljka koja posjeduje visoki antioksidacijski kapacitet. Whey protein (WP) korišten u ovom istraživanju je koncentrat proteina sirutke koji sadrži 82% proteina u suhoj tvari. Prednost whey proteina u odnosu na druge proteine je u tome što se brzo apsorbira u crijevima. Antioksidacijsko djelovanje whey proteina je bazirano na visokom sadržaju i bioiskoristivosti aminokiseline cistein koja pomaže u sintezi glutationa (GSH), moćnog unutarstaničnog antioksidansa. Koncentracije glutationa, izražene preko aktivnosti reduciranog glutationa (GSH), statistički su značajno povećane u svim grupama u odnosu na kontrolnu grupu životinja (slika 8), što ukazuje na antioksidacijski učinak ne samo ekstrakta cvijeta trnine nego i whey proteina.

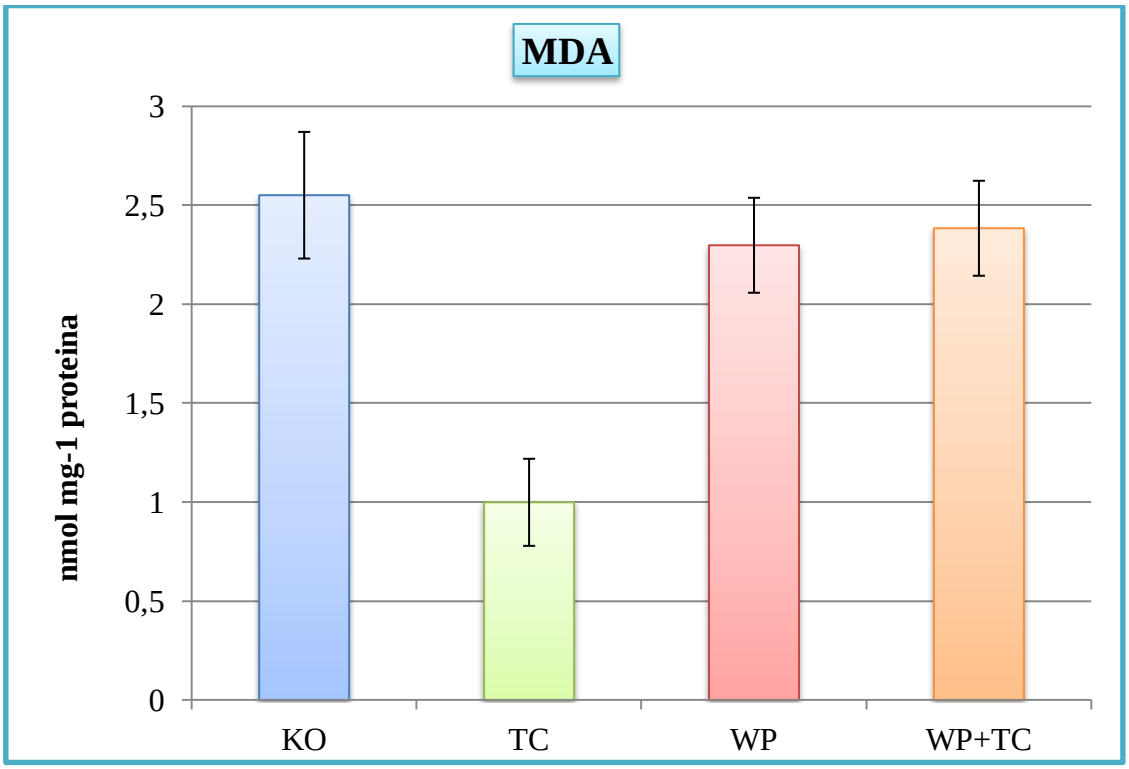
Kako bi se postigao osnovni cilj enzimskog antioksidacijskog sustava- sprječavanje oksidacijskih oštećenja, enzimska kaskada mora biti vrlo dobro usklađena i regulirana. Ključan enzim enzimske kaskade je superoksid dismutaza (SOD) koja svojom aktivnošću uklanja superoksidni radikal i prevodi ga u vodikov peroksid. Potom se nastali vodikov peroksid može eliminirati djelovanjem katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GSPHx). Rezultati ovog istraživanja pokazuju kako je došlo do statistički značajnog (ANOVA, $p<0,05$) povećanja aktivnosti SOD kod grupe životinja koja je tretirana s ekstraktom cvijeta trnine u odnosu na kontrolnu skupinu (slika 9). Grupe životinja koje su tretirane s whey proteinima odnosno kombinacijom whey proteina i ekstrakta cvijeta trnine, nisu pokazale statstički značajan porast aktivnosti enzima superoksid dismutaze u odnosu na kontrolnu grupu.

Osnovna uloga katalaze (CAT) je razgradnja vodikovog peroksida (H_2O_2). Katalazna aktivnost očituje se tek pri većim koncentracijama H_2O_2, što nam govori da je katalaza isključivo odgovorna za razgradnju peroksida u uvjetima oksidacijskog stresa. Statistički značajno povećanje (ANOVA, $p<0,05$) aktivnosti CAT zabilježeno je u svim grupama koje su uz normalnu prehranu primale i ekstrakt cvijeta trnine, whey proteine kao i kombinaciju whey

proteina i ekstrakta cvijeta trnine u odnosu na kontrolnu skupinu životinja što se pripisuje bioaktivnim spojevima u ekstraktu cvijeta trnine kao i whey proteinu (slika 10).

4.3. UTJECAJ POLIFENOLA IZ EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE I VISOKO-PROTEINSKE DIJETE NA LIPIDNU PEROKSIDACIJU U HOMOGENATU TKIVA JETRE U C57BL6 MIŠA

Lipidna peroksidacija je složena reakcija razgradnje (oksidacije) višestruko nezasićenih masnih kiselina, potaknuta reaktivnim kisikovim i dušikovim vrstama. Jedan od glavnih produkata lipidne peroksidacije je malondialdehid (MDA), koji je prihvaćeni biljeg lipidne peroksidacije te se koristi u evaluaciji oksidacijskog stresa (Bukan i sur., 2003).



Slika 11. Koncentracija MDA (nmol mg^{-1} proteina) u homogenatima tkiva jetre kod kontrolne i tretiranih skupina životinja u odnosu na kontrolu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ± SD. $p<0,05$ (ANOVA)

Na slici 11 su prikazani rezultati hepatoprotektivnog utjecaja polifenola iz ekstrakta trnine i whey proteina na razinu MDA u jetri tretiranih životinja nakon 30 dana tretmana.

Statistički značajno smanjenje (ANOVA, $p<0,05$) razine MDA zabilježeno je kod grupe koja je primala ekstrakt cvijeta trnine u homogenatu tkiva jetre ($0,999 \pm 0,22$ nmol mg^{-1} proteina) u odnosu na kontrolnu grupu životinja ($2,551 \pm 0,35$ nmol mg^{-1} proteina). Smanjenje razine MDA zabilježeno je i kod grupa koja je primala visoko-proteinsku dijetu ($2,298 \pm 0,24$ nmol mg^{-1} proteina) i kombinaciju visoko-proteinske dijete i ekstrakta cvijeta trnine ($2,384 \pm 0,24$ nmol mg^{-1} proteina) u homogenatu tkiva jetre u odnosu na kontrolnu grupu.

Zbog mnogostrukih nezasićenih dvostrukih veza, polinezasićene masne kiseline izvrsne su ciljne molekule za napad slobodnih radikala. Lipidna peroksidacija rezultira promjenom ili oštećenjem lipidne molekularne strukture te u biološkim membranama dovodi do gubitka fluidnosti, opadanja vrijednosti membranskoga potencijala, povećanja permeabilnosti prema H^+ i drugim ionima te do moguće rupture stanice i otpuštanja njena sadržaja (Štefan i sur., 2007).

Kemijska modifikacija aminokiselina u proteinima tijekom lipidne peroksidacije rezultira formiranjem lipooksidacijskih produkata koji služe kao markeri oksidacijskog stresa *in vivo*. Malondialdehid i 4-hidroksinonenal su dobro definirani oksidacijski produkti polinezasićenih masnih kiselina (Bayraktutan, 2002).

MDA reagira s proteinima krvnih žila kao npr. s kolagenom što dovodi do promjena u njegovoj strukturi (Requena i sur., 1996).

Faure i suradnici su 1993. opisali da je kontrola glikemije neophodna za smanjenje lipidne peroksidacije, odnosno koncentracije MDA. Stoga su Petlevski i suradnici proveli studiju kojoj je cilj bio ispitati učinak akarboze (inhibitora α-glukozidaza) na koncentraciju glukoze u serumu i MDA u homogenatu jetre NOD (engl. *non-obese diabetic*) miševa. U NOD miševa je šećerna bolest inducirana *in vivo* aplikacijom aloksan-monohidrata (75 mg/kg tjelesne mase). NOD miševi su podijeljeni u 4 skupine: kontrolni, zdravi NOD miševi (K), kontrolni, zdravi NOD miševi tretirani 7 dana akarbozom (K/A), dijabetični NOD miševi (D) te dijabetični NOD miševi tretirani 7 dana akarbozom (D/A). Koncentracija glukoze u krvi izmjerena je glukoza oksidaza-peroksidaza metodom, a koncentracija MDA u homogenatu jetre određena je upotrebom metode s tiobarbiturnom kiselinom. Nakon sedmodnevnog tretmana akarbozom zabilježeno je statistički značajno smanjenje koncentracije glukoze u krvi u skupini D/A u odnosu na skupinu D ($p<0,05$), a isto tako je uočen i statistički značajan ($p<0,05$) pad koncentracije MDA (Petlevski i sur., 2006).

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

Pad vrijednosti MDA u jetri pronađen je i kod zdravih štakora koji su tretirani prehranom bogatom polifenolima iz voća poput jagoda ili šljiva u usporedbi s kontrolnom grupom životinjama (Mateos i sur., 2005).

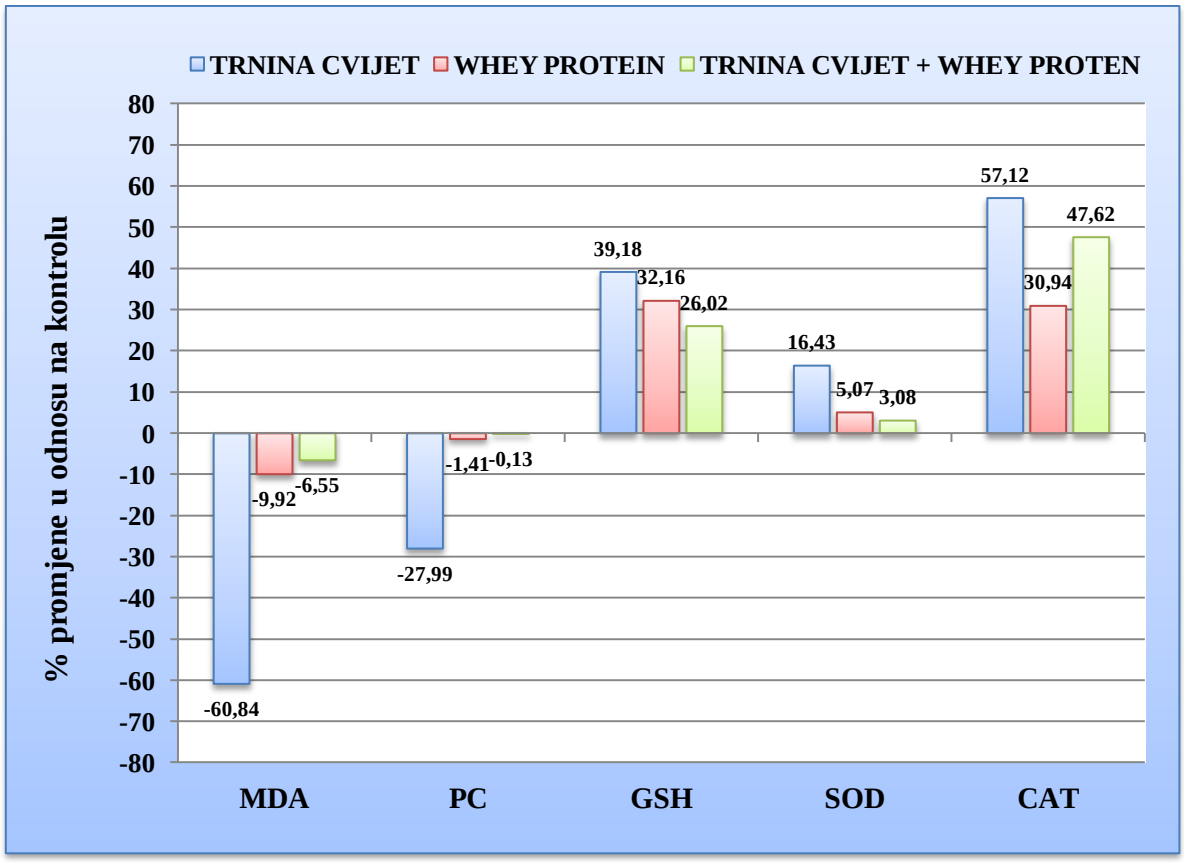
Diamanti i sur. proveli su studiju u kojoj su istraživali utjecaj dvije različite sorte jagoda (Adria i Sveva) na toksičnost u štakora izazvanu lijekom doksorubicinom (DOX). Doksorubicin je drastično povećao lipidnu peroksidaciju, oštećenja DNA i sadržaj mitohondrijskih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) te je značajno smanjio razinu mitohondrijske funkcije i antioksidacijskih enzima. Dva mjeseca nakon što su životinje tretirane jagodama, došlo je do značajnog smanjenja oštećenja DNA i koncentracije ROS i značajnog poboljšanja markera oksidacijskog stresa, aktivnosti antioksidacijskih enzima i mitohondrijske performanse. Autori su zaključili da se unosom jagoda može utjecati na toksičnost izazvanu doksorubicinom te da povećani unos jagoda ima potencijalne zdravstvene učinke od oksidacijskog stresa *in vivo* (Diamanti i sur., 2014).

U ovom istraživanju snižena razina MDA u homogenatu tkiva jetre kod grupe životinja koja je uz normalnu prehranu dobivala i ekstrakt cvijeta trnine je u skladu s prethodnim istraživanjima. Pad vrijednosti MDA ukazuje na značajan pad lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolnu grupu životinja čime se dokazao antioksidacijski učinak biljke trnine koja je bogata polifenolima (slika 11).

Grupe miševa koje su tretirane s whey proteinima odnosno kombinacijom whey proteina i ekstrakta cvijeta trnine također nisu izazvale oksidacijski stres u homogenatu tkiva jetre. Dobiveni rezultati mogu se objasniti činjenicom da polifenoli štite stanice od lipidne peroksidacije ne samo u situacijama oksidacijskog stresa nego i u normalnim uvjetima.

4.4. UTJECAJ POLIFENOLA IZ EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA AKTIVNOST OKSIDACIJSKIH ENZIMA GLAVNIH FAKTORA RIZIKA OD KARDIOVASKULARNIH BOLESTI (KVB)

Na slici 12 su prikazani ukupni utjecaji polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine i visoko-proteinske dijete (prikazani kao % promjene u odnosu na kontrolu) na razine MDA, GSH, PC i aktivnost SOD i CAT u homogenatu tkiva jetre C57BL6 miša kao glavnih faktora rizika od kardiovaskularnih bolesti (KVB).



Slika 12. Utjecaj polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine i whey proteina na razine MDA, GSH, PC i aktivnost SOD i CAT u homogenatu tkiva jetre C57BL6 miša izraženih kao % promjene u odnosu na kontrolnu grupu životinja kroz 30 dana tretmana.

Na temelju rezultata prikazanih na slici 12 možemo zaključiti kako je došlo do povećane aktivnosti antioksidacijskih enzima kao rezultat unosa polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine. Povećana aktivnost antioksidacijskih enzima ukazuje na poboljšanu zaštitu stanica i organa od oksidacijskog stresa.

Učinci eksperimentalnih dijeta na aktivnost enzima promatrani u ovom istraživanju pokazuju da antioksidansi uključeni u obranu jetre od reaktivnih kisikovih vrsta uvelike ovise o enzimima, izvoru antioksidanata i porijeklu oksidacijskog stresa. Da bi se u potpunosti razumjele fiziološke implikacije kao odgovor na oksidacijski stres, potrebna su dublja znanja o mehanizmima koji reguliraju aktivnosti ovih enzima.

Ovim istraživanjem dobiveni su rezultati koji su potvrdili kako polifenoli iz ekstrakta cvijeta trnine uvelike smanjuju koncentraciju oksidiranih spojeva u C57BL6 miševa. U svim segmentima je ekstrakt cvijeta trnine pokazao najbolje rezultate te nas takav ishod istraživanja postupno uvodi u novi svijet prevencije kardiovaskularnih bolesti, ali i mnogih drugih, ozbiljnijih stanja, kao što je karcinom.

5. ZAKLJUČCI

1. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je tretman s TC statistički značajno (ANOVA, $p<0,05$) smanjio aktivnosti MDA i PC u jetri miša u odnosu na kontrolnu skupinu životinja što se može pripisati polifenolima prisutnim u ekstraktu cvijeta trnine, dok su ostale grupe ostale na razini kontrolne skupine. Koncentracije GSH, SOD i CAT u ispitivanim uzorcima jetre statistički su značajno (ANOVA, $p<0,05$) povećane u svim grupama miševa u odnosu na kontrolnu grupu, što ukazuje na antioksidacijski učinak TC kao i WP i smanjenje oksidacijskog stresa.

2. Ovo istraživanje ukazuje na to da ekstrakt cvijeta trnine, koji je bogat bioaktivnim spojevima, i visoko-proteinska dijeta (whey protein) mogu djelovati kao nutritivni sastojak za povećanje endogenih antioksidacijskih enzima i smanjenje oksidacijskog stresa.

6. LITERATURA

Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Method. Enzymol.* **105**, 121-126.

Anonymus 1 (2016) Need a hedge? Hawthorn or Blackthorn? I say BOTH!, <http://www.sowandso.com/hedge-hawthorn-blackthorn/>. Pristupljeno 04.srpnja 2016.

Anonymus 2 (2014) The Plant List: A Working List of All Plant Species, 2014. < http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/rjp-43<. Pristupljeno 04. srpnja 2016.

Badger, T.M., Ronis, M.J., Hakkak, R. (2001) Developmental effects and health aspects of soy protein isolate, casein, and whey in male and female rats. *Int. J. Toxicol.* **20**, 165-174.

Baur, J.A., Sinclair, D.A. (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 493-506.

Bayraktutan, U. (2002) Free radicals, diabetes and endothelial dysfunction. *Diabetes Obes. Metab.* **4**, 224-238.

Belobrajdic, D.P., McIntosh, G.H., Owens, J.A. (2003) Whey proteins protect more than red meat against azoxymethane induced ACF in Wistar rats. *Cancer Lett.* **198**, 43-51.

Belobrajdic, D.P., McIntosh, G.H., Owens J.A. (2004) A high-whey-protein diet reduces body weight gain and alters insulin sensitivity relative to red meat in wistar Rats. *J. Nutr.* **134**, 1454-1458.

Borkowski, B., Lutomski, J., Skrzydlewska, E., Zygmunt, B. (1994) Rosliny lecznicze w fitoterapii, IRiPZ, Poznan, str. 470-471.

Bounous, G. (2000) Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Res.* **20**, 4785-4792.

Brnčić, M., Karlović, S., Bosiljkov, T., Tripalo, B., Ježek, D., Cugelj, I., Obradović, V. (2008) Obogaćivanje ekstrudiranih proizvoda proteinima sirutke. *Mljekarstvo* **58**, 275-295.

Broncel, M., Kozirog, M., Duchnowicz, P., Koter-Michalak, M., Sikora, J., ChojnowskaJezierska, J. (2010) Aronia melanocarpa extract reduces blood pressure, serum endothelin, lipid, and oxidative stress marker levels in patients with metabolic syndrome. *Med. Sci. Monit.* **16,** 28-34.

Bukan, N., Sancak, B., Yavuz, O., Koca, C., Tutken, F., Ozcelikay, A.T., Altan, N. (2003) Lipid peroxidation and scavening enzyme levels in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian J. Biochem. Bio.* **40**, 447-450.

Burits, M., Bučar, F. (2000) Antioxidative activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother. Res.* **14**, 323-328.

Calvo, M. I., Akerreta, S., Cavero, R. Y. (2013) The pharmacological validation of medicinal plants used for digestive problems in Navarra, Spain. *Eur. J. Integr. Med.* **5**, 537-546.

Calvo, M. I., Cavero, R. Y. (2014) Medicinal plants used for cardiovascular diseases in Navarra and their validation from Officinal sources. *J. Ethnopharmacol*. **157**, 268-273.

Cichoz-Lach, H., Michalak, A. (2014) Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J. Gastroenterol*. **20**, 8082-8091.

Çoban, J., Doğan-Ekici, I., Aydın, A.F., Betül-Kalaz, E., Doğru-Abbasoğlu, S., Uysal, M. (2015) Blueberry treatment decreased D-galactose-induced oxidative stress and brain damage in rats. *Metab. Brain. Dis.* **30**, 793-802.

Cruzat, V.F., Krause, M., Newsholme, P. (2014) Amino acid supplementation and impact on immune function in the context of exercise. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **11**, 1-13.

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R. (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta* **329**, 23-28.

Damodaran, S. (1997) Food proteins: an overview. U: Food proteins and their applications, (Damodaran, S., Paraf, A., ured.), Marcel Dekker Inc., New York, str. 1-24.

Das, D.K., Maulik, N. (2006) Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine. *Mol. Interv.* **6**, 36-47.

Diamanti, J., Mezzetti, B., Giampieri,F., Alvarez-Suarez, J.M., Quiles, J.L., Gonzalez-Alonso, A., Ramirez-Tortosa, M.C., Grandos-Principal, S., Gonzales, A.M., Santos-Buelga, C., Battino, M. (2014) Doxorubicin-induced oxidative stress in rats is efficiently counteracted by dietary anthocyanin differently enriched strawberry. *J. Agric. Food Chem*. **62,** 3935-3943.

Draper, H.H., Csallany, A.S., Hadley, M. (2000) Urinary aldehydes as indicators of lipid peroxidation *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 1071-1077.

Dröge, W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47-95.

Edeas, M., Attaf, D., Mailfert, A.S., Nasu, M., Joubet, R. (2010) Maillard reaction, mitochondria and oxidative stress: potential role of antioxidants. *Pathol. Biol.* **58**, 220-225.

Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A., Simeon-Rudolf, V., Reiner, E. (2003) Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Anal. Biochem*. **312**, 224-227.

Faure P., Corticelli, P., Richard, M.J., Arnaud, J., Coudray, C., Halimi, S., Favier, A., Roussel, A.M. (1993) Lipid peroxidation and trace element status in diabetic ketotic patients: influence of insulin therapy. *Clin. Chem.* **39**, 789-793.

Flohe, J., Brigelius-Flohe, I. (2001) Selenoproteins of the glutathione system. U: Selenium: its molecular biology and role in human health, (Hatfield, D.L., ured.), Kluwer, Boston, str. 157-178.

Flohe, L., Otting, F. (1984) Superoxide dismutase assays. *Method. Enzymol.* **105**, 93-104.

Gamulin, S., Marušić, M., Kovač, Z. (2005) Patofiziologija, Medicinska naklada, Zagreb, str. 187-193, 408-410.

Gelenčir, J., Gelenčir, J. (1991) Atlas ljekovitog bilja, Prosvjeta, Zagreb.

Gelenčir, N. (1989) Prirodno liječenje biljem i ostalim sredstvima, 14. izd, Digitalizacija knjige: Equilibrium, Beograd.

Ghodbane, S., Lahbib, A., Sakly, M., Abdelmelek, H. (2013) Bioeffects of static magnetic fields: oxidative stress, genotoxic effects, and cancer studies. *Biomed. Res. Int.* ID **602987**, 1-12. doi: 10.1155/2013/602987

Groves, T.J. (1999) Peroxinitrite: reactive, invasive and enigmatic. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 226-235.

Gu, C., Shi, Y., Le, G. (2008) Effect of dietary protein level and origin on the redox status in the digestive tract of mice. *Int. J. Mol. Sci.* **9**, 464-475.

Gutteridge, J.M.C. (1988) Lipid peroxidation: some problems and concepts. U: Oxygen Radical and Tissue Injury, (Halliwell, B., ured.), Upjohn Co and FASEB, Bethesda, str. 9-19.

Guyton, A.C., Hall, J.E. (1999) Medicinska fiziologija, 9. izd., Medicinska naklada, Zagreb.

Halliwell, B. (1995) The biological significant of oxygen-derived species. U: Active Oxygen in Biochemistry, (Valentine, J.S., Foote, C.S., Greenberg, A., Liebman, J.F., ured.), Blackie Academic and Professional, Glasgow, str. 313-315.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999) Free radicals in biology and medicine, Clarendon Press, Oxford.

Hamden, K., Carreau, S., Marki, F.A., Masmoudi, H., El Feki, A. (2008) Positive effects of green tea on hepatic dysfunction, lipid peroxidation and antioxidant defence depletion induced by cadmium. *Biol. Res*. **41**, 331-339.

Harborne, J.B., Baxter, H. (1999) Handbook of natural flavonoids, 2.izd., Wiley & Sons, Chichester.

Herceg, Z., Režek, A. (2006) Prehrambena i funkcionalna svojstva koncentrata i izolata proteina sirutke. *Mljekarstvo* **56**, 379-376.

Hesham, A.E., Ezzedin, S.E., Somaia, A.N., Mohamed, F.E., Enayat, A.O., Naglaa, A. (2014) Evaluation of the therapeutic effect of whey proteins on the hepatotoxicity induced by paracetamol and alcohol co-administration in rats. *IJPRBS*. **3**, 295-314.

Ho, V.W., Leung, K., Hsu, A., Luk, B., Lai, J., Shen, S.Y., Minchinton, A.I., Waterhouse, D., Bally, M.B., Lin, W., Nelson, B.H., Sly, L.M., Krystal, G. (2011) A low carbohidrate, high protein diet slows tumor growth and prevents cancer initiation. *Cancer Res.* **71**, 4484-4493.

Jayakumar, T., Sakthivel, M., Thomas, P.A., Geraldine, P. (2008) Pleurotus ostreatus, an oyster mushroom, decreases the oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rat kidneys, heart and brain. *Chem. Biol. Interact*. **176**, 108-120.

Journel, M., Chaumontet, C., Darcel, N., Fromentin, G., Daniel Tomé, D. (2012) Brain responses to high-protein diets. *Adv. Nutr.* **3**, 322-329.

Kazazić, S.P. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh. Hig. Rada. Toksikol*. **55**, 279-290.

Keuls, M. (1952) The use of the "studentized" range in connection with an analysis of variance. *Euphytica* **1**, 112-122.

Kinsey-Jones, J.S., Alamshah, A., McGavigan, A.K., Spreckley, E., Banks, K., Monteoliva, N.C., Norton, M., Bewick, G.A., Murphy, K.G. (2015) GPRC6A is not required for the effects of a high-protein diet on body weight in mice. *Obesity* **23**, 1194–1200.

Kolodziej, H., Sakar, M.K., Burger, J.F.W., Engelshowe, R., Ferreira, D., Ferreira, A. (1991) Type Proanthocyanidins from *Prunus spinosa*. *Phytochemistry* **30**, 2041-2047.

Kralj, V., Brkić-Biloš, I., Ćorić, T., Silobrčić-Radić, M., Šekerija, M. (2015) Kronične nezarazne bolesti – teret bolesti stanovništva Hrvatske. *Cardiol. Croat.* **10**, 167-175.

Lagiou, P., Sandin, S., Lof, M., Trichopoulos, D., Adami, H.O., Weiderpass, E. (2012) Low carbohydrate-highprotein diet and incidence of cardiovascular disease in Swedish women: prospective cohort study. *BMJ*. **344**, 1-11.

Lebeau, J., Furman, C., Bernier, J., Duriez, P., Teissier, E., Cotelle, N. (2000) Antioxidant properties of di-*tert*-butylhydroxylated flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 900-912.

Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E. (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods. Enzymol.* **233**, 346-357.

Low, P.P.L., Rutherfurd, K.J., Gill, H.S., Gross, M.L. (2003) Effect of dietary whey protein concentrate on primary and secondary antibody responses in immunized BALB/c mice. *Int. Immunopharmacol.* **3**, 393-401.

Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr A.L. (1951) Protein measurement with the Folin–phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275.

Lushchak, V.I. (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol*. **101**, 13-30.

Magalhaes, L., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C. (2007) Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal. Chim. Acta* **613**, 1-19.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jimenez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr*. **79**, 727-747.

Mansour, D.F.S., Eldenshary, E.S., Nada, S.A., Omara, E.A., Ibrahim, M.I.M. (2013) Therapeutic effectiveness of certain whey proteins on lipopolysaccharide-induced oxidative stress and histopathological changes in rat liver. *J. Appl. Sci. Res.* **9**, 4983-4992.

Mansour, D.F.S., Nada, S.A., El-Denshary, E.S., Omara, E.A., Asaad, G.F., Abdel-Rahman, R.F. (2015) Milk whey proteins modulate endotoxemia-induced hepatotoxicity in rats. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*. **7**, 65-71.

Mao, G., Kraus, G.A., Kim, I., Spurlock, M.E., Bailey, T.B., Beitz, D.C. (2011) Effect of a mitochondria-targeted vitamin E derivative on mitochondrial alteration and systemic oxidative stress in mice. *Br. J. Nutr.* **106**, 87-95.

Marckmann, P., Osther, P., Pedersen, A.N., Jespersen, B. (2015) High-protein diets and renal health. *J. Ren. Nutr.* **25**, 1-5.

Marshall, K. (2004) Therapeutic applications of whey protein. *Altern. Med. Rev.* **9**, 136-156.

Mateos, R., Goya, L., Bravo, L. (2005) Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J. Chrom. B.* **827**, 76-82.

Newman, D. (1939) The distribution of range in samples from a normal population, expressed in terms of an independet estimate of standard deviation. *Biometrika* **31**, 20-30.

Olszewska, M., Wolbis, M. (2000) Flavonoids from the flowers of *Prunus spinosa* L. *Herba Polon. Pharm*. **46**, 249-234.

Orallo, F., Alvarez, E., Camina, M., Leiro, J.M., Gomez, E., Fernandez, P. (2002) The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol. Pharmacol.* **61**, 294-302.

Pandey, K.B., Mishra, N., Rizvi, S.B. (2009) Protective role of myricetin on markers of oxidative stress in human erythrocytes subjected to oxidative stress. *Nat. Prod. Commun.* **4**, 221-226.

Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009a) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2**, 270-278.

Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009b) Protective effect of resveratrol on formation of membrane protein carbonyls and lipid peroxidation in erythrocytes subjected to oxidative stress. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **34**, 1093-1097.

Petlevski, R., Juretić, D., Hadžija, M., Slijepčević, M., Lukač-Bajalo, J. (2006) Koncentracija malondialdehida u NOD miševa tretiranih akarbozom. *Biochem. Med.* **16**, 43-49.

Petzke, K.J., Elsner, A., Proll, J., Thielecke, F., Metges, C.C. (2000) Long-term high protein intake does not increase oxidative stress in rats. *J. Nutr.* **130**, 2889-2896.

Pilaczynska-Szczesniak, L., Skarpanska-Steinborn, A., Deskur, E., Basta, P., HoroszkiewiczHassan, M. (2005) The influence of chokeberry juice supplementation on the reduction of oxidative stress resulting from an incremental rowing ergometer exercise. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **15**, 48-58.

Primiano, T., Suttler, T.R., Kensler, T.W. (1997) Antioxidant-inducible genes. *Adv. Pharmacol.* **38**, 293-328.

Puljak, A., Perko, G., Mihok, D., Radašević, H. (2004) Antioksidansi i oligoelementi u starijih ljudi. *Medix* **52**, 98-102.

Requena, J.R., Fu, M.X., Ahmed, M.U., Jenkins, A.J., Lyons, T.J., Thorpe, S.R. (1996) Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrol. Dial. Transplant.* **11**, 48-53.

Rizvi, S.I., Zaid, M.A., Anis, R., Mishra, N. (2005) Protective role of tea cetechins agains oxidation-induced damage of type 2 diabetic erythrocytes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **32**, 70-75.

Sanchez-Rodriguez, C., Martin-Sanz, E., Cuadrado, E., Granizo, J.J., Sanz-Fernandez, R. (2016) Protective effect of polyphenols on presbycusis via oxidative/nitrosative stress suppression in rats. *Exp. Gerontol.* **83**, 31-36.

Santesso, N., Aki, E.A., Bianchi, M., Mente, A., Mustafa, R., Heels-Ansdell, D., Schunenmann, H.J. (2012) Effects of higher- versus lower- protein diets on health outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Clin. Nutr.* **66**, 780-788.

Shertzer, H.G., Krishan, M., Genter, M.B. (2013) Dietary whey protein stimulates mitochondrial activity and decreases oxidative stress in mouse female brain. *Neurosci. Lett.* **548**, 159–164.

Sheu, J.Y., Chen, P.H., Tseng, W.C., Chen, C.Y., Tsai, L.Y., Huang, Y.L. (2003) Spectrophotometric determination of a thiobarbituric acid-reactive substance in human hair. *Anal. Sci.* **19**, 957-960.

Sindayikengera, S., Xia, W.S. (2006) Nutritional evaluation of caseins and whey proteins and their hydrolysates from Protamex. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* **7**, 90-98.

Sousa, G.T., Lira, F.S., Rosa, J.C., de Oliveira, E.P., Oyama, L.M., Santos, R.V., Pimentel, G.D. (2012) Dietary whey protein lessens several risk factors for metabolic diseases: a review. *Lipids Health Dis.* **11**, 1-9.

Štefan, L., Tepšić, T., Zavidić, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R. (2007) Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina*. **43**, 84-93.

Štulhofer, M. (1992) Kirurgija probavnog sustava, Grafički zavod Hrvatske, Zagreb, str. 483-532.

Tranberg, B., Hellgren, L.I., Lykkesfeldt, J., Sejrsen, K., Jeamet, A., Rune, I., Ellekilde, M., Nielsen, D.S., Hansen, A.K. (2013) Whey protein reduces early life weight gain in mice fed a high-fat diet**.** *PLoS One*. **8**, 1-7.

Tratnik, Lj. (1998) Mlijeko - tehnologija, biokemija i mikrobiologija, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str. 345-380.

Trumbo, P., Schlicker, S., Yates, A.A., Poos, M. (2002) Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty acids, Cholesterol, Protein and Amino Acids. *J. Am. Diet. Assoc.* **102**, 1621-1630.

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur,M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**, 1-40.

Valls, J., Millan, S., Marti, M.P., Borras, E., Arola, L. (2009) Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavonols. *J. Chromatogr*. A. **1216**, 7143-7172.

Veličković, J.M., Kostić, D.A., Stojanović, G.S., Mitić, S.S., Mitić, M.N., Ranđelović, S.S., Đorđević, A.S. (2014) Phenolic composition, antioxidant and antimicrobal activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. *Hem. Ind*. **68**, 297-303.

Vergnaud, A.C., Norat, T., Mouw, T., Romaquera, D., May, A.M., Bueno-de-Mesquita, H.B., van der, A.D., Agudo, A., Wareham, N., Khaw, K.T., Romieu, I., Freisling, H., Slimani, N., Perquier, F., Boutron-Rualt, M.C., Clavel-Chapelon, F., Palli, D., Berrino, F., Mattiello, A., Tumino, R., Ricceri, F., Rodriguez, L., Mollina-Montes, E., Amiano, P., Barricarte, A., Chirlaque, M.D., Crowe, F.L., Orfanos, P., Naska, A., Trichopoulou, A., Teucher, B., Kaaks, R., Boeing, H., Bujisse, B., Johansson, I., Hallmans, G., Drake, I., Sonestedt, E., Jakobsen, M.U., Overvad, K., Tjonneland, A., Halkjaer, J., Braaten, T., Lund, E., Riboli, E., Peeters, P.H. (2013) Macronutrient composition of the diet and prospective weight change in participants of the EPIC- PANACEA study. *PLoS One.* **8**, 1-11.

Wootton-Beard, P.C., Ryan L. (2011) Improving public health: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Res. Int*. **44**, 3135-3148.

Zeuzem, S. (2007) Hepatitis B: Risks, prevention, and treatment, ELPA, 2007., http://www.elpa-info.org/tl_files/elpa_downloads/ELPA_HBV_2007-English_Web.pdf, pristupljeno 26.8.2016.